UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y FÍSICA

Monitorización ambiental de plaguicidas empleando muestreo pasivo en colmenas de abeja melífera

Environmental monitoring of pesticides using passive sampling in honeybee hives

María del Mar Murcia Morales

Almería, diciembre 2022

UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Química y Física

LOS DIRECTORES DE LA TESIS:

El Prof. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba, Catedrático del Departamento de Química y Física de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Almería y la Dra. María del Mar Gómez Ramos, investigadora de la Universidad de Almería, en calidad de director y codirectora, respectivamente,

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral, titulada "***Monitorización ambiental de plaguicidas empleando muestreo pasivo en colmenas de abeja melífera***", presentada por María del Mar Murcia Morales, graduada en Química, ha sido realizada dentro del programa de doctorado de Química Avanzada bajo nuestra supervisión, en el Área de Química Analítica del Departamento de Química y Física de la Universidad de Almería, y que, a juicio de los directores, reúne los requisitos de originalidad, extensión e interés teórico y práctico necesarios para ser presentada como Memoria para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expide el presente certificado en Almería, diciembre 2022

Directores de la Tesis:

Prof. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba

Dra. María del Mar Gómez Ramos

“–Es extraordinario –dijo, moviendo la cabeza, admirado.

–Lo es y no lo es –replicó el anciano–. Cuando florecen las lilas, las abejas van al Jardín Aleksándrovski y la miel tiene sabor a lilas. Pero dentro de una semana aproximadamente irán al Anillo de los Jardines y entonces lo que notará será el sabor de los cerezos.

–¡Al Anillo de los Jardines! ¿Hasta dónde pueden llegar?

–Dicen que las abejas son capaces de atravesar un océano en busca de una flor –contestó el anciano con una sonrisa en los labios.”

AMOR TOWLES, *Un caballero en Moscú*

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento al Prof. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba por la oportunidad de trabajar en un grupo de investigación donde he aprendido tanto y donde he podido crecer como investigadora y como persona. Por todo lo que he aprendido de su experiencia a lo largo de estos años, por la confianza que puso en mí y por guiarme en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio, por las horas que hemos pasado juntos, por compartir conmigo lo que saben y porque, con ellos, los días estresantes lo son un poquito menos: gracias a Octavio, Mar, Icíar, José Luis, Laura, José, Patricia, Ana Goday, Ana Lozano y Samanta. A María del Mar Gómez Ramos, May, por guiarme a lo largo de este proceso, por escuchar todas mis idas y venidas y apoyarme siempre. A Chusa, por su entusiasmo y creatividad, que son contagiosos, y por aconsejarme todos estos años. A Toché, por contar conmigo para esas visitas inolvidables a institutos y por acompañarme durante mis primeros pasos con muestras apícolas. A Lorena, por hacer que los días de acreditación resulten mucho más llevaderos; por ayudarme siempre. A Víctor y Łukasz, por los buenos momentos y por no dejarme sola durante ese primer congreso que tanto me asustaba. A Carmen, por todas las conversaciones en el despacho; porque hay textos que no concibo escribir sin preguntarle "¿a ti te parece que esto está bien?"; por las infusiones de limón, miel y jengibre que alegran los días de invierno; por todo lo que he aprendido de ella. A Willy, que más que un compañero de laboratorio es un miembro de mi familia.

I would also like to thank all the members from the INSIGNIA consortium. This project marked a milestone in my life and helped me grow professionally in a way that I would have never dreamt of. Thank you, Sjef, for the outstanding management of such a big project and group of people. Thank you, Flemming; working with you is always a pleasure, and your enthusiasm is deeply inspiring. Thank you, Kostas, for being always available to help me when I have a question. And to all the other members, for sharing their experience and making this project possible.

A José Manuel Flores, por todo su apoyo durante este tiempo; por participar en cada prueba que se nos ocurre, a veces con muy poca antelación, por su apoyo y sus buenos consejos. A Horacio, por compartir conmigo su experiencia y por haber hecho posible (y fácil) un trabajo del que aprendí tanto y al que le pusimos tanto cariño.

A mis padres, que están conmigo a cada paso del camino y me lo han dado todo; a mi madre, que desde pequeña me inculcó la pasión por la lectura y que alegra cualquier momento que paso con ella; a mi padre, que siempre está dispuesto a escuchar y que pararía el mundo si hiciera falta con tal de ayudarme. A mi abuela María, la mayor fuente de inspiración que he conocido. Y a mi abuela Pepa, de quien sospecho que heredé la vocación por la enseñanza y a quien echo de menos cada día.

A Francisco y María del Mar, por haberme acogido desde el primer día y hacerme sentir en casa siempre que estoy con ellos.

A mis ayudantes de cuatro patas, porque buena parte de esta Tesis ha sido redactada con alguno de ellos sobre mi regazo (o comiéndose mis plantas).

A ti, Fran. Por tu apoyo incondicional, por tu paciencia infinita, por estar ahí siempre, por saber en todo momento lo que tengo en la cabeza, veces mejor que yo misma. Por absolutamente todo.

ÍNDICE

Objetivos……1

Resumen/Abstract……5

Hipótesis……11

Capítulo 1. Introducción……15

1. Un planeta de plaguicidas……17

1.1. Propiedades de los plaguicidas……18

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas……18

1.1.2. Propiedades medioambientales y toxicológicas……19

1.2. Plaguicidas en el medioambiente……20

1.3. Análisis de plaguicidas……22

1.3.1. Técnicas cromatográficas……22

1.3.2. Espectrometría de masas……25

2. Polinizadores, apicultura y plaguicidas……28

2.1. Monitorización de plaguicidas en matrices apícolas……32

2.1.1. Matrices apícolas……33

2.1.2. Tratamiento de muestra……35

2.1.3. Métodos de análisis……38

2.1.4. Detección de plaguicidas en muestras apícolas……39

2.2. Marco legal……46

2.2.1. Legislación relativa a la presencia de plaguicidas en miel……47

2.2.2. Legislación relativa a la presencia de plaguicidas en otras matrices apícolas……49

2.3. Tendencias futuras……49

2.3.1. Instrumentación y metodología……49

2.3.2. Legislación y monitorizaciones……50

2.3.3. Ciencia ciudadana……50

2.3.4. Muestreo pasivo……52

2.4. El proyecto INSIGNIA……54

2.4.1. INSIGNIA-EU……55

3. Referencias……56

Capítulo 2. Muestreo activo……69

Capítulo 3. APIStrips……83

Capítulo 4. Dinamarca……97

Capítulo 5. Miticidas……111

Conclusiones/Conclusions……125

Anexos……129

Anexo 1. Listado de siglas y acrónimos……131

Anexo 2. Plaguicidas mencionados en la Tesis……133

Anexo 3. Figuras y tablas……137

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como principal objetivo el desarrollo, optimización y aplicación de una nueva estrategia de monitorización ambiental que permita evaluar la presencia de plaguicidas en el medioambiente a través de colmenas de *Apis mellifera*, sin ocasionar un perjuicio a estos polinizadores. A tal fin se ha desarrollado un nuevo muestreador pasivo con capacidad para captar diferentes contaminantes, los cuales son posteriormente extraídos de su superficie y analizados mediante espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas de gases y líquidos. Los estudios realizados pueden dividirse en tres grandes bloques, que incluyen:

- Aplicación de las estrategias clásicas de muestreo activo de partes de la colmena (cera, pan de abeja y abejas vivas) para el análisis de residuos de plaguicidas, con el objeto de estudiar su migración a diferentes compartimentos de la colmena en función de sus propiedades fisicoquímicas (**Publicación 1**).
- Desarrollo y optimización de un muestreador pasivo con suficiente versatilidad para captar contaminantes con un amplio rango de propiedades y cuyo análisis proporcione información representativa y ampliada sobre la contaminación acumulada en la colmena, minimizando a su vez los daños producidos a la colonia que suponen los sistemas de muestreo clásicos (**Publicación 2**).
- Aplicación del muestreador desarrollado en la presente Tesis para una monitorización ambiental a gran escala en diferentes apiarios de Dinamarca (**Publicación 3**) y al estudio de los fenómenos de disipación y contaminación cruzada de miticidas empleados en apicultura (**Publicación 4**).

RESUMEN

ABSTRACT

RESUMEN

La presencia de plaguicidas en los ecosistemas es un fenómeno ampliamente demostrado por un gran número de estudios. Éstos y otros contaminantes pueden alterar el ciclo de vida de los organismos debido a una exposición puntual o prolongada a dichas sustancias, que pueden provocar efectos tóxicos agudos o crónicos. Los seres humanos somos también susceptibles de sufrir efectos negativos relacionados con la presencia de plaguicidas en el entorno, ya sea de forma directa (a través de la ingesta o el contacto directo con las sustancias) o indirecta. Respecto a las implicaciones indirectas, los efectos negativos producidos por los plaguicidas en otros organismos pueden repercutir en última instancia en la salud humana y la biodiversidad, entre otros. Es el caso, por ejemplo, de la disminución a nivel global registrada recientemente del número de abejas polinizadoras, en especial *Apis mellifera*, una especie esencial en los modelos actuales de agricultura y en la producción de miel y polen. La desaparición y muerte masiva de estos insectos está relacionada, entre otros factores, con su exposición a los productos fitosanitarios aplicados a los cultivos, así como a los productos veterinarios utilizados por los apicultores para combatir las infestaciones.

Las abejas constituyen de este modo un importante bioindicador ambiental, pues en sus colmenas se acumulan los contaminantes a los que están expuestas durante sus actividades de forrajeo. El uso de muestreadores pasivos es una estrategia que puede complementar o sustituir el muestreo activo de matrices apícolas como polen, cera, miel o abejas, entre otros, ayudando a superar las limitaciones asociadas al análisis de dichas muestras. Para el desarrollo de tal estrategia de muestreo, en la presente Tesis Doctoral se ha realizado un trabajo dividido en tres grandes bloques.

En primer lugar, se ha realizado una monitorización de plaguicidas en colmenas de abejas, que permitiera evaluar las ventajas y limitaciones del muestreo activo de matrices apícolas. Dicho estudio permitió constatar las principales tendencias de acumulación de los plaguicidas en diferentes partes de la colmena, así como evaluar la migración de estos residuos hacia los seres más vulnerables de la colonia: las abejas en estado larvario. Este estudio aportó la información necesaria para comprender qué aspectos deberían considerarse durante el diseño de un muestreador pasivo que sustituyera el análisis de matrices apícolas.

A continuación, los resultados obtenidos se emplearon para la selección de un material adsorbente con capacidad para captar sustancias con diferentes propiedades fisicoquímicas, escogiéndose a tal fin el polímero Tenax®. La forma del muestreador, así como la naturaleza del soporte, fueron asimismo diseñadas de forma que facilitara el proceso de muestreo y se minimizara su impacto en las colonias. Se desarrolló de este modo la APIStrip (*Adsorb-Pesticide-Inhive Strip*), una herramienta cuya principal finalidad consiste en simplificar y hacer más eficiente la monitorización ambiental de residuos de plaguicidas a través de colmenas de abejas.

Por último, una vez diseñadas y optimizadas, las APIStrips se aplicaron en estudios de campo que incluyeron monitorizaciones a gran escala en diferentes puntos de Europa. Las monitorizaciones se realizaron en el marco del proyecto europeo INSIGNIA durante los años 2019 y 2020, atrayendo además la atención de diferentes grupos de investigación y apicultura de todo el mundo. Estos estudios han constatado la facilidad de uso de las APIStrips, así como su capacidad para adsorber los plaguicidas que se acumulan típicamente en diferentes matrices apícolas. Los resultados de estas monitorizaciones han proporcionado información valiosa acerca de la presencia de contaminantes en el medioambiente de diferentes países y entornos. Por otro lado, las APIStrips se han empleado para estudiar los fenómenos de disipación y contaminación cruzada de los productos más ubicuos en el interior de las colmenas: los tratamientos veterinarios.

ABSTRACT

The presence of pesticides in ecosystems has been widely demonstrated by a large number of studies. Pesticides and other pollutants can disrupt the life cycle of organisms due to one-time or prolonged exposure to these substances, which can cause acute or chronic toxic effects. Humans are also susceptible to adverse effects related to the presence of pesticides in the environment, either directly (through ingestion or direct contact with the substances) or indirectly. With regard to indirect consequences, the negative effects produced by pesticides on certain organisms may ultimately affect the human health and the biodiversity, among others. This is the case, for example, of the global decline in the number of pollinating bees, especially *Apis mellifera*, an essential species in the current agricultural models and the honey and pollen production. The massive disappearance and death of these insects is related, among other factors, to their exposure to plant protection products applied to crops, as well as to the veterinary products used by beekeepers to mitigate infestations.

Bees are thus an important environmental bioindicator, as the pollutants to which they are exposed during their foraging activities accumulate in their hives. In this context, the passive sampling approach can complement or replace the classical active sampling of apicultural matrices including pollen, wax, honey or bees, among others, and therefore, help overcome the limitations associated to these samples. In order to develop such a sampling strategy, this Doctoral Thesis has carried out a study divided into three main sections.

Firstly, a pesticide monitoring in beehives was carried out to evaluate the advantages and limitations of the active sampling of bee matrices. This study made it possible to determine the main trends in the accumulation of pesticides in different parts of the hive, as well as to evaluate the migration of these residues towards the most vulnerable beings in the colony: bees in larval stage (bee brood). This study provided the necessary information to understand which aspects should be considered during the design of a passive sampler to replace the analysis of bee matrices.

Secondly, the obtained results were considered during the selection of an adsorbent material with the capacity to capture substances with different physicochemical properties; Tenax® polymer was chosen for this purpose. The sampler shape, as well as the nature of the support, were also designed to facilitate the sampling process and minimize the impact on the colonies. This led to the development of the APIStrip (Adsorb-Pesticide-Inhive Strip), a tool whose main purpose is to simplify and streamline the environmental monitoring of pesticide residues through honey bee hives.

Finally, once designed and optimized, the APIStrips were applied in field studies involving large-scale monitoring in different European countries. These monitoring studies were carried out in the framework of the European INSIGNIA project during 2019 and 2020, attracting the attention of different research and beekeeping groups from all over the world. These studies have confirmed the ease of use of APIStrips, as well as their ability to adsorb pesticides that typically accumulate in the different beehive matrices. The results of these monitoring studies have provided

valuable information about the presence of contaminants in the environment in different countries and landscapes. Additionally, the APIStrips have also been used to study the dissipation and cross-contamination phenomena of the most ubiquitous products inside hives: the veterinary treatments.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El uso de colmenas de abejas para evaluar la contaminación ambiental es una estrategia ampliamente extendida que proporciona información muy relevante sobre el estado de los ecosistemas en los que se encuentran. Sin embargo, las estrategias de muestreo apícola son típicamente destructivas: es necesario utilizar parte de los recursos de las abejas, incluyendo alimentos (polen, pan de abeja o miel, entre otros), estructuras (cera, panal) o a las propias abejas que conforman la colonia. Esto conlleva dos importantes limitaciones asociadas a las monitorizaciones basadas en el análisis de muestras apícolas. Por un lado, es necesario analizar diferentes matrices para obtener una imagen representativa de la contaminación acumulada en la colmena. Por otro, el análisis de estas matrices ocasiona un perjuicio a las abejas al utilizar los recursos que ellas necesitan, pudiendo llegar a destruir completamente la colonia.

En este sentido, el muestreo pasivo de contaminantes permite solventar simultáneamente estos dos problemas. Al analizar una única matriz lo bastante representativa como para captar contaminantes de diferente naturaleza se facilitaría la estandarización y comparación de resultados, reduciendo a su vez el trabajo y recursos requeridos en las monitorizaciones. Además, al no requerirse el análisis de matrices apícolas, se evitarían los daños producidos a las colonias y las dificultades analíticas asociadas a sus diferentes propiedades. Sin embargo, este enfoque de muestreo pasivo no ha sido evaluado en profundidad hasta la fecha. La presente Tesis Doctoral estudia el desarrollo y optimización de un muestreador pasivo diseñado para el análisis de contaminantes ambientales –en particular, plaguicidas– acumulados en colmenas de abejas. Se compara asimismo su viabilidad para proporcionar una visión global sobre la carga de plaguicidas en el interior de las colmenas, respecto a la información obtenida mediante el análisis de matrices apícolas.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. UN PLANETA DE PLAGUICIDAS

"*Tráeme azufre, que limpia toda contaminación, y enciende un fuego para que pueda purificar la casa.*"

Ya en la Odisea, escrita en torno al año 1000 a.C., hay referencias al uso de sustancias para el control de plagas [1]. En concreto, Ulises pide azufre a su nodriza Euriclea para evitar que los insectos acudan atraídos por los cadáveres de los pretendientes de Penélope.

Si bien el uso de plaguicidas se remonta a la Antigüedad, el desarrollo de la agricultura extensiva, la Revolución Industrial y el espectacular crecimiento demográfico durante el siglo XX han contribuido a un aumento exponencial de la producción de sustancias activas de uso fitosanitario. Este uso masivo ha dado lugar a su vez al desarrollo de nuevos compuestos más selectivos y seguros, resultando en un espectacular número de plaguicidas disponibles. En su 18ª edición de 2018, el *Pesticide Manual* incluía 1593 sustancias activas, un 418 % más que en el año 1968 [2].

A lo largo de las últimas tres décadas, el uso de plaguicidas ha seguido experimentando un lento crecimiento a nivel mundial, produciéndose una estabilización en años recientes (**Figura 1**). En Europa, el uso de plaguicidas se ha mantenido prácticamente constante desde 2010 debido a que, a pesar de que existen países en los que ha aumentado su uso (España, Austria y Letonia entre ellos), en otros muchos se ha reducido considerablemente, estando Dinamarca e Italia entre aquellos que más han disminuido su uso [3].

Los posibles usos de los plaguicidas son muy diversos, siendo la agricultura su campo de aplicación más extenso, donde se emplean para proteger a los cultivos durante diferentes etapas de la producción. En este contexto, su utilización ha permitido reducir drásticamente las plagas y sus efectos, aumentando la producción y calidad de los cultivos [4]. También se utilizan en granjas, piscifactorías, clínicas veterinarias o apiarios para evitar infestaciones y las enfermedades que éstas ocasionan en animales. Por otro lado, los plaguicidas se emplean en otros ámbitos como el control de hierbas en carreteras y vías de tren, así como en la fumigación a gran escala para controlar las poblaciones de ratones e insectos, que pueden ser portadores de enfermedades. Su uso doméstico está asimismo muy extendido, ya sea en jardines o en el interior de viviendas.

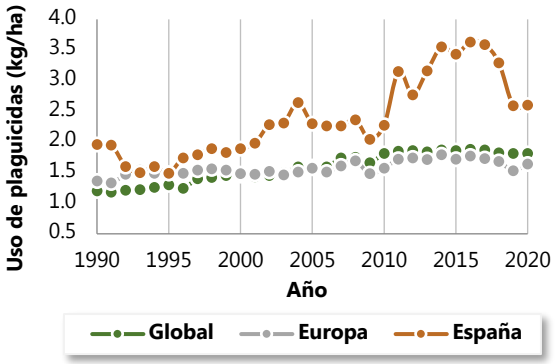


Figura 1. Evolución entre 1990 y 2020 del uso de plaguicidas a nivel global, europeo y español [3]

Sin embargo, esta enorme variabilidad de aplicaciones implica que estos compuestos se encuentran muy extendidos en los ecosistemas, independientemente de la existencia de explotaciones agrícolas en las proximidades. Debido a su mecanismo de acción, la gran mayoría de plaguicidas no presenta una toxicidad selectiva hacia su especie objetivo, sino que afectan a otros

organismos que entran en contacto con ellos, incluyendo al ser humano. Se han llegado a identificar más de 150 000 muertes anuales en todo el mundo debido a la exposición a plaguicidas (generalmente por ingesta), localizadas especialmente en países poco desarrollados [5]. Su alcance real es, sin embargo, difícil de evaluar debido a la dificultad de identificar y monitorizar los efectos subletales ocasionados por la exposición a largo plazo a una determinada sustancia activa, así como a los posibles efectos potenciadores, sinérgicos o antagónicos sobre la toxicidad individual en el caso de mezclas [6,7]. Es por esto que la aprobación de nuevos productos fitosanitarios es un proceso complejo: las sustancias activas deben ser aprobadas para su uso por autoridades nacionales y/o internacionales como paso previo a su comercialización, y dicha autorización debe ser renovada periódicamente. En la Unión Europea (UE), las sustancias activas candidatas a ser empleadas como productos de protección de plantas son evaluadas por cada estado miembro, la Comisión Europea (CE) y la *European Food Safety Authority* (EFSA), y deben cumplir los criterios de aprobación y renovación establecidos en el Reglamento (EC) No 1107/2009 [8]. Su uso está además regulado por la Directiva 2009/128/EC, en la que se define un marco jurídico para lograr un uso sostenible de plaguicidas, y por el Reglamento 396/2005, que establece los límites máximos de residuo (LMR) en alimentos de origen animal y vegetal [9,10]. Por otro lado, la Unión Europea establece unas normas para la autorización y uso de productos con actividad biocida, descritas en el Reglamento (EU) 528/2012 [11]. La frecuente revisión y actualización de estas normativas, que en muchos casos tienen en cuenta la toxicidad y persistencia de los plaguicidas, permite controlar y minimizar los efectos de estas sustancias en el medioambiente.

1.1. PROPIEDADES DE LOS PLAGUICIDAS

Las consecuencias de la presencia de un plaguicida sobre los ecosistemas dependen en gran medida de sus propiedades fisicoquímicas y efectos biológicos, que determinan, por un lado, su estabilidad y posible acumulación en matrices orgánicas e inorgánicas y, por otro lado, los efectos que podrá tener sobre los organismos. Dichas propiedades juegan además un papel esencial en la elección de un método de análisis capaz de identificar la sustancia en diferentes tipos de muestras. La mayoría de las propiedades fisicoquímicas de un compuesto pueden medirse bajo condiciones estrictamente controladas y su valor presenta pocas variaciones entre diferentes fuentes. Sin embargo, para la evaluación de las propiedades biológicas y ambientales existe un gran número de variables difíciles de controlar con precisión y pueden encontrarse en literatura valores muy diferentes en función de las condiciones en que se hayan medido [12,13]. En este grupo se incluyen por ejemplo la vida media, la estabilidad en suelo o los efectos de toxicidad, entre otros, que dependen de la temperatura, luz, humedad, matriz o estado del organismo en que se midan. Algunas de las relaciones más extensas de propiedades fisicoquímicas de plaguicidas han sido publicadas por *The Pesticide Manual* o por la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) [2,14]. Entre los descriptores fisicoquímicos más relevantes para evaluar los efectos de un contaminante en el medioambiente se encuentran la solubilidad en agua, el coeficiente de partición octanol-agua, la constante de ionización y la presión de vapor, entre otros; por el contrario, desde un punto de vista medioambiental y toxicológico destacan el periodo de vida media, la dosis letal media y la dosis de referencia aguda.

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas

Solubilidad en agua

La solubilidad en agua define la cantidad máxima de sustancia que puede disolverse en agua, expresada normalmente en mg/L. Determina en gran medida si un plaguicida podrá ser transportado a través de corrientes o flujos de agua. También influye en la velocidad de excreción una vez ha entrado en un organismo: como norma general, los plaguicidas más solubles en agua son más fácilmente excretados y tienen menor tendencia a la bioacumulación. Normalmente, los métodos multirresiduo basados en disolventes orgánicos no son adecuados para compuestos con una gran afinidad por el agua, por lo que se pueden ser necesarias condiciones específicas para su extracción y/o análisis.

Coeficiente de reparto octanol-agua (log K_{ow}, log P)

El coeficiente de reparto octanol-agua, o coeficiente de partición, se define como la proporción de sustancia que, en un sistema bifásico octanol-agua, permanece en la fase orgánica. Este parámetro está

estrechamente ligado con la polaridad de un compuesto: valores elevados del coeficiente de reparto implican baja afinidad por la fase acuosa y, con ello, baja polaridad, y viceversa. De forma similar a la solubilidad en agua, este parámetro está relacionado con la movilidad de un plaguicida a través de sistemas acuosos, así como con su tendencia a la bioacumulación. La Comisión Europea establece los compuestos con un log P comprendido entre 3 y 7 como potencialmente bioacumulables debido a su afinidad por las membranas y tejidos adiposos de los organismos [15]. Los valores de log P superiores a 4 se relacionan con compuestos muy apolares, mientras que las sustancias más polares suelen presentar un log P inferior a 1.5.

Constante de ionización ácido-base (K_a)

Aplicable sólo a plaguicidas iónicos, la constante de ionización ácido-base suele expresarse en forma logarítmica (pK_a = - log K_a) y mide la concentración de la forma ionizada de un compuesto respecto a su forma neutra en medio acuoso. Valores bajos del pK_a o el pK_b se corresponden con ácidos o bases fuertes, respectivamente. Este parámetro está relacionado con la movilidad de los plaguicidas iónicos en suelo ya que, por lo general, los plaguicidas con posibilidad de presentar formas iónicas en condiciones ambientales son más fuertemente retenidos en este tipo de matriz [12].

Presión de vapor y constante de Henry

La presión de vapor mide la presión parcial de un compuesto en fase gaseosa que se encuentra en equilibrio con su fase sólida o líquida. Es un indicador de la volatilidad de un compuesto, lo cual está relacionado con la posibilidad de que se evapore y sea transportado por el aire hasta zonas lejanas de su aplicación. Por otro lado, la constante de Henry es la proporción de un compuesto que se encuentra en el aire respecto a la cantidad que permanece en disolución acuosa. Desde un punto de vista experimental, los procesos de tratamiento de muestra deben realizarse con especial cuidado cuando se va a analizar un plaguicida volátil para evitar pérdidas por evaporación, lo que resultaría en una subestimación de su concentración.

1.1.2. Propiedades medioambientales y toxicológicas

Periodo de vida media ($t_{1/2}$)

El periodo de vida media es el tiempo necesario para que la concentración de un compuesto en un determinado entorno se reduzca a la mitad. En muchos casos, la degradación de los plaguicidas se ajusta a una cinética de reacción de primer orden, definida por la expresión

$$C = C_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

Donde C_0 y C son la concentración inicial y a un tiempo t, respectivamente, y k es una constante expresada en unidades recíprocas a t. Para obtener la vida media de un plaguicida se emplea la ecuación anterior suponiendo que $C = 0.5C$, de modo que $t_{1/2} = \ln 2 \ / \ k$.

Dosis letal media (LD_{50})

La dosis letal media representa la cantidad de sustancia que origina la muerte en la mitad de los organismos de una población. Los valores de LD_{50} pueden calcularse para una exposición oral (cuando el compuesto se incluye en la dieta del organismo) o por contacto (exposición dérmica), y suelen expresarse en masa (LD_{50}) o concentración (LC_{50}) de sustancia. En ocasiones, la toxicidad se representa empleando otros porcentajes de población, como el LD_{10} (dosis que origina la muerte en el 10 % de los individuos).

Dosis de referencia aguda e ingesta diaria admisible

La dosis de referencia aguda (ARfD) es la cantidad máxima de una sustancia que puede ser ingerida en un día por un ser humano sin que ello ocasione un efecto perjudicial en su salud. Se mide en mg/kg·día, de forma que aquellos plaguicidas con un alto ARfD suponen un menor riesgo para la salud humana. De forma similar, la ingesta diaria admisible (ADI) es la cantidad máxima de sustancia que puede ser ingerida diariamente a lo largo de la vida de una persona sin que ello suponga un riesgo apreciable para su salud. Al contrario que el ARfD (que estudia exposiciones puntuales a una sustancia), la ADI describe la exposición a largo plazo a un determinado compuesto.

1.2. PLAGUICIDAS EN EL MEDIOAMBIENTE

Tras la aplicación de un plaguicida, ya sea a pequeña o a gran escala, sus residuos (que incluyen tanto la propia sustancia activa como sus productos de transformación) pueden transferirse, en función de sus propiedades fisicoquímicas, a diferentes matrices medioambientales incluyendo:

- **Aguas superficiales y subterráneas.** El agua puede transportar los residuos hasta lugares alejados de su zona de aplicación, en especial los compuestos más polares [16,17]. La presencia de plaguicidas en el agua afecta asimismo a la fauna y flora de los ecosistemas marinos [18,19].
- **Suelo.** Aunque los plaguicidas con mayor tendencia a acumularse en el suelo suelen ser compuestos ionizables, algunas sustancias con marcado carácter lipofílico han demostrado ser también particularmente persistentes en ciertos tipos de suelo, siendo los plaguicidas organoclorados un grupo representativo. A modo de ejemplo, recientemente se han detectado residuos de DDT en el 80 % de las muestras de suelo en Polonia [20]. Los suelos con alto contenido en materia orgánica presentan una mayor capacidad de adsorber plaguicidas [21].
- **Aire.** Una de las formas de aplicación de plaguicidas más extendidas en agricultura consiste en el uso de pulverizadores que, aunque rápidos y eficaces para tratar grandes superficies, facilitan la dispersión de estos compuestos en el aire. Por otro lado, los plaguicidas pueden volatilizarse independientemente del método de aplicación empleado, pudiendo ser transportados por el aire hasta zonas muy alejadas, incluyendo el Ártico [22–25].
- **Organismos.** El fenómeno más evidente lo constituye el posible daño de herbicidas e insecticidas a plantas o insectos diferentes a los que se quiere controlar (por ejemplo, la aplicación de un insecticida en un cultivo podría afectar a los insectos polinizadores). Sin embargo, los plaguicidas pueden además afectar a organismos de especies e incluso reinos diferentes: el fungicida azoxystrobin presenta una elevada toxicidad para insectos como las abejas, y el insecticida chlorpyrifos es especialmente tóxico para peces y otros organismos acuáticos. Por otro lado, la presencia prolongada de plaguicidas en el suelo puede perjudicar a los microorganismos que viven en él [26,27]. El ser humano es también susceptible de sufrir efectos perjudiciales ocasionados por plaguicidas, y su exposición puede ser incluso mayor que la de otros organismos debido a procesos como la biomagnificación.

La bioacumulación y la biomagnificación son procesos relacionados con la presencia de plaguicidas en el medioambiente que describen sus efectos sobre los organismos. Estos procesos pueden ser crónicos y no ocasionar la muerte directa de los individuos, lo que dificulta la identificación de las posibles fuentes hasta que el problema se encuentra muy extendido en el ecosistema.

Bioacumulación

Ocurre en un único organismo como consecuencia de la exposición prolongada a un contaminante: la concentración de sustancias lipofílicas en los tejidos adiposos aumenta con el tiempo y la edad debido a su dificultad de excreción. En humanos, una pérdida de peso rápida puede ocasionar la liberación de contaminantes hacia el torrente sanguíneo, lo que podría tener un efecto tóxico de carácter agudo en el organismo [28].

Biomagnificación

Ocurre entre organismos de diferentes especies y se refiere a la transferencia de un plaguicida desde niveles tróficos bajos a otros más altos, lo que resulta en un aumento de la concentración del contaminante en organismos que se encuentran en la zona superior de la cadena alimentaria.

Además de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los plaguicidas, el entorno en el que se encuentren (condiciones de luz, temperatura, humedad o tipo de material) juega un papel determinante en sus efectos sobre el medioambiente y los organismos. Estos factores determinan el tipo y la magnitud de los mecanismos de degradación que puede sufrir un compuesto, entre los que destacan la hidrólisis, la fotodegradación, la oxidación y la degradación biológica [29–31], que se producirán con mayor o menor intensidad dependiendo de la estructura química del plaguicida y la presencia de grupos funcionales susceptibles de sufrir estos procesos. La hidrólisis se produce en medios acuosos o húmedos y está influenciada por el pH del medio y el carácter ácido o básico del plaguicida. La fotodegradación puede ocurrir de forma directa –por absorción de fotones que rompen los enlaces de la molécula– o de forma indirecta a través de compuestos que absorben fotones y generan especies reactivas como radicales o peróxidos [32]. Por su parte, los mecanismos más importantes de degradación biológica son aquellos realizados por microorganismos que habitan en el suelo, aunque también tienen lugar en el interior de organismos más complejos como plantas o animales [33]. En general, los productos de transformación de un plaguicida pueden tener propiedades fisicoquímicas muy diferentes a las del precursor, así como distinta toxicidad. A modo de ejemplo, el malaoxon, metabolito del insecticida malathion, ha demostrado poseer una toxicidad significativamente mayor que el precursor en organismos acuáticos [34].

En ocasiones, la presencia de un plaguicida o sus productos de transformación en el medioambiente puede extenderse hasta varios años o décadas después de su aplicación [20]. Así, resulta esencial realizar estudios de monitorización de residuos de plaguicidas que permitan:

a) Comprobar si un ecosistema ha estado expuesto a un cierto contaminante y, con él, los organismos que habitan en la zona.

b) Realizar seguimientos de la aplicación controlada de plaguicidas.

c) Evaluar la posible aparición de resistencias ante una determinada sustancia activa.

d) Identificar las posibles fuentes de contaminación de un ecosistema.

e) Determinar el flujo y la distribución de contaminantes, así como su acumulación en los distintos componentes bióticos y abióticos de un ecosistema.

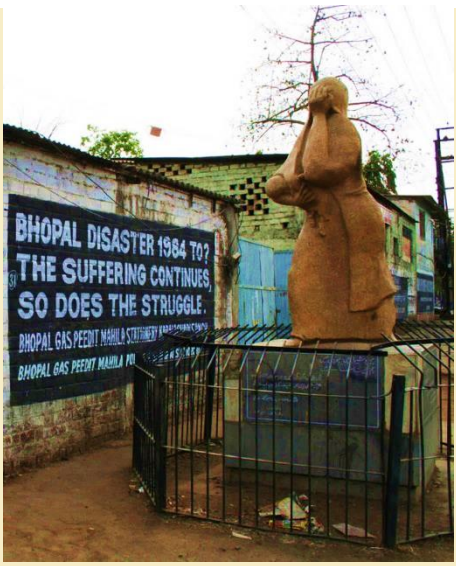
f) Evaluar la degradación o persistencia de un determinado plaguicida y sus productos de transformación en el medioambiente.

g) Analizar si la presencia de plaguicidas está relacionada con la mortalidad en una determinada área, o bien si ocasiona efectos subletales en los organismos.

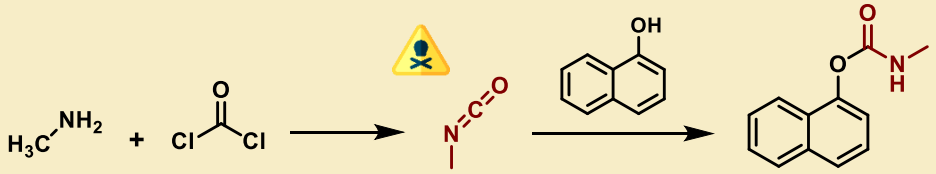
Bhopal, India

Los productos de transformación de los plaguicidas no son los únicos derivados que deben considerarse en la evaluación medioambiental; en ocasiones, los reactivos implicados en su síntesis tienen efectos aún más nocivos en el medio y los organismos.

En la noche del 2 al 3 de diciembre de 1984, una fábrica de la ciudad de Bhopal liberó al aire aproximadamente 40 toneladas de isocianato de metilo gaseoso, generando una nube tóxica que dejó más de 25 000 muertos y medio millón de heridos. La planta, perteneciente a la empresa Union Carbide, se dedicaba a la producción del insecticida carbaryl, en cuya preparación interviene el citado gas. La noche del accidente, un sobrecalentamiento de los tanques que lo contenían provocó una explosión que liberó el gas tóxico, el cual se dispersó rápidamente por la ciudad. Cada 3 de diciembre se celebra el Día Mundial del no Uso de Plaguicidas en conmemoración de las víctimas de la catástrofe.



↑ **Escultura en Bhopal en homenaje a las víctimas**



← **Síntesis de carbaryl**

Un plaguicida que sea particularmente susceptible a la degradación permanecerá menos tiempo en el entorno, pero ello también hace necesario tomar medidas para minimizar su posible degradación durante los procesos de tratamiento de muestra y análisis a fin de evitar falsos negativos. En general, antes de evaluar presencia de un determinado contaminante en un entorno real es necesario realizar estudios preliminares bajo condiciones que simulen la toma y tratamiento de muestra para asegurar que no se está perdiendo información. A través, por ejemplo, de un estudio de recuperación bajo condiciones de campo, se puede confirmar si el plaguicida se degrada en alguna de las etapas del proceso analítico (toma de muestra, almacenamiento y transporte al laboratorio, extracción...). Estas precauciones reducen la incertidumbre de los análisis y proporcionan información más fiable sobre la contaminación real en el momento del muestreo. Por otro lado, cualquier método de análisis de plaguicidas u otros contaminantes debe adaptarse a las singularidades de los analitos incluidos en su alcance, de forma que se empleen las técnicas y condiciones óptimas para su detección [35].

1.3. ANÁLISIS DE PLAGUICIDAS

1.3.1. Técnicas cromatográficas

Una de las principales dificultades asociadas al análisis de plaguicidas mediante métodos multirresiduo radica en la inmensa variedad de propiedades fisicoquímicas que presentan estas sustancias. Estos análisis suelen incluir una gran cantidad de residuos en sus alcances, lo que implica que los métodos analíticos deben tener la capacidad de extraer e identificar simultáneamente numerosos compuestos de diferente naturaleza a la vez que minimicen la presencia de otras sustancias procedentes de la matriz. Para ello resulta esencial contar con un método cromatográfico que permita separar los analitos de dichos componentes de la matriz, como paso previo a su detección e identificación.

En la actualidad, las técnicas cromatográficas de gases (GC) o líquidos (LC) son las más empleadas para el análisis de residuos de plaguicidas en todo el mundo. Estas dos técnicas cromatográficas comparten un principio similar, que consiste en separar mezclas complejas de analitos y componentes de la matriz gracias a su diferente interacción con una fase estacionaria y una fase móvil atendiendo a sus propiedades fisicoquímicas. Sin embargo, la separación en cada una de estas técnicas está regida por una propiedad diferente: mientras que la cromatografía de líquidos separa los analitos atendiendo esencialmente a su polaridad, en cromatografía de gases es la volatilidad la que determina en mayor medida la separación (**Figura 2**). En ambas técnicas existen, además, otras variables que influirán en cómo se separan los analitos y demás componentes de la muestra, como la geometría molecular o la presencia de ciertos grupos funcionales capaces de establecer interacciones específicas con alguna de las fases.

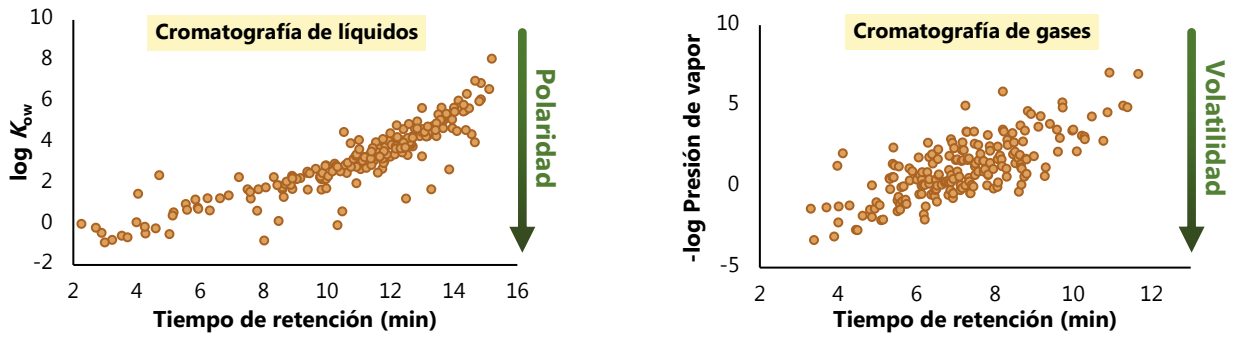


Figura 2. Tiempos de retención en función de la polaridad y la volatilidad en un método de cromatografía de líquidos (219 analitos) y de gases (228 analitos), respectivamente

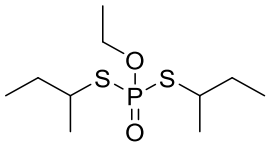
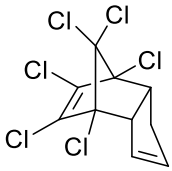
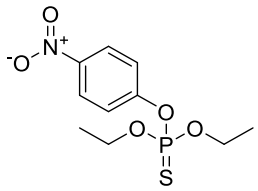
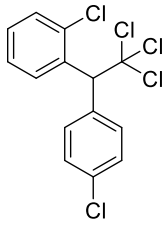
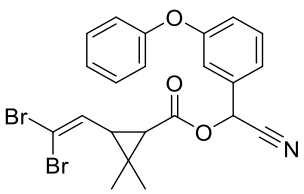
En cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC), la más empleada en la actualidad, la muestra en fase líquida atraviesa una columna empaquetada recubierta con una fase estacionaria apolar (generalmente compuesta por cadenas alifáticas, como las de C18), arrastrada por una fase móvil polar. De este modo, los analitos con mayor polaridad atravesarán la columna en primer lugar debido a las débiles interacciones que establecen con la fase estacionaria, y lo contrario ocurrirá con los compuestos más apolares (**Figura 2**). Para mejorar la separación de un gran número de analitos con propiedades muy diferentes, los métodos multirresiduo incluyen en general un gradiente de polaridad en el que la fase móvil comienza con un elevado contenido en agua, el cual va disminuyendo en favor de un disolvente orgánico de menor polaridad y mayor fuerza eluyente. Esta estrategia permite acortar los tiempos de retención de los analitos más apolares, que de lo contrario presentarían elevados tiempos de retención y picos cromatográficos anchos. De forma general, los compuestos con polaridad media o moderadamente alta (lo cual engloba a un alto porcentaje de plaguicidas) se analizan mediante cromatografía de líquidos. Los plaguicidas más polares o iónicos, por su parte, requieren de condiciones especiales de extracción y de análisis, empleándose en este caso instrumentos de cromatografía iónica o columnas basadas en el principio de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) [36].

Por el contrario, en cromatografía de gases, la fase móvil consiste en un gas portador inerte que arrastra a los analitos, en fase gaseosa, a través de columnas recubiertas en su interior por una fase estacionaria generalmente líquida. De este modo, la separación de los analitos se produce en este caso atendiendo a su volatilidad (**Figura 2**): los compuestos más volátiles eluirán en primer lugar y, a medida que la temperatura del horno cromatográfico aumente en la rampa de temperatura, los analitos menos volátiles se verán asimismo arrastrados hasta el detector. Precisamente por el uso de elevadas temperaturas tanto en el horno como en el inyector (en el cual se produce la volatilización de la muestra), los compuestos termolábiles no son buenos candidatos para la cromatografía de gases y su análisis mediante esta técnica requiere de adaptaciones tales como la derivatización en especies más estables o la inyección directa. Esta última, conocida también como inyección *on-column*, consiste en la inyección de la muestra líquida directamente en la columna y constituye una buena alternativa para evitar la degradación en el inyector de compuestos con baja estabilidad térmica. Un ejemplo de este tipo lo constituyen el captan o el folpet, que presentan por lo general muy baja sensibilidad en condiciones normales de cromatografía de gases debido a su degradación en tetrahydrophthalimide y phthalimide, respectivamente [37]. En general, los compuestos apolares, volátiles y térmicamente estables son buenos candidatos para el análisis mediante cromatografía de gases. Sin embargo, a pesar de que las propiedades de los plaguicidas pueden hacerlos más aptos para el análisis mediante una u otra técnica, en la práctica existe una gran variedad de compuestos que pueden separarse de forma indistinta mediante GC o LC, proporcionando resultados similares.

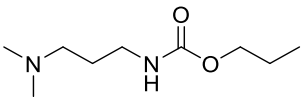
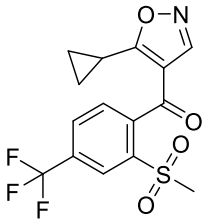
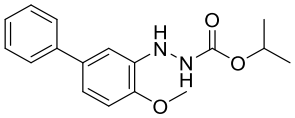
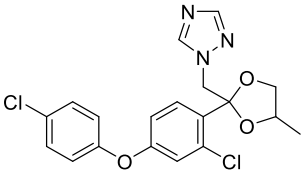
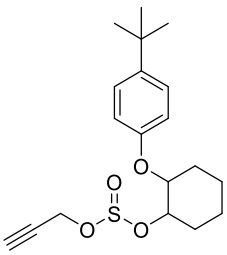
La **Figura 3** muestra la estructura de cinco residuos de plaguicidas que se analizan por cromatografía de gases o de líquidos, dispuestos en función de su orden de elución relativo. En ambos casos, se han escogido compuestos que cubren todo el rango cromatográfico, desde los primeros minutos de cromatograma hasta el final de la elución cromatográfica en un método multirresiduo. Se incluyen asimismo dos de las propiedades que determinan su orden de elución en ambas técnicas: la polaridad (en términos de coeficiente de partición) y la volatilidad (expresada como la presión de vapor en mPa), ambas en escala logarítmica. En cromatografía de gases, puede observarse que la volatilidad va disminuyendo progresivamente a medida que avanza el orden de elución de los compuestos, mientras que no existe una dependencia clara con la polaridad de las moléculas. Por el contrario, en cromatografía de líquidos se puede observar cómo la polaridad está estrechamente relacionada con el orden de elución (los compuestos con menor coeficiente de partición eluyen en primer lugar), mientras que la volatilidad de cada sustancia no parece influir en su comportamiento cromatográfico.

En la **Figura 3** se indica asimismo la clasificación de los plaguicidas mostrados atendiendo a su estructura química: se incluyen las cuatro principales categorías (organofosfatos, organoclorados, carbamatos y piretroides), que representan un alto porcentaje de las sustancias activas que se utilizan o se han utilizado como productos fitosanitarios. Actualmente, existe una tendencia a sustituir algunos de estos grupos, como los organoclorados, debido a su alta estabilidad y persistencia en el medioambiente. Precisamente es dicha resistencia a la degradación, junto a su baja polaridad, la que hace que la mayoría de plaguicidas organoclorados se analicen generalmente mediante cromatografía de gases.

Cromatografía de gases

Compuesto	log P	Presión de vapor (log)
 **Cadusafos** *Organofosfato*	3.85	**2.1**
 **Heptachlor** *Organoclorado*	5.44	**1.7**
 **Parathion** *Organofosfato*	3.83	**-0.1**
 **2,4'-DDT** *Organoclorado*	6.9	**-1.6**
 **Deltamethrin** *Piretroide*	4.6	**-5.0**

Cromatografía de líquidos

Compuesto	log P	Presión de vapor (log)
 **Propamocarb** *Carbamato*	**0.8**	2.9
 **Isoxaflutole** *Oxazol*	**2.3**	-4.5
 **Bifenazate** *Carbazato*	**3.4**	-2.0
 **Difenoconazole** *Triazol*	**4.4**	-4.5
 **Propargite** *Organosulfurado*	**5.7**	-3.4

Orden de elución

Figura 3. Estructura, clasificación y propiedades de cinco plaguicidas incluidos en un método multirresiduo de cromatografía de gases (*izquierda*) o de líquidos (*derecha*)

Nueva instrumentación en cromatografía de gases

Una de las principales limitaciones que presenta la cromatografía de gases en comparación con la cromatografía de líquidos consiste en los mayores tiempos de análisis. Al emplearse una rampa de temperatura en el horno donde se encuentra la columna, es necesario esperar periodos de tiempo más largos que en el caso de la cromatografía de líquidos, donde la rampa de disolventes es instantánea. Los tiempos de análisis típicos en cromatografía de gases oscilan entre los 20 y los 40 minutos, mientras que en cromatografía de líquidos no suelen superar los 15 minutos.

Por otro lado, en cromatografía de gases, la columna cromatográfica suele estar directamente conectada al inyector, de modo que las impurezas menos volátiles de la muestra alcanzan los primeros centímetros de columna y pueden contaminarla. Este hecho provoca alteraciones cromatográficas como aparición de ruido de fondo o cambios en el tiempo de retención de los analitos. Por ello, en GC, es relativamente frecuente tener que cortar el comienzo de la columna cromatográfica, lo que supone:

a) Nuevos cambios en los tiempos de retención (al existir un menor recorrido cromatográfico).

b) Operaciones de mantenimiento más frecuentes, largas y tediosas que en LC.

En 2016, la compañía Agilent Technologies desarrolló un nuevo sistema de cromatografía gaseosa, el Intuvo 9000 GC System, con importantes diferencias respecto a otros cromatógrafos tradicionales. En primer lugar, se eliminó el horno cromatográfico típico de la GC, colocando en su lugar la columna en contacto directo con la superficie de calentamiento. De este modo, la columna adquiere de forma instantánea la misma temperatura que dicha superficie, ya que el calor se transmite por contacto directo y no a través de convección por el aire del horno. Se consiguen de este modo rampas de temperatura mucho más pronunciadas que con otros cromatógrafos de gases, lo que se traduce en tiempos de análisis tanto o más cortos que en cromatografía de líquidos.

El Intuvo presenta, además, un sistema de precolumna similar a los empleados en cromatografía de líquidos: el GuardChip. Se trata de un chip metálico con unas conducciones en su interior que se coloca entre el inyector y la columna, de modo que las impurezas menos volátiles de la muestra quedan retenidas en él en lugar de alcanzar la columna.

1.3.2. Espectrometría de masas

Tras la separación cromatográfica, los analitos llegan a un detector que permite su identificación. En la actualidad existe una gran variedad de técnicas de detección aplicadas al análisis de plaguicidas, siendo la espectrometría de masas (MS) una de las más empleadas gracias a su elevada sensibilidad, selectividad y versatilidad [38]. Esta técnica puede dividirse en dos grandes bloques: espectrometría de masas de baja y alta resolución. En ambos casos, el espectrómetro analiza iones que se encuentran en fase gaseosa; por tanto, para su hibridación con técnicas cromatográficas es necesario emplear las interfaces conocidas como fuentes de ionización, que generan iones a partir de las moléculas neutras que salen del cromatógrafo.

Para el análisis multirresiduo de plaguicidas mediante MS, la forma de ionización más común en la hibridación con cromatografía de líquidos consiste en la ionización por *electrospray* (ESI), en la que se produce la nebulización de las moléculas de la muestra a su paso por un capilar sometido a un potencial eléctrico. En cromatografía de gases, por el contrario, se emplea generalmente ionización por impacto electrónico (EI), en la que un haz de electrones provoca la formación de un catión radical de alta energía que se fragmenta en iones más pequeños debido a la energía residual tras la ionización. La ionización por impacto electrónico es mucho más energética que la ESI, por lo que en este caso no suele ser posible detectar el ion molecular. Existen sin embargo otras técnicas de ionización menos energéticas para la hibridación con cromatografía de gases que sí permiten observar el ion molecular. El ejemplo más representativo es la ionización química (CI), basada en el impacto del analito con una molécula gaseosa, como el metano o el amoníaco, previamente ionizada. En resumen, la EI proporciona una alta sensibilidad (gracias a la intensidad de la ionización) a costa de perder información sobre el ion molecular, mientras que con la CI se consigue la situación contraria.

En la espectrometría de masas de baja resolución destaca principalmente el analizador de triple cuadrupolo (QqQ o QqQ-MS/MS), que es el empleado por un mayor número de laboratorios de análisis en la actualidad. El término "triple cuadrupolo" sigue empleándose a pesar de que, actualmente, el segundo cuadrupolo ha sido sustituido por otros dispositivos más eficientes como los hexapolos. De forma general, en la espectrómetro de masas de triple cuadrupolo tienen lugar tres etapas que permiten la identificación de los analitos presentes en la muestra:

1. Ionización de las moléculas neutras de analito. La naturaleza de la fuente de ionización dependerá del tipo de hibridación del detector –si está acoplado a un cromatógrafo de gases o líquidos– y de los analitos que se analicen. A modo de ejemplo, en la **Figura 4a** se muestran los iones generados del analito boscalid (cuyo análisis puede realizarse mediante LC-QqQ-MS/MS y GC-QqQ-MS/MS) tras su paso por una fuente de *electrospray* y por una fuente de impacto electrónico. A pesar de que la molécula de partida es la misma, con un peso molecular de 342.0 Da, el impacto electrónico produce un ion de tamaño significativamente inferior (140.0 m/z), mientras que en la fuente ESI en modo positivo se genera un ion pseudomolecular (mediante captación de un protón) con m/z 343.0.

2. Filtrado de los iones que presentan relación masa/carga (m/z) correspondientes a los del analito, de forma que se eliminen las interferencias coeluyentes de la muestra. Los iones generados en la fuente atraviesan un primer cuadrupolo en el que se filtran sólo aquéllos con una relación m/z determinada. En el ejemplo mostrado en la **Figura 4a**, este primer cuadrupolo se configuraría para dejar pasar únicamente iones con m/z 343.0 ó 140.0. A continuación, esos iones se vuelven a fragmentar en la celda de colisión (segundo cuadrupolo) y se filtran los iones producto obtenidos (tercer cuadrupolo), permitiendo así la obtención de transiciones entre un ion precursor y un ion producto. A este modo de trabajo se le conoce como monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) o monitorización de reacciones múltiples (MRM), y es el modo de trabajo más selectivo y sensible que puede emplearse en un triple cuadrupolo en estrategias de análisis objetivo. En el caso del boscalid analizado por LC-QqQ-MS/MS, un ejemplo de transición empleada para su identificación es la m/z 343.0 - 307.1, siendo el ion precursor aquel generado en la fuente de ionización, y el ion fragmento procedente de la celda de colisión (y filtrado posteriormente en el tercer cuadrupolo). Por su parte, un ejemplo de transición para este mismo compuesto en GC-QqQ-MS/MS es la m/z 140.0 – 112.0 (**Figura 4a**). Como puede observarse, existe una gran diferencia entre los iones que se analizan en una y otra técnica a pesar de tratarse de un mismo compuesto: en el caso de GC-QqQ-MS/MS, la transición que se analiza es mucho menos sensible, debido a que los iones presentan una menor relación m/z (son más pequeños), por lo que es más probable que coincidan con otras moléculas presentes en la muestra.

3. Detección de los iones a través de un dispositivo capaz de medir la intensidad de la corriente eléctrica generada por el impacto de éstos en su superficie. Los iones del analito son en primer lugar transformados en una corriente eléctrica en el dínodo de conversión, la cual alcanza un multiplicador de electrones que genera la señal analítica.

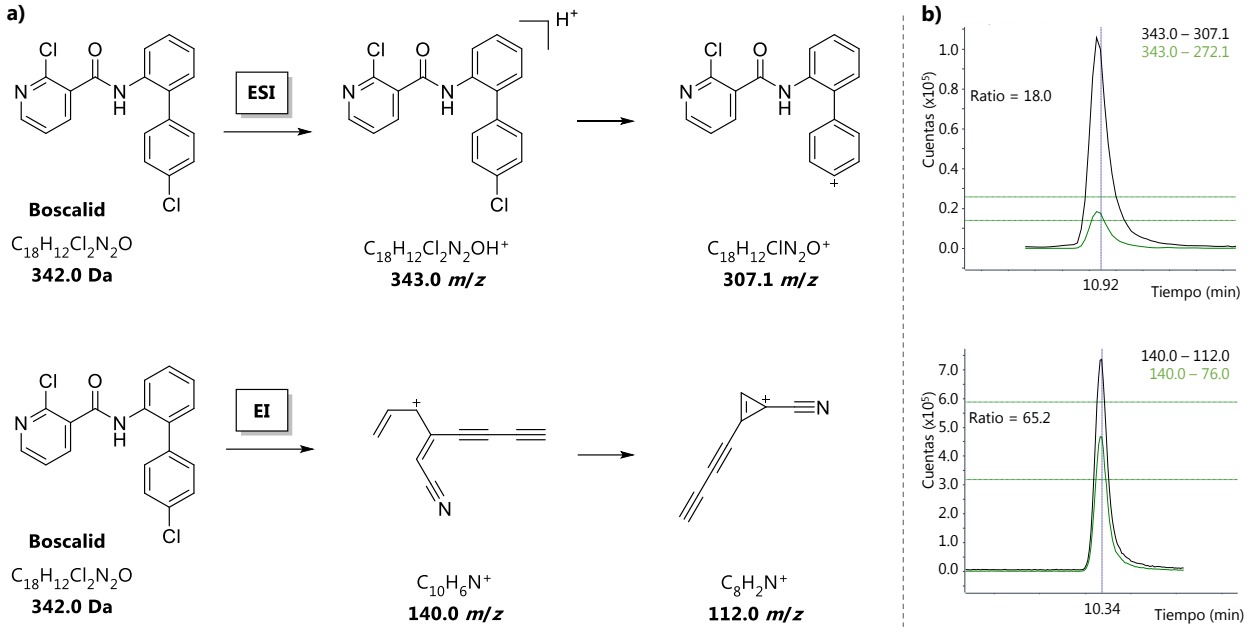


Figura 4. a) Fragmentación del plaguicida boscalid para dar las transiciones 343.0 – 307.1 (LC-MS/MS, fuente ESI) y 140.0 - 112.0 (GC-MS/MS, fuente EI); b) Cromatogramas mostrando la identificación de boscalid en LC-MS/MS *(superior)* y GC-MS/MS *(inferior)* mediante dos transiciones cuya ratio se encuentra en un rango determinado *(líneas discontinuas)*

Según las normas establecidas por la Comisión Europea en el Documento Nº SANTE/11312/2021, los requisitos necesarios para la correcta identificación plaguicidas en muestras mediante espectrometría de masas en tándem incluyen la obtención de dos transiciones cuyas señales cromatográficas deben (a) solapar completamente, (b) tener una relación señal/ruido superior a 3 y (c) tener una respuesta relativa que no difiera en más de un 30 % en términos relativos respecto a la correspondiente al promedio de los estándares de calibración del mismo (**Figura 4b**) [39]. Adicionalmente, debe considerarse el tiempo de retención del compuesto, que no debe variar más de ±0.1 minutos respecto al del estándar analítico.

Al contrario que los instrumentos de baja resolución, la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) permite identificar tentativamente un número de sustancias prácticamente ilimitado a través de métodos de análisis no objetivo (*non-target*). Al proporcionar la masa exacta de los iones detectados (con errores de masa incluso inferiores a 5 partes por millón), se restringe enormemente las posibles fórmulas químicas y se facilita la identificación de los iones. Por otro lado, la existencia de bibliotecas que contienen información espectral de decenas de miles de compuestos permite la comparación de los espectros de masas obtenidos experimentalmente. De este modo, los análisis mediante HRMS no se limitan a la detección de las sustancias previamente optimizadas para su identificación, y permite superar una de las principales limitaciones de los detectores clásicos y de baja resolución, que sólo pueden detectar los analitos previamente incluidos en el alcance de los métodos analíticos (lo que requiere conocer de antemano su tiempo de retención y principales iones o transiciones) [40]. Entre los espectrómetros de masas de alta resolución destacan el analizador de tiempo de vuelo (ToF) y el Orbitrap™.

En el analizador ToF, los iones generados en la fuente son acelerados hacia un tubo de vuelo mediante un pulso eléctrico, separándose medida que lo recorren. Puesto que todos los iones reciben la misma energía cinética, la separación depende sólo de su masa. Por su parte, los instrumentos Orbitrap™ consisten en un electrodo central con forma de huso situado dentro de un electrodo exterior hueco con forma de barril. Los iones se inyectan tangencialmente al espacio vacío entre los electrodos y comienzan a oscilar armónicamente con un periodo proporcional a su m/z, generando una corriente eléctrica que puede medirse.

2. POLINIZADORES, APICULTURA Y PLAGUICIDAS

La polinización consiste en el transporte de polen desde las anteras de una flor hasta el estigma de la misma o de otra diferente. Se trata de un proceso fundamental para los ecosistemas y la biodiversidad, así como para la productividad agrícola, al permitir la producción de semillas necesarias para la reproducción de las plantas. Los vectores transportadores de polen pueden ser de naturaleza biótica (animales) o abiótica (viento o agua, esta última sólo relevante en el caso de plantas acuáticas), siendo el primero mucho más importante: se estima que poco más del 10 % de las plantas terrestres son polinizadas por el viento [41]. Existe un amplísimo rango de animales polinizadores, del cual el grupo más importante es el de los insectos, que comprende el 99.5 % de especies que realizan esta función.

Más del 85 % de las especies vegetales necesitan un animal polinizador para reproducirse y, desde el punto de vista de la agricultura, estos animales permiten un aumento de la productividad en aproximadamente el 75 % de los cultivos de frutas y verduras a nivel mundial [42,43]. Los polinizadores juegan, además, un papel crucial en el mantenimiento de la biodiversidad. Entre los organismos con mayor capacidad de polinización destacan las abejas, y en concreto la abeja melífera (*Apis mellifera*), que han establecido con las flores una intensa relación de mutualismo que se acerca a la simbiosis. Las abejas, por su comportamiento social, son además de las pocas especies animales capaces de transmitir conocimiento sobre rutas y zonas en las que pecorear; esta comunicación se realiza esencialmente a través de bailes ejecutados a la entrada de la colmena, que indican (a través de unos mecanismos que los humanos aún no hemos llegado a comprender) la dirección y distancia de la fuente de recursos [44]. También las feromonas que liberan las diferentes castas de una colonia constituyen una avanzada forma de comunicación entre insectos, al estar implicadas en la reproducción, pecoreo, defensa, orientación e integración en las actividades de la colonia [45].

Animales polinizadores

Aves y mamíferos voladores

En torno a un 10 % de las aves son polinizadores efectivos. El colibrí es el más representativo de este grupo, con una morfología especialmente adaptada para encontrar alimento en las flores, como un pico muy largo y estrecho o la capacidad para permanecer en el aire de forma estática. Existen asimismo unas 230 especies de murciélagos que realizan funciones de polinización; muchas plantas se han adaptado a la polinización por estos animales en un proceso conocido como quiroptelofilia, que incluye floración nocturna y olor intenso para atraerlos, así como pétalos más gruesos para soportar su peso.

Los vertebrados voladores presentan una cualidad particularmente ventajosa en un aspecto clave de la polinización, ya que pueden transportar el polen hasta zonas alejadas de la planta de origen y, de este modo, conectar poblaciones de plantas que se encuentran alejadas entre sí y favorecer el flujo genético y la biodiversidad. Estos animales se ven, además, menos afectados por las condiciones climatológicas que los insectos.

De este modo, las abejas participan activamente en la agricultura, contribuyendo a la producción de aproximadamente un tercio de los alimentos presentes en la dieta humana [46]. Esto se corresponde con un valor económico de más de 11 600 millones de dólares sólo en Estados Unidos en el año 2009, frente a los 3 400 millones de dólares atribuidos a todos los demás insectos polinizadores [47]

En España, en 2018 había 28 786 apicultores registrados, con casi tres millones de colmenas distribuidas por el territorio (un 20 % más que en 2008) [48]. Junto a Grecia, España es el principal productor de miel de la Unión Europea: en 2017 se produjeron 29 393 toneladas de miel y 1519 toneladas de cera, siendo Andalucía el principal contribuidor dentro de España (más del 20 % del total nacional) [48]. Dada la importancia de las actividades apícolas en España, existe un programa nacional cofinanciado por la Unión Europea de ayuda a los apicultores, con una dotación aproximada de 33 millones de euros para el periodo 2020-2022 [48].

Sin embargo, desde principios del siglo XXI se han producido muertes y desapariciones masivas de colonias de abejas en todo el mundo, llegando a afectar hasta al 85 % de las colonias de *Apis mellifera* en algunas zonas [49–51]. Además de la muerte generalizada de estos organismos, se han encontrado colmenas vacías en un fenómeno conocido como Trastorno de Colapso de las Colonias (*Colony Collapse Disorder*, CCD), [51–54]. Estas pérdidas de abejas pueden tener importantes consecuencias tanto para la agricultura (disminución de la productividad y la necesidad de mayores áreas de cultivo) como para la biodiversidad en los ecosistemas naturales [55]. Hoy en día se sabe que el CCD y la muerte de colonias de abejas son problemas multifactoriales cuyo alcance depende de las amenazas externas a las que se ven expuestas las abejas y de la fuerza de la propia colonia para adaptarse a ellas [56]. Las principales causas de pérdida de colonias pueden clasificarse en:

a) Enfermedades e infestaciones de las abejas, siendo la varroasis la que origina un mayor impacto. La presencia de patógenos en las colmenas ha causado numerosas pérdidas de colonias y su control está actualmente recogido en el ordenamiento jurídico español (Real Decreto 608/2006), que establece, entre otros, la obligatoriedad de realizar al menos un tratamiento anual contra el ácaro *varroa destructor* [57]. Sin embargo, los tratamientos contra este parásito no siempre resultan efectivos debido a factores como una penetración limitada en toda la colmena, la aparición de resistencias frente a los principales acaricidas o las reinfestaciones, lo que resultó en la detección de este ácaro en un 86 % de los apiarios españoles en 2016 [48].

b) Pérdida y degradación de hábitats por el cambio climático y/o la explotación humana, incluyendo aumentos de temperatura, largos períodos de sequía y reducción de biodiversidad, entre otros.

c) Presencia de especies invasoras como la avispa asiática (*Vespa velutina*) o el abejaruco (*Merops apiaster*), ambos depredadores de *Apis mellifera* [58,59].

Insectos

Gracias a su reducido tamaño, los insectos son los animales más apropiados para interactuar con las flores porque, literalmente, encajan en ellas. La mayor parte de los insectos, incluyendo abejas, mariposas, polillas, escarabajos, hormigas, avispas, abejorros e incluso algunos tipos de moscas realizan funciones de polinización.

Mamíferos no voladores

Entre las aproximadamente 100 especies de mamíferos no voladores relacionadas con procesos de polinización se encuentran algunos marsupiales, roedores, primates o musarañas cuya dieta incluye néctar, aunque su función polinizadora sólo es relevante en zonas en las que la presencia de aves o insectos es limitada [41]. Sorprendentemente, los humanos también participan de forma activa en los procesos de polinización en ciertas partes del mundo: en algunas zonas rurales de China ricas en plantaciones de perales se realiza una polinización manual desde la década de 1980, cuando el uso indiscriminado de insecticidas produjo la desaparición de polinizadores salvajes [60].

d) Exposición a residuos de plaguicidas y otros contaminantes. A modo de ejemplo, la pérdida de colonias se vio tremendamente intensificada con la introducción en el mercado, hace unas décadas, de un nuevo tipo de plaguicidas denominados "neonicotinoides", que presentan una elevada toxicidad para las abejas [61]. La presencia de plaguicidas y otros contaminantes en las colmenas puede asimismo suponer un importante riesgo para su salud y desarrollo debido a efectos subletales y/o al incremento de toxicidad ocasionado por la exposición simultánea a diferentes sustancias [62,63].

Dada la demostrada influencia del uso de plaguicidas en la salud de las colonias, desde hace años se realizan en todo el mundo extensas campañas de seguimiento y control de la presencia de plaguicidas tanto en colmenas activas como despobladas. Uno de los objetivos principales de estas monitorizaciones consiste en la identificación de los plaguicidas que tienen un mayor impacto en estos insectos, con el fin de determinar la necesidad de encontrar productos fitosanitarios alternativos. Para ello se han realizado, además, numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* que analizan la presencia y toxicidad de diferentes tipos de plaguicidas en abejas tanto adultas como en estado larvario [64–66]. Estas y otras campañas demuestran la presencia de múltiples residuos de plaguicidas en las colmenas y su relación con efectos letales y subletales en las abejas melíferas [63,64,66,67]. Sin embargo, la controversia sobre el uso de ciertas clases de plaguicidas persiste: los neonicotinoides, por ejemplo, han sido prohibidos en la Unión Europea (salvo autorizaciones de emergencia puntuales), pero siguen utilizándose en Estados Unidos, América Latina, Australia o China [68].

Evaluación de riesgos asociados a la presencia de plaguicidas

Evaluar las implicaciones reales de la presencia de plaguicidas en una colmena es una tarea tremendamente complicada que requiere conocer, por un lado, la toxicidad y efectos del contaminante sobre la salud de las abejas y, por otro, la exposición real de las abejas y su dinámica poblacional. La necesidad de estandarizar todos los datos necesarios, además de la enorme variabilidad existente entre unas colonias y otras o incluso en una misma colonia a lo largo del tiempo dificultan aún más la evaluación de riesgos y la obtención de resultados estadísticamente válidos [69].

Factores que influyen en la exposición de la colmena a plaguicidas, su impacto y la recuperación de la colonia [70]

Entorno de la colmena

- Proporción de área dedicada a agricultura
- Tipo de cultivo
- Correspondencia entre periodo de aplicación de los plaguicidas, periodo de floración y periodo de máxima actividad de pecoreo
- Disponibilidad de agua (expuesta a plaguicidas) en el campo de cultivo

Biología de las abejas

- Rango y frecuencia del pecoreo
- Número de especies vegetales visitadas
- Cantidad de polen y néctar recolectado
- Cantidad de polen y néctar consumido a diario
- Peso de la abeja
- Tasa metabólica

Uso de plaguicidas

- Naturaleza de las sustancias activas y sus derivados
- Tipo de formulación
- Modo y frecuencia de aplicación
- Toxicidad oral y de contacto (abejas adultas y cría)

Dinámica poblacional de la colonia

- Porcentaje de polen y néctar compartido con la colonia
- Tamaño de la colmena (número de individuos)
- Tasa de crecimiento poblacional (tiempo de desarrollo de la reina, cantidad de crías producidas y número de generaciones anuales)

Pero la monitorización de la presencia de plaguicidas en colmenas de abejas no tiene como único objetivo comprender las causas del declive de sus poblaciones. Las campañas de seguimiento también han demostrado que las abejas pueden considerarse centinelas ambientales que proporcionan información precisa y detallada sobre la presencia de contaminantes en el medioambiente y los ecosistemas, idea ya sugerida en la década de 1970 [71–73]. La capacidad de las abejas para volar distancias de hasta 10 kilómetros desde sus colmenas y llevar a éstas los alimentos que encuentran hace que una sola colonia pueda acumular información sobre una gran extensión de terreno a su alrededor, lo que simplifica los muestreos ambientales [74]. En este sentido, el polen es una de las matrices apícolas de mayor utilidad para las monitorizaciones gracias al elevado contenido en plaguicidas que puede acumular debido a su exposición directa a estos contaminantes (**Figura 5**).

Los contaminantes introducidos en las colmenas se acumulan en las diferentes matrices presentes en ésta en función de sus propiedades fisicoquímicas. Esto implica que una sola colmena con abejas activas puede utilizarse para la evaluación de la contaminación ambiental en una zona muy amplia alrededor de la misma y de un amplio abanico de contaminantes. Además de los estudios de plaguicidas, que se discutirán a continuación, se han utilizado colmenas de *Apis mellifera* para determinar la presencia de metales pesados [75], bifenilos policlorados (PCBs) [76], hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [77], radioisótopos [73], materia particulada (PM) [78] e incluso microplásticos [79].

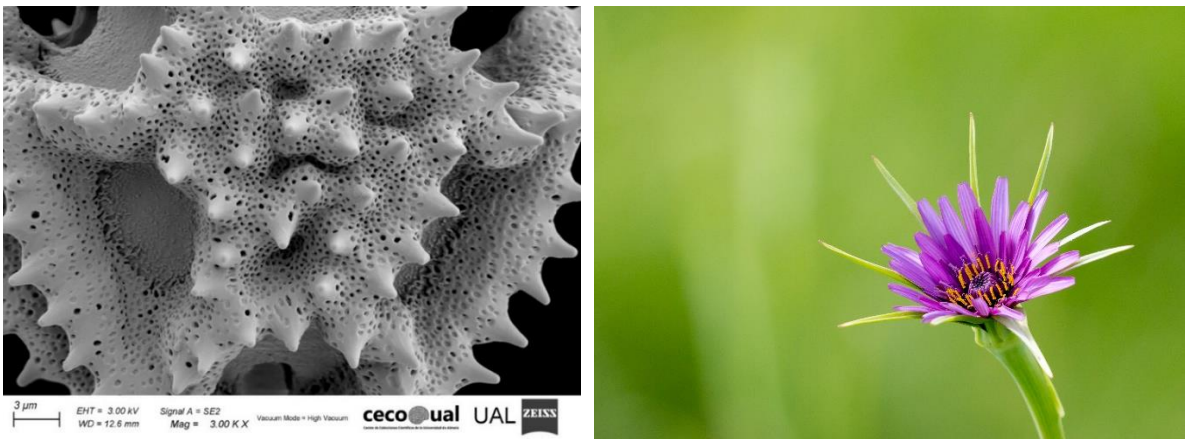
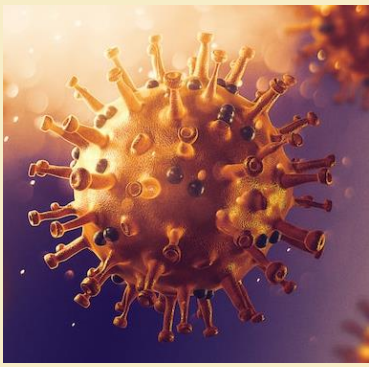


Figura 5. ***Izquierda:*** **fotografía de un grano de polen de la especie** ***Tragopogon porrifolius L.*** **(comúnmente polinizada por abejas melíferas), adquirida mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo; cedida por Marina del Álamo Montes (Centro de Colecciones de la Universidad de Almería).** ***Derecha:*** **flor de** ***Tragopogon porrifolius L.***

El uso de colmenas para la monitorización ambiental no se limita a los contaminantes químicos; las abejas y el polen que recolectan pueden emplearse también para la identificación de virus y otros patógenos que afectan a los cultivos cercanos [80]. Ya que las abejas recogen polen de diferentes zonas y lo reúnen en una misma colonia, el análisis de matrices apícolas en busca de patógenos constituye una alternativa más sencilla y viable que los métodos tradicionales de muestreo, en los cuales se recolectan manualmente partes de las plantas susceptibles de infectarse. En este campo, la proliferación de bacterias resistentes a antibióticos es un asunto que causa gran preocupación en términos de salud pública, y cuya extensión puede evaluarse mediante colmenas de abejas a través del análisis de su ADN o el de sus microorganismos asociados [81].

Abejas y Coronavirus



La monitorización ambiental a través de colmenas de abeja melífera ha encontrado utilidad incluso en la pandemia de COVID-19. En la primavera de 2021, cuando buena parte de Europa estaba sumergida en la tercera ola de esta enfermedad, Cilia *et al.* utilizaron colonias de abejas para monitorizar la presencia de genes de SARS-CoV-2 en la materia particulada del aire [82].

Por último, el análisis de matrices apícolas cumple una tercera función. La mayoría de los productos apícolas, como la miel, la cera, el polen o el propóleo son empleados habitualmente por el ser humano como alimentos, tratamientos farmacéuticos o materiales diversos, gracias a sus propiedades nutricionales (fuentes de azúcares y vitaminas), farmacológicas (antivíricas o antioxidantes) y físicas (aislantes e impermeabilizantes). Por ello, su contaminación con residuos de plaguicidas podría tener un impacto directo sobre la salud humana, lo que hace necesario establecer estrictas medidas de control sobre estas matrices. Su contaminación con productos veterinarios, empleados por los apicultores para la protección de las abejas, está regulada por límites máximos de residuos en muchas partes del mundo, y recientemente se han comenzado a establecer LMR para plaguicidas de uso fitosanitario en la miel y otros productos apícolas de interés humano [83].

2.1. MONITORIZACIÓN DE PLAGUICIDAS EN MATRICES APÍCOLAS

Esta sección describe las principales detecciones de residuos de plaguicidas a través de programas de monitorización en muestras apícolas durante el período 2011-2022, con el objetivo de evaluar y comparar los principales hallazgos en las matrices apícolas más comúnmente analizadas, así como identificar los plaguicidas más empleados en todo el mundo durante los últimos años. Con este fin, se ha seleccionado un total de 50 trabajos representativos relativos al análisis de matrices apícolas en 19 países de África (Egipto, Etiopía, Israel, Kenia, Uganda), América (Brasil, Canadá, Estados Unidos, Uruguay), Asia (China, India) y Europa (Alemania, Bélgica, España, Estonia, Francia, Grecia, Hungría, Italia, Polonia, Rumanía, Suiza). En la **Tabla 1** se resumen las técnicas de detección, el alcance, las detecciones y las matrices analizadas por estas publicaciones.

Tabla 1. Características principales de 50 programas de monitorización de plaguicidas en colmenas de abejas

Año	Ubicación	Técnica de detección	Alcance (nº plaguicidas)	Plaguicidas detectados	Matrices analizadas[a]						Ref
					A	P	M	C	PA	FP	
2022	Suiza	LC-MS/MS	21	17				■			[84]
2022	Hungría, Rumanía	LC-MS/MS	247	12		■					[85]
2021	EE. UU.	LC-MS/MS, GC-MS	218	120		■					[86]
2021	China	GC-MS	60	40		■	■		■		[87]
2021	Alemania	LC-MS/MS	262	29		■					[88]
2020	Estonia	LC-MS/MS, GC-MS/MS	47	17	*	■	■		■		[89]
2020	Bélgica	LC-MS/MS, GC-MS/MS	294	54				■			[90]
2019	Israel	LC-MS/MS, GC-MS/MS	618	13			■	■			[91]
2019	España	LC-MS/MS, GC-MS/MS	322	40	■		■	■	■		[92]
2019	España	LC-MS/MS	10	6	■	■					[93]
2019	EE. UU.	LC-MS/MS	NE	91		■		■			[94]
2018	España	LC-MS/MS	63	15	■	■		■			[95]
2018	Francia	LC-MS/MS	13	13	■			■	■		[96]
2018	España	LC-MS/MS, GC-MS/MS	260	30	■						[97]
2018	Polonia	LC-MS/MS, GC-MS/MS	55	47	■		■				[98]
2018	Italia	LC-MS/MS	66	18		■					[99]
2018	Alemania	LC-MS/MS, GC-MS/MS	282	73		■					[100]
2018	Italia	LC-MS, GC-MS/MS	247	41				■			[101]
2018	India	GC-μECD, GC-MS	24	9			■				[102]
2017	Uganda	LC-MS/MS, GC-ECD	36	20	■		■	■			[103]
2017	España	GC-MS/MS	160	32						■	[104]
2017	España	GC-ToF-MS	No objetivo	18	■	■					[105]
2017	Uruguay	LC-MS/MS, GC-MS	30	8				■			[106]

Tabla 1. Características principales de 50 programas de monitorización de plaguicidas en colmenas de abejas *(cont.)*

Año	Ubicación	Técnica de detección	Alcance (nº plaguicidas)	Plaguicidas detectados	Matrices analizadas[a]						Ref
					A	P	M	C	PA	FP	
2017	Polonia	LC-MS/MS	52	16	■						[107]
2017	Polonia	LC-MS/MS, GC-MS/MS	200	48	■						[108]
2017	Etiopía	GC-MS/MS	20	5			■				[109]
2017	España	LC-MS/MS	58	16				■			[110]
2016	Brasil	GC-MS	26	8		■					[111]
2016	Canadá	LC-MS/MS	NE	11	■	■	■				[112]
2016	España	LC-MS/MS	120	31						■	[113]
2016	Polonia	LC-MS/MS, GC-MS/MS	200	57	■						[114]
2016	Kenia	LC-MS/MS	102	36		■	■				[115]
2016	Italia	LC-MS, GC-ECD	128	34	■			■	■		[116]
2015	Egipto	GC-μECD	18	14			■				[117]
2015	Uruguay	LC-MS/MS	19	12	■	■	■	■			[118]
2015	España	LC-MS/MS, GC-MS/MS	253	46		■					[119]
2015	Egipto	LC-MS/MS	14	10	■	■	■				[120]
2015	EE. UU.	GC-MS/MS	11	10	■	■		■			[121]
2015	Bélgica	LC-MS/MS, GC-MS/MS	300	18				■			[122]
2014	Italia	GC-MS/MS	28	12			■				[123]
2014	Bélgica	LC-MS/MS, GC-MS	99	23			■	■	■		[53]
2014	Polonia	LC-MS/MS	19	19	■						[124]
2014	Grecia	LC-MS/MS	115	14	■	■	■				[125]
2013	Francia	GC-ToF-MS	80	37	■	■	■				[126]
2013	Francia	LC-MS/MS	13	7					■		[127]
2013	Polonia	GC-NPD-ECD	153	17	■						[128]
2013	EE. UU.	LC-MS/MS	NE	60		■					[129]
2013	España	LC-MS	7	3				■			[130]
2011	Francia	LC-MS/MS, GC-MS/MS	44	37	■	■	■	■			[131]
2011	Francia	LC-MS/MS, GC-ToF-MS	80	36	■	■	■				[132]

[a] A = abejas melíferas; P = polen; M = miel; C = cera; PA = pan de abeja; FP = fragmento de panal (incluyendo cera, miel, polen y/o larvas de abeja)

NE = No especificado

*Adultas y en estado larvario

2.1.1. Matrices apícolas

En la **Figura 6** se muestran las matrices apícolas más comúnmente analizadas en estos estudios de monitorización de plaguicidas: polen, cera, miel y la propia abeja melífera, todas ellas incluidas en al menos 18 de los 50 trabajos incluidos en la **Tabla 1**. El mayor número de muestras correspondió al polen (4156 muestras), en parte debido a la inclusión de esta matriz en estudios de seguimiento a gran escala como los realizados por Traynor *et al*. y Xiao *et al.*, con 1055 y 465 muestras de polen analizadas, respectivamente [86,87]. Por el contrario, el análisis de pan de abeja se encuentra comparativamente menos extendido, con sólo siete estudios describiendo su análisis (1473 muestras).

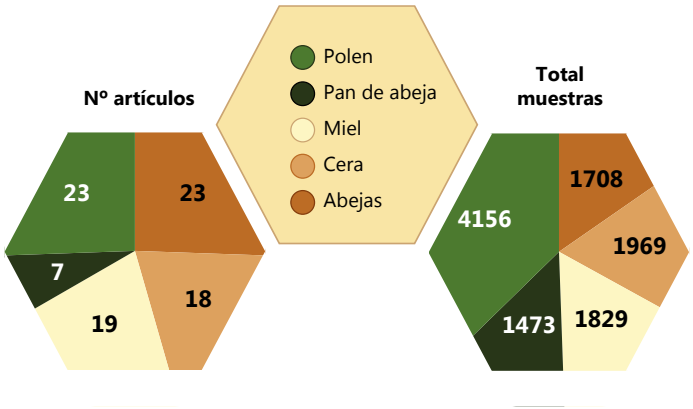


Figura 6. Distribución de las matrices analizadas en los 50 estudios incluidos en la Tabla 1

En algunos estudios se han evaluado matrices apícolas alternativas a fin de determinar sus posibles aplicaciones en programas de monitorización. A modo de ejemplo, el propóleo es otro producto apícola que, debido a su composición, requiere procesos de tratamiento de muestra relativamente complejos y su análisis es por tanto menos común. Algunos estudios centrados en esta matriz han detectado, sin embargo, altos niveles de plaguicidas incluso en productos procesados de venta al público como caramelos de propóleo [133,134].

Por otro lado, los fragmentos de panal, definidos como una pieza entera de la colmena que incluye una mezcla de cera, abejas melíferas (adultas y/o en estado larvario), miel y pan de abeja, se han empleado para determinar la presencia de plaguicidas en las colmenas, detectando diferentes contaminantes con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas [104,113]. El análisis de esta matriz presenta, sin embargo, dos importantes limitaciones:

- Se consume una enorme cantidad de recursos de la colonia, lo que tiene un importante efecto sobre las abejas.
- Al ser una matriz compuesta a su vez por otros componentes de propiedades muy diferentes, los contaminantes que se detecten en cada muestra dependerán en gran medida de la composición específica del fragmento.

Por último, el néctar también puede emplearse en monitorizaciones ambientales, pero se trata de una matriz con un elevado número de componentes que interfieren en los análisis, por lo que su muestreo no está muy extendido y sólo se realizó en uno de los 50 artículos recogidos en la **Tabla 1** [87].

Definición de las matrices apícolas

Uno de los problemas asociados al análisis de matrices apícolas consiste en la definición exacta de las mismas. El polen, por ejemplo, puede recogerse a la entrada de la colmena mediante el uso de trampas de polen, de modo que no habría estado en contacto con cera o miel ni con los contaminantes presentes en ellas. Este tipo de matriz, denominada "polen corbicular", tiene una composición diferente al polen recogido directamente del panal, pues éste ha estado en contacto con otros contaminantes presentes en la miel y la cera, incluyendo productos veterinarios empleados por los apicultores [89,92,135]. Sin embargo, el término "polen" se utiliza indistintamente, independientemente de su origen, lo que podría dar lugar a interpretaciones erróneas relativas a la carga de determinados plaguicidas en esta matriz. Por ejemplo, un estudio realizado por Calatayud *et al.* identificó el varroacida coumaphos en casi el 90 % de las muestras de polen recientemente almacenadas, con una concentración media de 56 μg/kg [95]. El coumaphos se aplica directamente a las colmenas y, por tanto, no se espera que se detecte a altas concentraciones en muestras de polen corbicular, pero sí es de esperar encontrarlo en polen que ya haya sido almacenado en las colmenas, como en el caso de este estudio. Por el contrario, otro trabajo del mismo año realizado en Estados Unidos, analizó muestras de polen corbicular (tomadas con una trampa de polen a la entrada de las colmenas) y de cera: aunque el 89 % de las muestras de cera contenían coumaphos en una concentración elevada (promedio de 89.7 μg/kg), menos del 19 % de las muestras de polen contenían coumaphos, que además presentaba una baja concentración media (10 μg/kg) [94]. Esta cuestión es aún más compleja si se considera el pan de

abeja: aunque se define como una mezcla de polen almacenado y mezclado con miel y otros componentes, y por lo tanto con una composición diferente, estos términos se utilizan indistintamente en algunos trabajos, lo que provoca una confusión del polen con el pan de abeja y viceversa. Esto también podría explicar el reducido número de artículos que mencionan los análisis del pan de abeja, mientras la mayoría menciona simplemente análisis de polen almacenado en las colmenas.

El polen no es la única matriz afectada por una definición ambigua. El análisis de abejas melíferas también puede proporcionar resultados diferentes según distintos factores de los organismos muestreados: edad, función en la colonia (zánganos, obreras, nodrizas, recolectoras...) y estado de salud. Este último punto es el único que está, por lo general, bien definido en los trabajos publicados, que indican claramente si las abejas melíferas estaban sanas, enfermas o muertas en el momento del muestro. En 2017, Kiljanek *et al*. publicaron una comparación entre la carga de plaguicidas en abejas melíferas vivas y envenenadas, y mostraron diferencias muy llamativas en la exposición a contaminantes de ambos grupos: hasta el 85 % de las muestras de abejas melíferas envenenadas contenían dos o más residuos de plaguicidas, frente a sólo un 24 % de abejas melíferas vivas con múltiples detecciones [108]. Sin embargo, los demás factores relacionados con las abejas pueden influir también en los hallazgos detectados; una abeja recolectora habrá estado en contacto con más plaguicidas empleados en agricultura, mientras que una abeja que no salga habitualmente de la colmena contendrá mayoritariamente productos veterinarios. Las larvas, por su parte, también están expuestas a plaguicidas a través de la dieta o del contacto directo con matrices contaminadas; sin embargo, los estudios de monitorización que incluyen larvas de abeja son hasta el momento muy escasos, lo que dificulta la evaluación del impacto real de los plaguicidas en su desarrollo.

Existen también varios tipos de cera en función de cuánto tiempo lleve producida, desde la cera recién producida por las abejas (los llamados *cappings*) hasta las ceras recicladas por los apicultores y empleadas en campañas apícolas posteriores. Varios trabajos han puesto de manifiesto las diferencias en la carga de plaguicidas –en términos de diversidad y concentración– entre estas matrices, siendo la más alta en la cera de abejas reciclada y la más baja en las *cappings* [90,106]. Se han propuesto diferentes métodos para purificar la cera de abejas [106,136] y recientemente se ha concedido una patente con este fin [137], pero en la mayoría de los casos no se logra una limpieza completa de este material. En general, las ceras recicladas contienen residuos de contaminantes, principalmente apolares, que pueden estar presentes a altas concentraciones incluso después de los procesos de lavado [136].

Teniendo en cuenta las diferencias que surgen del análisis de diferentes matrices, aun si comparten el mismo nombre, es crucial asegurar una definición específica de cada una incluyendo los detalles experimentales de cómo se realizó el muestreo. Sin embargo, en la actualidad la mayoría de los autores no especifican las condiciones del muestreo ni el origen concreto de las muestras, lo que dificulta la estandarización de los resultados obtenidos por diferentes grupos.

2.1.2. Tratamiento de muestra

Cada una de las matrices apícolas tiene una composición química diferente con diversas cantidades de componentes de muy diferente polaridad [83]. La miel es una sustancia con marcado carácter hidrofílico, con hasta un 100 % de componentes polares como agua y glúcidos, mientras que la cera es lipofílica, sin contenido en sustancias polares y en torno a un 80 % de lípidos. Por su parte, el polen contiene proteínas, glúcidos y lípidos, de forma similar al pan de abeja, pero en diferente proporción ya que éste se encuentra mezclado con otras sustancias. Las abejas presentan asimismo una mezcla compleja de constituyentes, al igual que el propóleo. Este último es menos común en las monitorizaciones debido al gran número de componentes que dificultan el análisis: en muchas ocasiones es necesario realizar etapas previas o de purificación específicas (como su disolución en etanol, que implica la pérdida total o parcial de plaguicidas solubles en este disolvente) para eliminar algunos de sus componentes [138].

Las grandes diferencias en la naturaleza química de las matrices apícolas hacen necesaria la existencia de distintas estrategias de tratamiento de muestra para cada una, además de afectar al tipo de analitos que se espera encontrar predominantemente: contaminantes más polares se acumularán de forma predominante en matrices hidrofílicas, y viceversa. Sin embargo, la mayor parte de las estrategias de tratamiento de muestra se

basan actualmente en el método QuEChERS citrato (siglas de su nombre en inglés, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) [139]. Éste es el más empleado en la actualidad para el análisis de plaguicidas en diferentes muestras de muy distinta naturaleza.

En su forma original, el método QuEChERS citrato incluye la adición de acetonitrilo a las muestras como disolvente de extracción, seguido por sales de sulfato de magnesio (para eliminar el agua de las muestras), cloruro sódico (para favorecer la separación de fase orgánica y acuosa, además de aumentar la fuerza iónica de esta última), citrato de sodio dihidrato y citrato de sodio sesquihidrato (como tampón de pH). Tras una agitación y centrifugación de las muestras, los extractos se someten a un proceso de limpieza (o *clean-up*) basado en extracción dispersiva en fase sólida (dSPE) en el que se emplean sales como sulfato de magnesio junto a amina primaria-secundaria sobre sílice (PSA), esta última para eliminar los ácidos presentes en la muestra. Tras una nueva centrifugación, el sobrenadante se acidifica para neutralizar el efecto básico del PSA. En el análisis de plaguicidas en matrices apícolas se incluyen por lo general algunas modificaciones para adaptar el método QuEChERS citrato tradicional a las particularidades de cada matriz. En la página siguiente se detallan algunas de las principales adaptaciones realizadas por los autores de los trabajos incluidos en la **Tabla 1** para el tratamiento de estas matrices.

La existencia de estos diferentes enfoques para la extracción de estas muestras podría afectar a los resultados obtenidos. A modo de ejemplo, el uso de un disolvente (o mezcla de disolventes) con baja polaridad favorecerá la extracción de contaminantes apolares, especialmente en muestras como la cera, pero esto también provocará la coextracción de un elevado número de componentes de la matriz (a la vez que se dificulta la extracción de los analitos más polares). Por otro lado, el uso de PSA durante la etapa de limpieza requiere de una neutralización final del extracto para evitar la degradación de los plaguicidas susceptibles al pH básico de dicho agente, algo que sólo fue tenido en cuenta por un pequeño porcentaje de autores.

Principales adaptaciones de los métodos de extracción empleados para el análisis de matrices apícolas

Pretratamiento	Las muestras de cera son sometidas en ocasiones una etapa previa de **fundido** para asegurar su homogeneidad y facilitar su manipulación: hasta en 11 de los 18 trabajos que analizaron muestras de cera se sometió a ésta a una alta temperatura (generalmente 80 ºC) como paso previo a la extracción, lo que supone en torno al **60 %** de los estudios [94]. De éstos, cinco utilizaban la fusión como estrategia de extracción, realizando cuatro fusiones consecutivas en presencia de acetonitrilo [95]. Otra adaptación consiste en la **hidratación** previa de las muestras para facilitar la extracción de plaguicidas: se añadió agua a al menos un **84 %** de muestras de abejas, polen, miel y pan de abeja (100 % de las muestras en el caso de este último) [87]. La cera constituye una excepción a esta tendencia: sólo un 44 % de los trabajos que incluyen esta matriz describieron su hidratación previa, posiblemente debido a su marcado carácter lipofílico (el agua no debería, en principio, favorecer la extracción de los compuestos retenidos) [90].
Disolvente	El **acetonitrilo** es el disolvente más común para el tratamiento de muestras apícolas, con un **88 %** de autores escogiéndolo independientemente de la matriz a analizar. Por el contrario, siete autores emplearon acetona, hexano, acetato de etilo o metanol [53,100,130]. Entre un 26 y un 28 % de los trabajos mencionan, por otro lado, la **acidificación** del disolvente de extracción y/o el uso de disolventes adicionales como hexano o diclorometano, ya sea durante la extracción o como procedimiento adicional de limpieza [86,96].
Sales de extracción	El **sulfato de magnesio** está presente en aproximadamente el **70 %** de los trabajos junto al resto de sales del método QuEChERS citrato, o bien con un tampón basado en acetato de sodio. Sin embargo, en hasta un 20 % de los trabajos se realizaron extracciones sin ningún tipo de sal previa a la etapa de *clean-up* [106].
Agitación	La agitación de la muestra se realiza en prácticamente todos los casos de forma manual o automática, con apenas un **10 %** (5 trabajos) utilizando **ultrasonidos**, generalmente para el análisis de abejas [123].
Sales de *clean-up*	La **dSPE** es la técnica más popular para la limpieza de extractos apícolas: cuatro de cada cinco autores escogieron este método frente a la extracción en fase sólida (SPE) convencional. En lo referente a las sales para el *clean-up*, existe una gran homogeneidad en torno al uso de **sulfato de magnesio** (**66 %**) en combinación con **PSA** (**83 %**), aunque en más de la mitad de los casos se emplea **C18** en combinación con al menos una de las anteriores. Entre las demás sales de *clean-up* empleadas con una cierta frecuencia se encuentran el carbón negro grafitizado (GCB) y el Z-Sep, empleados en siete ocasiones cada uno, o la tierra de diatomeas (5 aplicaciones). Menos comunes son el cloruro de calcio, la alúmina, el EMR-Lipid o el florisil, con menos de cuatro menciones en la literatura revisada.
Acidificación del extracto	De los 77 procedimientos que incluyeron PSA durante la etapa de *clean-up*, sólo 18 (**23 %**) acidificaron el extracto final para **neutralizar** esta base [90]. En todos estos casos se empleó ácido fórmico o acético.
Filtrado	Aproximadamente un **34 %** de los procedimientos descritos incluyeron una etapa final de **filtrado** del extracto, en especial para muestras de abejas o polen [87].

2.1.3. Métodos de análisis

La técnica de detección más común hasta la fecha es espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo, empleada en hasta un 84 % de los trabajos incluidos en la **Tabla 1** (96 % si se consideran también los espectrómetros de cuadrupolo sencillo o los de alta resolución). Sin embargo, las técnicas espectrométricas de baja resolución sólo pueden abarcar los analitos objetivo, por lo que se pierden todos los compuestos no incluidos previamente en el método de análisis pero potencialmente presentes en las muestras. Este hecho puede impedir la obtención de una imagen completa de los contaminantes presentes en una cierta zona y su comparación con otras áreas, ya que los métodos empleados por diferentes equipos de investigación tendrán un alcance distinto. En otras palabras, la no detección de un determinado plaguicida en un estudio no tiene por qué implicar que no se encuentre en las muestras: es posible que su presencia no fuera analizada por el método analítico empleado. Por otro lado, el reciente desarrollo de las técnicas de HRMS ha permitido la publicación de algunos trabajos en los que se utilizan métodos no objetivo en el análisis de muestras apícolas para el análisis de compuestos desconocidos o no incluidos en los métodos multirresiduo [105,126,132].

Los trabajos que emplean una combinación de cromatografía de gases y líquidos pueden lograr alcances más amplios, mientras que los que se centran en un solo instrumento cromatográfico podrían pasar por alto algunos tipos de familias químicas –por ejemplo, los piretroides se analizan generalmente por cromatografía de gases, mientras que los neonicotinoides suelen incluirse en los métodos de cromatografía líquida–. Existen además otras técnicas de separación, como la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), que podrían aportar una versatilidad suficiente como para incluir, en un único análisis, compuestos con propiedades fisicoquímicas muy diferentes típicamente propios del análisis por LC o GC [140]. Sin embargo, hasta el momento no han reemplazado a las técnicas cromatográficas clásicas en la monitorización medioambiental de plaguicidas.

Los métodos analíticos aplicados por los autores de estos estudios abarcaban en general una amplia gama de residuos de plaguicidas, con una media de 121 analitos diferentes en su alcance. Algunos autores se centran en un determinado tipo de residuos que presentan especial interés, como los piretroides y/o los neonicotinoides [112,127], resultando en un menor número de compuestos evaluados. En otros casos, sin embargo, la lista de analitos puede contener más de 300 sustancias activas [91,92]. El primer caso está a veces relacionado con el estudio de un tipo específico de sustancia activa y su relación con determinados trastornos observados en las colmenas: por ejemplo, Daniele *et al.* estudiaron la presencia de piretroides, neonicotinoides y el fungicida boscalid en colonias en las que se había notificado la muerte aguda de abejas melíferas, encontrando un alto porcentaje de muestras contaminadas con neonicotinoides (especialmente thiacloprid) y boscalid [96]. Por otra parte, Niell *et al*. evaluaron la presencia de 39 plaguicidas en las colonias afectadas por una mortalidad masiva de abejas melíferas en Uruguay, encontrando cantidades sorprendentemente altas del insecticida parathion-methyl, que había sido aplicado recientemente a cultivos de la región en forma de microcápsulas [141]. Este estudio confirmó que un solo plaguicida, aunque se aplique a varios kilómetros de las colonias, puede tener efectos devastadores para la salud de las abejas melíferas, y también demostró que la formulación en microcápsulas, aunque está relacionada con una menor dispersión ambiental, es fácilmente confundida con el polen por las abejas melíferas y puede ser transportada deliberadamente a las colmenas.

Aunque los estudios abarquen una gran cantidad de contaminantes pertenecientes a diferentes clases químicas, las detecciones se reducen generalmente a un número reducido de compuestos. Por término medio, el número de plaguicidas detectados en los artículos incluidos en la **Tabla 1** es de 28 (lo que corresponde al 23 % de la media de 121 analitos incluidos en los análisis). Se espera que los estudios que abarcan grandes superficies de terreno y/o largos periodos de tiempo encuentren un mayor número de compuestos, como es el caso de un seguimiento del polen a gran escala en diferentes partes de los Estados Unidos a lo largo de siete años en el que se identificaron 120 compuestos diferentes [86].

Por otro lado, la sensibilidad de los métodos analíticos también juega un papel decisivo en la identificación de compuestos en las muestras. Los métodos analíticos con límites de detección relativamente altos podrían dar lugar a la no detección de compuestos presentes en las muestras a niveles traza. En el conjunto de estudios incluidos en la **Tabla 1**, hasta un tercio de los métodos tenía un límite medio de detección (considerando

todos los compuestos analizados) superior o igual a 10 µg/kg, mientras que casi la mitad podían detectar sus analitos a niveles de hasta 1 µg/kg. El desarrollo de instrumentación y metodologías cada vez más sensibles resulta por lo tanto esencial para determinar la presencia de compuestos a concentraciones muy bajas pero que podrían tener implicaciones biológicas y/o medioambientales.

2.1.4. Detección de plaguicidas en muestras apícolas

En los 50 programas de monitorización incluidos en la **Tabla 1** se detectaron un total de 354 contaminantes diferentes, de los cuales en torno a un 70 % eran insecticidas o fungicidas, seguidos por metabolitos de otras sustancias activas, herbicidas y, en menor medida, tratamientos veterinarios y otras sustancias (incluyendo compuestos sinérgicos y repelentes como DEET o piperonyl butoxide).

Entre los contaminantes detectados, 60 fueron identificados más de 7 veces en la literatura revisada (es decir, fueron reportados en al menos un 14 % de los trabajos). Estos compuestos y las clases de plaguicidas a los que pertenecen se resumen en la **Tabla 2**, junto a su valor de log P como medida de la polaridad y sus respectivas toxicidades para abejas (expresadas en términos de LD_{50} de contacto, en µg/abeja) [142]. Los acaricidas e insecticidas son, en general, los plaguicidas más tóxicos para las abejas, mientras que los fungicidas y herbicidas suelen presentar toxicidades menores. Los valores de toxicidad son sólo indicativos, ya que se refieren al plaguicida individual mientras que, en condiciones de campo, las abejas están expuestas a mezclas complejas de contaminantes en las que pueden producirse efectos sinérgicos y/o antagónicos [63,65,143,144]. En 2017, Kacynski *et al*. demostraron que las intoxicaciones agudas en colonias de abejas estaban relacionadas con los efectos sinérgicos de los plaguicidas presentes en las colmenas, ya que las concentraciones de los plaguicidas individuales eran inferiores a su correspondiente LD_{50} [107].

Como regla general, los compuestos lipofílicos suponen un mayor riesgo de exposición a largo plazo para las abejas debido a su acumulación en la cera y los tejidos orgánicos [90,135]. En 2019, Bommuraj *et al.* determinaron que la mayoría de los plaguicidas con log P superior a 2 tendían a acumularse en la cera de abeja a niveles de concentración elevados, no detectándose en muestras de miel [91]. La alta lipofilicidad de la cera hace que resulte el lugar preferente de la colmena para la acumulación de plaguicidas no polares, tal y como han descrito varios autores [92,122]. Esto demuestra que las propiedades fisicoquímicas (especialmente la polaridad de la molécula y su posibilidad de ionización) determinan en gran medida las matrices en las que se acumulan predominantemente los plaguicidas, además de su posible migración hacia otras partes de la colmena [145]. En lo referente a la posibilidad de ionización, el log P de un determinado contaminante podría no corresponder al de su forma dentro de la colmena: algunos de ellos presentan grupos ácidos o básicos que pueden ionizarse en medios acuosos y facilitar su acumulación en matrices más polares. De forma similar, la sustancia activa puede sufrir procesos de transformación en el interior de la colmena, y los productos resultantes pueden tener patrones de acumulación diferentes al del precursor; es el caso, por ejemplo, del amitraz (con baja polaridad) y sus metabolitos DMF, DMPF y DMA, más polares (**Figura 7**).

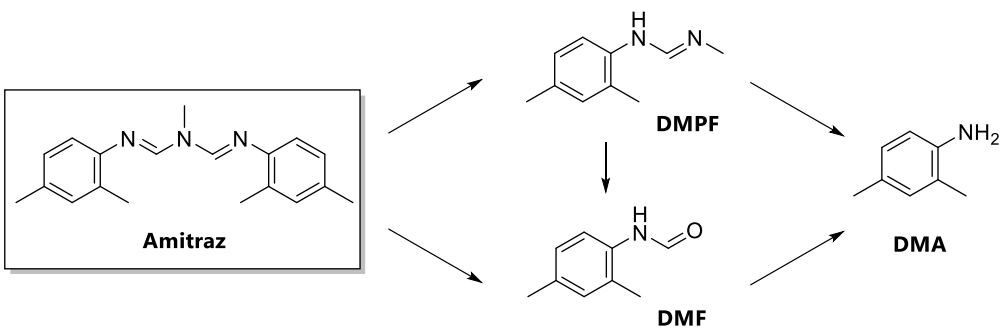


Figura 7. Estructura del plaguicida amitraz y de sus principales productos de transformación

Tabla 2. Principales plaguicidas detectados en monitorizaciones realizadas durante el periodo 2011-2022

Plaguicida	Nº estudios	LD_{50}[a]	log P	Clase[b]	Plaguicida	Nº estudios	LD_{50}[a]	log P	Clase[b]
Chlorpyrifos	31	59	4.7	I	**Hexythiazox**	10	>200	2.7	I-A
Coumaphos	28	2.0	3.9	A (TV)	**Pyriproxyfen**	10	74	5.4	I
Imidacloprid	24	81	0.6	I	**Thiophanate-methyl**	10	>100	1.4*	F
Tau-fluvalinate	24	20	7.0	A (TV)	**Acrinathrin**	9	84	6.3	I-A (TV)
Tebuconazole	24	>200	3.7*	F	**Indoxacarb**	9	0.1	4.7	I
Dimethoate	23	0.1	0.8	I	**Malathion**	9	0.12	2.5	I
Thiacloprid	23	39	1.3	I	**Piperonyl butoxide**	9	294	4.8	S
Azoxystrobin	20	>200	2.5	F	**Carbofuran**	8	36	1.8	I
Boscalid	20	>200	3.0	F	**Clothianidin**	8	44	0.9	I
Carbendazim	19	>50	1.5*	F	**Fenoxycarb**	8	>204	4.1	I
Acetamiprid	18	8.1	0.8	I	**Fludioxonil**	8	>100	4.1*	F
Thiamethoxam	17	24	-0.5	I	**Lambda-cyhalothrin**	8	7.0	6.8	I
Amitraz[c]	16	50	5.5	A (TV)	**Myclobutanil**	8	34	2.9*	F
Cypermethrin	16	23	5.6	I	**Phosmet**	8	0.2	2.8	I
Chlorfenvinphos	14	-	3.8	I	**Pyridaben**	8	24	6.4	I-A
Cyprodinil	14	>784	4.0*	F	**Alachlor**	7	16	3.1	H
Pendimethalin	14	100	5.4*	H	**Atrazine**	7	>100	2.7*	H
Trifloxystrobin	14	>100	4.5	F	**Bromopropylate**	7	183	5.4	I-A
Diazinon	13	0.1	3.7	I	**Chlorpyrifos-methyl**	7	0.2	4.0	I
Permethrin	13	24	6.1	I	**Cyproconazole**	7	> 100	3.1	F
Difenoconazole	12	>100	4.4*	F	**Dichlorvos**	7	-	1.9	I
Fenpyroximate	12	>16	5.7	I-A	**Dimethomorph**	7	>212	2.7	F
Iprodione	12	>100	3.0	F	**Dimoxystrobin**	7	> 100	3.6	F
Propiconazole	12	>100	3.7	F	**Fipronil**	7	59	3.8	I-A
Pyrimethanil	12	>100	2.8*	F	**Lindane**	7	0.3	3.5	I
Carbaryl	11	0.1	2.4	I	**Metolachlor**	7	>110	3.4	H
Metalaxyl	11	269	1.8*	F	**Penconazole**	7	32	3.7*	F
Pyraclostrobin	11	>100	4.0	F	**Propamocarb**	7	>100	1.0*	F
Bifenthrin	10	16	6.6	I	**Spiroxamine**	7	4.2	2.9	F
Chlorothalonil	10	>40	2.9	F	**Terbuthylazine**	7	>32	3.4	H

[a] LD_{50} de contacto (µg/abeja)

[b] I = Insecticida; F = Fungicida; H = Herbicida; A = Acaricida; TV = Tratamiento veterinario en apicultura; S = sinérgico

[c] Amitraz expresado como la suma del precursor, DMF y DMPF

*Compuesto con propiedades ácidas o básicas (ionizable)

Distribución de los plaguicidas más detectados

La **Figura 8** muestra la frecuencia de detección y la concentración media de los 10 compuestos fitosanitarios más comúnmente detectados en las diferentes matrices apícolas. El chlorpyrifos, reportado por 31 estudios de todas las regiones incluidas en el presente documento, fue el plaguicida detectado con mayor frecuencia. Entre 2016 y 2019, el chlorpyrifos resultó ser el plaguicida con mayor presencia en muestras de abejas melíferas y polen de España, Polonia e Italia, con hasta un 81 % de muestras positivas [93,99,114]. Si se consideran todos los estudios incluidos en la **Tabla 1**, este compuesto se encontró en el 8-14 % de las muestras de polen, abejas, cera y pan de abeja, pero sólo en un 2 % de las muestras de miel (**Figura 8**, *izquierda*). Las frecuentes detecciones de este compuesto en polen, pan de abeja y abejas melíferas se deben probablemente a su aplicación en las prácticas agrícolas, al ser todas ellas matrices que han tenido un contacto directo con el exterior. Por otra parte, el carácter lipofílico de la molécula explicaría su migración a la cera: con un log P de 4.7, este contaminante tiende a migrar a matrices no polares una vez introducido en la colmena. La miel, debido a su alto contenido en componentes polares, no resulta en general contaminada por este compuesto. Las mayores concentraciones de chlorpyrifos se encontraron en muestras de abejas, con una media de 138 µg/kg en las 1708 muestras revisadas (**Figura 8**, *derecha*). La principal contribución a esta elevada concentración media en abejas se debe a un estudio que analizó 33 muestras de abejas melíferas procedentes de colmenas con sospechas de envenenamiento, detectando chlorpyrifos en concentraciones de hasta 576 mg/kg (lo que indica una posible correlación entre la contaminación con este compuesto y el estado de salud de dichas colonias) [128]. Si no se tiene en cuenta este estudio para los cálculos, la concentración media de chlorpyrifos en las abejas melíferas desciende a 78 µg/kg. La detección de éste y otros contaminantes en una determinada matriz o estudio depende de varios factores, entre ellos la ubicación de los apiarios. En un estudio realizado por Calatayud *et al.*, se encontraron mayores concentraciones de chlorpyrifos en las muestras de polen de colmenas situadas en zonas de agricultura intensiva, mientras que aquéllas situadas en zonas rurales o naturales contenían cantidades significativamente menores [95].

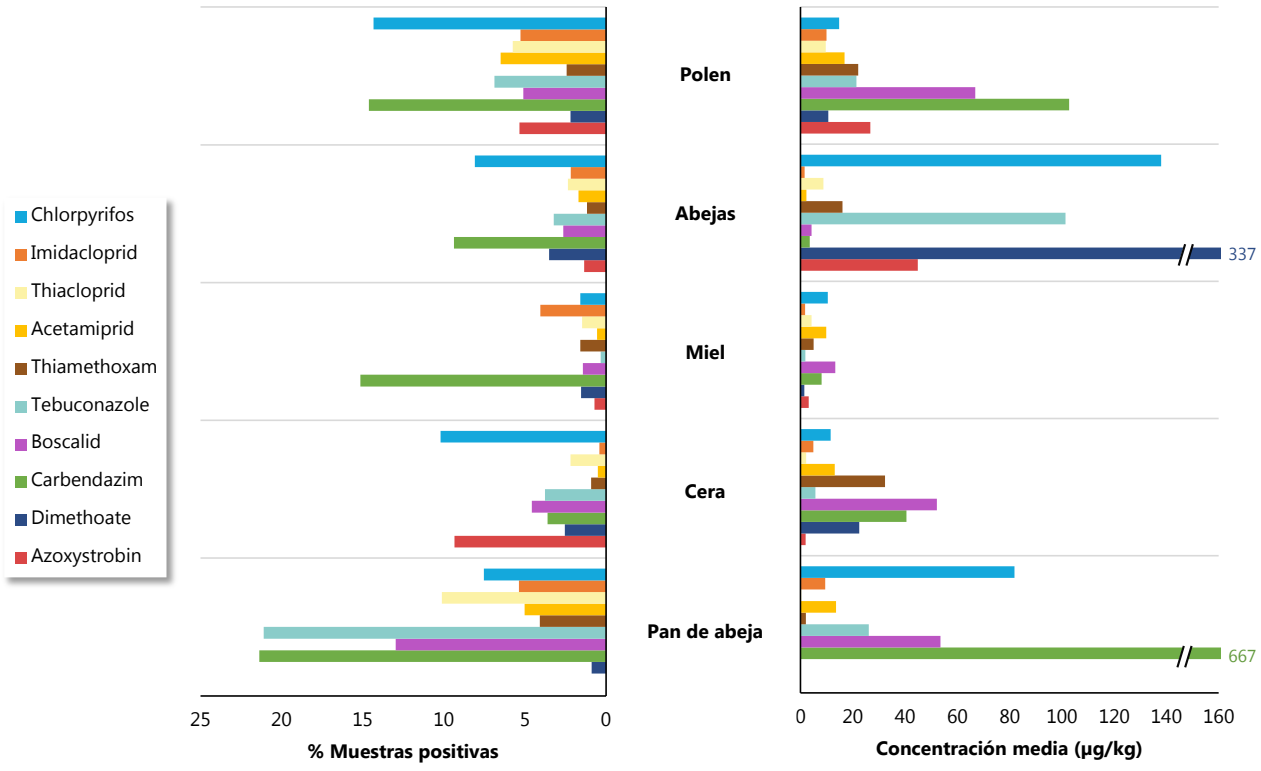


Figura 8. Porcentaje de muestras positivas *(izquierda)* y niveles de concentración promedio *(derecha)* en cada matriz de los principales plaguicidas detectados

Una clase de plaguicida que merece especial atención es el grupo de los neonicotinoides. Resulta preocupante que cuatro de los diez plaguicidas más detectados en las monitorizaciones (imidaclorpid, thiacloprid, acetamiprid y thiamethoxam) pertenezcan a este grupo, dada la posible relación de estos insecticidas con ciertos trastornos de las colonias [112,146]. Los neonicotinoides suelen aparecer juntos, en combinaciones de dos o más compuestos diferentes en los mismos grupos de muestras –por ejemplo, el acetamiprid se encontró junto con imidacloprid, thiamethoxam y/o thiacloprid en el 90 % de los estudios en los que se detectó– [96,100,103]. Todos ellos fueron detectados mayoritariamente en muestras de polen y pan de abeja, con una menor cantidad de positivos encontrados en miel, abejas y, especialmente, en cera. De nuevo, la polaridad podría explicar la escasa migración a una matriz apícola: al contrario que el chlorpyrifos, los neonicotinoides son en general compuestos de relativamente alta polaridad (log P de entre -0.5 y 1.3), por lo que la cera es, en general, la matriz menos contaminada con ellos. A pesar de que los neonicotinoides han sido prohibidos en múltiples regiones, todavía se detectan en monitorizaciones recientes [86,147]. Sin embargo, algunos estudios ya han informado de un descenso en la frecuencia de detección de neonicotinoides, como el seguimiento realizado en Francia por Daniele *et al*. en 2018 [96]. Cabe mencionar también que algunos metabolitos del imidacloprid han sido reportados de forma relativamente frecuente por los autores de estos trabajos, en algunos casos a concentraciones superiores a los de la propia sustancia activa [112]. Esto muestra la importancia de incluir los metabolitos y productos de transformación de interés en los diferentes programas de muestreo ya que, si bien puede no detectarse la presencia del compuesto precursor, se puede deducir su aplicación mediante el análisis de la presencia de sus productos de degradación.

El tebuconazole y el boscalid, por su parte, muestran en general patrones de acumulación muy similares: ambos fungicidas se encontraron mayoritariamente en pan de abeja (con un 21 y un 13 % de muestras positivas, respectivamente) seguido por polen, y muy raramente en miel. Sin embargo, las concentraciones medias de estos compuestos difieren significativamente. Las concentraciones de boscalid en pan de abeja, cera y polen son muy similares (en torno a 55 μg/kg) y mayores a aquéllas en abejas y miel (4-12 %). El tebuconazole, por el contrario, presenta una concentración media en muestras de abeja mucho mayor que en cualquier otra matriz (101 μg/kg frente a un máximo de 26 μg/kg).

El carbendazim es el fitosanitario con mayor incidencia de muestras positivas en la mayoría de matrices, presentando asimismo una elevada concentración media tanto en pan de abeja como en polen. El carbendazim no es sólo un fungicida en sí mismo, sino también el producto de degradación de otros pesticidas como thiophanate-methyl o benomyl, por lo que su detección podría estar relacionada con la aplicación de estas sustancias activas. Esta dualidad como metabolito y principio activo impide determinar la verdadera fuente de contaminación. De hecho, el precursor thiophanate-methyl se detectó en 12 trabajos incluidos en la **Tabla 1**, mientras que el benomyl no fue identificado en ninguno de ellos (dado que se degrada con gran facilidad en carbendazim) [53,126,135]. La elevada concentración media y frecuencia de detección de carbendazim en el pan de abeja se debe exclusivamente a los resultados de un estudio realizado en 315 muestras de China [87]. Este compuesto fue, por otro lado, la única sustancia detectada en un número significativo de muestras de miel (15 % de muestras positivas): la presencia de un grupo ionizable en su estructura favorece su solubilidad en matrices polares.

Del insecticida y acaricida dimethoate destaca principalmente su elevada concentración media en muestras de abeja (337 μg/kg), debido principalmente a la contribución de los trabajos de Lozowicka *et al*. y Kiljanek *et al.* [114,128] sobre incidentes de mortalidad de abejas en Polonia. Por último, el azoxystrobin no fue reportado en ninguna muestra de pan de abeja, siendo detectado principalmente en muestras de cera (a baja concentración) y polen.

Plaguicidas detectados con menor frecuencia

Con 16 artículos reportando detecciones de cypermethrin, este compuesto constituye el segundo piretroide más común en las muestras apícolas analizadas después del tau-fluvalinate. El relativamente escaso número de detecciones (1-3 % de muestras positivas para todas las matrices) no resta relevancia a estos hallazgos: es uno de los compuestos que se encontraron a mayor concentración en las muestras. Múltiples artículos revelaron elevados niveles de cypermethrin, que alcanza concentraciones significativamente mayores a los de cualquier otro plaguicida de uso fitosanitario en polen (692 µg/kg), abejas (476 µg/kg), miel (92 µg/kg), cera (524 µg/kg) y pan de abeja (2807 µg/kg) [87,90,128].

Otros plaguicidas con una baja frecuencia de detección resultaron igualmente significativos en sus respectivos estudios. Malhat *et al*. revelaron en 2015 la presencia generalizada de compuestos organoclorados en mieles procedentes de Egipto, aunque su uso había sido prohibido más de 40 años atrás [117]. La presencia de plaguicidas prohibidos sigue siendo frecuente en múltiples regiones del mundo, lo que podría estar relacionado con una alta persistencia en los ecosistemas. Este es el caso, por ejemplo, del DDT y sus derivados, que se han detectado recientemente en los controles realizados en Etiopía, Italia y Alemania [101,109,145]. Estos compuestos se encuentran entre los plaguicidas organoclorados más representativos, que fueron los primeros en producirse industrialmente para su uso en agricultura. Por lo general, presentan baja solubilidad en agua y una muy elevada estabilidad en el medioambiente, por lo que son extremadamente persistentes tanto en los ecosistemas como en tejidos de organismos [150,151]. El uso indiscriminado de estos compuestos resultó en las primeras movilizaciones ciudadanas por un control más estricto en la aplicación de plaguicidas.

Soldado británico recibe DDT bajo el uniforme como protección frente a mosquitos transmisores de malaria y tifus (1973)

Moverse entre extremos: del DDT a la quimiofobia

En 1948, Paul Hermann Müller ganó el premio Nobel de Medicina "Por su descubrimiento de la alta eficacia del DDT como veneno de contacto frente a varios artrópodos". En apenas unos años, el DDT (dicloro difenil tricloroetano) comenzó a aplicarse de forma masiva en campos de cultivo, en hogares e incluso de forma tópica, y ayudó a aumentar la producción agrícola y a luchar contra enfermedades como la malaria.

Catorce años después, la bióloga Rachel Carson publicó el que se convertiría en un *bestseller* mundial, titulado *La primavera silenciosa*, en el que por primera vez se describían los efectos perjudiciales del DDT sobre la fauna y los ecosistemas [148]. Este libro despertó en la población el miedo a que los gobiernos pudieran emplear este tipo de sustancias sin que existieran evidencias sobre su posible impacto en otros organismos. Se creó así un nuevo movimiento medioambiental que impulsó un control más estricto sobre las nuevas sustancias activas aprobadas y, por supuesto, la retirada del DDT en numerosos países [149].

Sin embargo, éste y otros movimientos e incidentes relacionados con la Química también marcaron el inicio de un amplio recelo de la población hacia los productos químicos sintéticos, la llamada *quimiofobia*. Lo llamativo de determinados sucesos puntuales, como un vertido accidental o un envenenamiento con plaguicidas, atrae tanto a los medios de comunicación como a su audiencia. Esto, sumado a la heurística de accesibilidad (según el cual las personas tendemos a creer que un suceso puntual que recordamos con facilidad es algo generalizado) ha exacerbado aún más el rechazo hacia los productos sintéticos: la opinión pública sobre estos productos no viene determinada por los estudios y las evidencias, sino por su propia naturaleza química.

En otro estudio se detectaron DDT y sus derivados en muestras de miel producidas en zonas industrializadas de Italia, mientras que las muestras de zonas hortofrutícolas contenían principalmente chlorpyrifos y quinoxyfen, y no se detectaron plaguicidas en las muestras de zonas de montaña, lo que ilustra la relación entre la zona de muestreo y la carga de plaguicidas [123]. Este fenómeno (ya descrito en la *página 41* en relación al chlorpyrifos) también fue demostrado por otros autores en sus respectivos estudios sobre matrices apícolas situadas en diferentes agroecosistemas, estableciendo una relación entre la ubicación de la colmena y los plaguicidas que se acumulan en ella, así como las posibles consecuencias para la colonia [53,116,118].

Detección de miticidas empleados en apicultura

El coumaphos, el tau-fluvalinate y el amitraz han sido los miticidas más empleados en apicultura durante las últimas décadas con detecciones en 28, 24 y 16 trabajos de los incluidos en la **Tabla 1**, respectivamente. Tanto el coumaphos como el tau-fluvalinate son compuestos de baja polaridad que tienden a acumularse en la cera durante largos periodos de tiempo. Así, ambos se encuentran con mucha frecuencia en esta matriz (en torno a un 40 % de muestras positivas de entre las 1969 analizadas por los diferentes autores) aunque los apicultores no los hayan aplicado en sus colmenas [92,135]. La concentración de estos dos acaricidas puede, además, aumentar con el tiempo tras las sucesivas aplicaciones alcanzando niveles del orden de mg/kg en matrices apícolas, especialmente en cera [92,95]. Por otro lado, en esta matriz se han llegado a detectar concentraciones de en torno a 14 000 µg/kg de los principales metabolitos de amitraz (DMF y DMPF) a pesar de que presentan una polaridad relativamente alta [92]. El amitraz, al contrario que sus metabolitos, presenta una alta lipofilicidad (log P 5.5), por lo que podría acumularse en una matriz como la cera y degradarse *in situ* en DMF y DMPF. Por otro lado, el acetonitrilo favorece la degradación del amitraz, lo que implicaría que el precursor podría ser la sustancia presente en mayor medida en la cera, aunque sólo se detecten los metabolitos.

Como en el caso de los neonicotinoides, los acaricidas de uso apícola tienden a aparecer juntos en las mismas colmenas: 24 de los 35 trabajos que informaron de la presencia de alguno de estos acaricidas identificaron una combinación de al menos dos de ellos en las colonias [92,95]. En un gran número de trabajos, estos compuestos fueron el grupo presente en un mayor porcentaje de muestras y/o con la mayor concentración, independientemente de la matriz [97,113]. La presencia continuada de todos estos tratamientos en las colmenas podría estar relacionada con la aparición de resistencias del ácaro varroa, de forma similar a como ocurre en humanos debido al uso indiscriminado de antibióticos.

La **Figura 9** muestra el número de publicaciones que reportaron cada miticida como el compuesto más frecuentemente detectado en las diferentes matrices, incluyendo también los trabajos en los que el contaminante más ubicuo fue un plaguicida empleado en la agricultura. Puede observarse que el tau-fluvalinate y el coumaphos son, en general, los plaguicidas más comunes en cera; sin embargo, hubo siete estudios en los que los plaguicidas más comunes en esta matriz no eran miticidas, sino plaguicidas de origen agrícola como el pyraclostrobin o el azoxystrobin [94,118]. Estos resultados revelan la necesidad de incluir los plaguicidas de uso agrícola en el control de calidad de los procesos de reciclaje de la cera, que normalmente se centran sólo en la eliminación de miticidas.

Como cabría esperar, los plaguicidas de uso agrícola suelen ser los compuestos más comunes en abejas y polen, ya que en estos casos ha existido un contacto directo con el exterior de las colmenas. El hecho de que un acaricida fuera el compuesto más frecuentemente detectado en polen en seis trabajos está probablemente relacionado con el muestreo de polen almacenado en el interior de las colmenas, que habría estado ya en contacto con los tratamientos veterinarios.

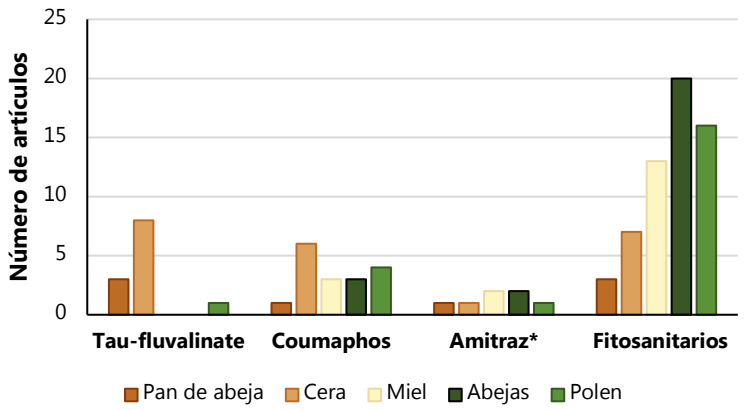


Figura 9. Número de artículos que reportan cada compuesto como el más frecuentemente detectado. *Amitraz expresado como la suma del precursor, DMF y DMPF

Pasado y futuro de los tratamientos veterinarios

Aunque ya no están autorizados para uso apícola en la mayoría de países, el acrinathrin y el chlorfenvinphos tuvieron en el pasado un uso muy extendido para el tratamiento de las infestaciones de las colonias. Estos dos compuestos siguen mostrando una alta incidencia en muestras apícolas (se encontraron en el 18 y el 28 % de los estudios, respectivamente) y su presencia está relacionada en la mayoría de los casos con otros acaricidas de uso actual como el coumaphos o el tau-fluvalinate: tienden a aparecer en las mismas colmenas, probablemente debido a una alta persistencia.

Por otro lado, aunque el coumaphos, el tau-fluvalinate y el amitraz siguen siendo empleados habitualmente apiarios de gran parte del mundo y han sido identificados por estudios muy recientes [86,87,90], hay una tendencia creciente en la apicultura a sustituir estos acaricidas clásicos por productos "verdes" como el ácido oxálico y/o fórmico y el thymol, entre otros. Los dos primeros compuestos son moléculas pequeñas y muy polares que resultan difíciles de incluir en los métodos multirresiduo, mientras que el thymol (una molécula de origen natural presente en el tomillo) ya ha sido incluido en el alcance de diferentes métodos de análisis [86,100].

Presencia de contaminantes en miel

Como se observa en la **Figura 8**, la proporción de muestras de miel contaminadas con los plaguicidas más comunes es en general menor que cualquier otra matriz, además presentar concentraciones mucho más bajas. La alta polaridad de sus componentes principales (agua y glúcidos) hace que la migración y acumulación de estos contaminantes sea escasa, ya que la mayoría de ellos presenta una polaridad intermedia o baja. En 2021, un estudio analizó 212 muestras de miel procedente de Australia en busca de 154 residuos de plaguicidas, detectando únicamente trazas de cyhalothrin [152]. En otros estudios, aunque se detectó una carga significativa de plaguicidas en otras matrices (hasta 20 residuos diferentes detectados en abejas y cera), no hubo detecciones en ninguna muestra de miel [103]. Todo ello podría llevar a pensar que la miel presenta, en general, una menor incidencia de contaminantes.

Sin embargo, estos resultados no implican necesariamente que la miel no esté contaminada; como se comentó previamente, la detección de plaguicidas en una matriz apícola depende no sólo de sus propiedades fisicoquímicas o del uso de plaguicidas, sino también de la sensibilidad y el alcance de los métodos analíticos, incluida la preparación de muestra. Es más probable que la miel esté contaminada con compuestos polares y/o iónicos que no suelen incluirse en los métodos multirresiduo debido a que requieren técnicas específicas de extracción y análisis [36]. Este es el caso, por ejemplo, del herbicida glyphosate, uno de los plaguicidas más aplicados en el mundo tanto en cultivos agrícolas como en los bordes de las carreteras. Debido a su elevada polaridad

(log P -3.4), su análisis requiere una extracción adaptada e instrumentos de cromatografía iónica (IC), o bien el uso de columnas especiales en LC [153,154]. Por este motivo, el glyphosate no suele incluirse en los métodos multirresiduo y su presencia en miel sólo fue evaluada por uno de los 50 trabajos revisados [89]. Sin embargo, diversos estudios han demostrado la ubicuidad de este compuesto en muestras de miel: en 2019, un equipo de investigadores canadienses reportó la presencia de glyphosate en el 98 % de 308 muestras de miel [153]. En otro estudio se aplicó IC-HRMS para la determinación de glyphosate en mieles de España y Uruguay, encontrando un 81 % de muestras positivas y un 41 % con niveles superiores al LMR de 0.050 mg/kg establecido por la UE [154].

Miel contaminada... Con colores

En 2012, diferentes apicultores de Ribeauville, en el norte de Francia, reportaron la sorprendente producción de miel de colores por parte de sus abejas. Estas mieles presentaban un intenso color azul, verde o rojo, que rápidamente alarmó a los productores locales. El origen de este suceso resultó ser la presencia de una planta procesadora de residuos de caramelos M&M's, de la compañía Mars, situada a unos 4 kilómetros de la zona afectada [155].

2.2. MARCO LEGAL

El control de residuos de plaguicidas en abejas y productos apícolas tiene múltiples objetivos desde el punto de vista legislativo. En primer lugar, ayuda a desarrollar y mejorar marcos normativos para proteger a las abejas y comprender las causas de la desaparición de sus colonias: los análisis en entornos reales constituyen la mejor prueba de la eficacia de las medidas adoptadas por los organismos de control. En este sentido, la normativa europea establece estrictas directrices para la aprobación de sustancias activas en relación con sus efectos sobre la salud de las abejas: sólo podrán ser empleados como productos fitosanitarios aquellos plaguicidas que no originen efectos letales o subletales en estas colonias, o bien cuya aplicación se encuentre lo suficientemente controlada como para asegurar una exposición nula de las abejas a la sustancia activa [8]. A modo de ejemplo, en abril de 2022 restringió en la Unión Europea la aprobación del insecticida sulfoxaflor a usos en el interior de invernaderos, tras comprobar sus riesgos para las abejas y abejorros. Después del periodo de gracia, en mayo de 2023, su uso en exteriores será considerado ilegal [156].

Por otro lado, los programas de monitorización y seguimiento permiten supervisar el cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas en una región determinada: la detección de sustancias de uso prohibido podría ser indicadora del incumplimiento de dichas prácticas. No obstante, y como se ha comentado anteriormente, existen diversas causas que también podrían explicar estos hallazgos, entre ellas la elevada persistencia ambiental de determinados plaguicidas o el uso de ceras recicladas procedentes de campañas anteriores, que podrían no haber sido completamente descontaminadas [145].

El tercer gran objetivo es proteger la salud de la población humana a través del control de contaminantes en matrices apícolas de interés humano, así como en los productos finales a disposición de los consumidores. Las monitorizaciones y evaluaciones toxicológicas suelen dar lugar a disminuciones en los LMR a fin de asegurar la seguridad de estos productos; sin embargo, también pueden tener el efecto contrario si se demuestra que un determinado compuesto resulta inocuo. En este sentido, la legislación europea ha aumentado recientemente el LMR de boscalid en miel de 0.05 a 0.15 mg/kg tras confirmar su escasa toxicidad para los consumidores [157].

2.2.1. Legislación relativa a la presencia de plaguicidas en miel

Como principal producto apícola de consumo humano, la miel se encuentra sujeta a controles para determinar su carga en productos veterinarios empleados directamente sobre las colmenas. Pero las abejas también recogen productos fitosanitarios de los cultivos en los que polinizan, los cuales se introducen en las colmenas y, sin embargo, sólo algunos países han fijado LMR para los plaguicidas derivados de agricultura en este producto apícola. En septiembre de 2018, la Unión Europea sentó las bases en la regulación de plaguicidas en miel al aprobar las *Technical guidelines for determining the magnitude of pesticide residues in honey and setting Maximum Residue Levels in honey* [83]. La **Tabla 3** muestra los LMR actuales en la Unión Europea, Japón, Estados Unidos y Canadá para los plaguicidas más frecuentemente detectados en las monitorizaciones descritas en la sección anterior [158–161]. Como puede observarse, a excepción de la UE, las normativas se limitan casi exclusivamente a los tratamientos veterinarios. En cambio, la legislación europea abarca un control mucho más exhaustivo al considerar no sólo los LMR de los productos veterinarios utilizados para tratar a las abejas y las colmenas, sino también los plaguicidas agrícolas que pueden encontrarse en estas matrices. En esta región se ha definido un valor global por defecto de 0.05 mg/kg como el límite máximo de residuo para la mayoría de los plaguicidas aprobados; no obstante, existen excepciones que incluyen a los plaguicidas no autorizados y algunos de alto riesgo, para los cuales el límite máximo establecido es de 0.01 mg/kg. Este reglamento contempla asimismo la realización de ensayos de campo sobre matrices apícolas para evaluar la exposición real de las abejas y los consumidores a los plaguicidas.

Tabla 3. LMR en miel de los plaguicidas detectados con mayor frecuencia a lo largo de los últimos años (mg/kg)

Plaguicida	UE	EE. UU.	Japón	Canadá	Plaguicida	UE	EE. UU.	Japón	Canadá
Acetamiprid	0.05		0.20		Hexythiazox	0.02		0.05	
Acrinathrin	0.05				Imidacloprid	0.05			
Amitraz	0.20	0.20	0.20	0.10	Indoxacarb	0.05			
Azoxystrobin	0.05				Iprodione	0.05			
Bifenthrin	0.05				Lambda-cyhalothrin	0.05			
Boscalid	0.15				Malathion	0.05			
Carbaryl	0.05				Metalaxyl	0.05			
Carbendazim	1.00				Myclobutanil	0.05			
Carbofuran	0.05				Pendimethalin	0.05			
Chlorfenvinphos	0.01				Permethrin	0.05			
Chlorothalonil	0.05				Phosmet	0.05			
Chlorpyrifos	0.01				Propiconazole	0.05			
Clothianidin	0.05				Pyraclostrobin	0.05			
Coumaphos	0.10	0.15		0.02	Pyridaben	0.05			
Cypermethrin	0.05		0.01		Pyrimethanil	0.05			
Cyprodinil	0.05				Pyriproxyfen	0.05			
Diazinon	0.01				Tau-fluvalinate	0.05		0.05	0.02
Difenoconazole	0.05				Tebuconazole	0.05			
Dimethoate	0.01				Thiacloprid	0.20			
Fenoxycarb	0.05				Thiamethoxam	0.05			
Fenpyroximate	0.05				Thiophanate-methyl	1.00			
Fludioxonil	0.05				Trifloxystrobin	0.05			

La UE es una gran importadora de miel, lo que ha provocado que en diversas regiones del mundo se tienda a adoptar la legislación europea como referencia para el control de calidad [87,102,103]. Por ejemplo, la región MERCOSUR (Mercado Común del Sur), que incluye 11 países sudamericanos, es un importante exportador de miel a Europa y Estados Unidos, por lo que sus integrantes deben cumplir las condiciones legislativas impuestas en estas regiones. En concreto, el valor económico conjunto de las importaciones y exportaciones de miel en 2018 en España ascendió a casi 147 millones de euros. Las importaciones españolas de miel proceden principalmente de China, Portugal y Uruguay, mientras que el principal destino de las exportaciones de este producto se encuentra dentro de los límites de la Unión Europea, especialmente Francia (**Figura 10**) [48].

El efecto Bruselas

El fenómeno por el que las medidas adoptadas dentro de la Unión Europea influyen en otras regiones del mundo, incluyendo países y grandes compañías, se conoce como *efecto Bruselas* [162]. Éste no abarca sólo a la legislación relativa a plaguicidas: Europa también sienta las bases de otros ámbitos como la protección de datos, la protección del medioambiente o la competencia de los mercados.

A pesar del importante valor económico de las importaciones de miel procedente de China en la UE, este país no ha seguido por el momento la tendencia de otras regiones a adoptar una legislación acorde con el marco europeo. La última legislación china relativa a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos, la GB 2763-2021, establece los LMR de 433 residuos de plaguicidas en un amplio rango de productos alimenticios que no incluyen de forma específica la miel [163]; en este producto se analiza únicamente la presencia de metales pesados como el plomo (GB 2762-2017) [164]. Por otro lado, en Australia, el control de residuos de plaguicidas en miel se centra únicamente en fipronil, flumethrin, tau-fluvalinate, glyphosate, oxytetracycline y phosphine [165], mientras que la legislación rusa contempla el control de 571 residuos de plaguicidas en alimentos, de los cuales sólo cinco (DDT, amitraz, bromopopylate, lindane y chlorothalonil) deben analizarse en miel [166].

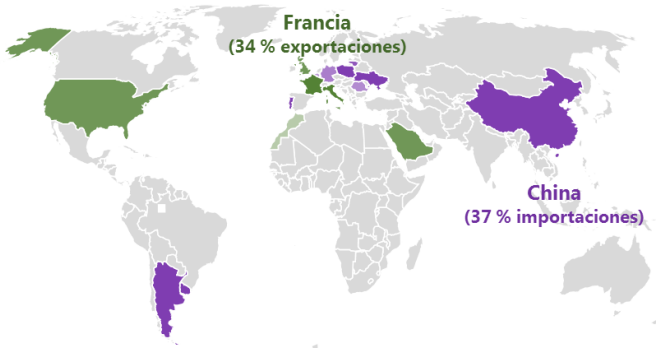


Figura 10. Principales países de los que España importa *(violeta)* y a los que exporta *(verde)* miel

La Organización Mundial de la Salud (OMS), por su parte, no establece LMR para los plaguicidas en miel ni en ninguna otra matriz, pero sí la publicado una clasificación en función del peligro potencial (desde *Improbable que cause riesgo agudo* hasta *Extremadamente peligroso*), en función de su LD_{50} oral y de contacto en roedores, la cual resulta de gran interés a la hora de redactar o revisar la legislación (**Figura 11**) [167].

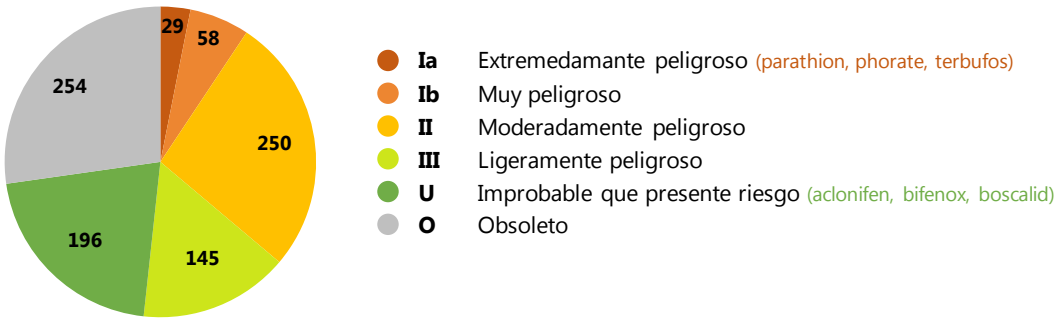


Figura 11. Distribución de 932 sustancias activas en función de su toxicidad según la clasificación de la OMS

2.2.2. Legislación relativa a la presencia de plaguicidas en otras sustancias apícolas

Hasta el momento, la miel es el único alimento de origen apícola que se encuentra sometido de forma explícita a controles de plaguicidas y contaminantes en la mayor parte del mundo. Sin embargo, no es el único producto apícola de consumo humano: otras sustancias como el polen, la jalea real, el propóleo o el pan de abeja están ganando popularidad como complementos alimenticios, sin que se encuentren sometidas a los mismos controles que la miel u otros alimentos.

La cera es, por su parte, un excipiente en los cosméticos y productos farmacéuticos que está presente en numerosas formulaciones de uso tópico (cremas, lociones o bálsamos, entre otros). Los contaminantes acumulados en esta matriz pueden absorberse a través de la piel debido a su carácter lipofílico, lo cual exige un estricto control para preservar la salud de los consumidores [110]. Un estudio reciente demostró que el 94 % de 338 muestras de cera de abeja recogidas en Alemania contenían DDT y sus derivados, junto con otros organoclorados prohibidos [145]. Sin embargo, las diferentes farmacopeas de todo el mundo carecen de control de residuos de plaguicidas en cera de abejas. Por otro lado, el propóleo se utiliza principalmente en productos farmacéuticos como cremas, apósitos para curar heridas y gasas, además de como antibacteriano y desinfectante, y sin embargo ha recibido poca atención por parte de los organismos reguladores.

La cera de abeja, aunque no se consuma de forma intencionada, es un aditivo alimentario, en concreto el E901, empleado para el recubrimiento de frutas y verduras (aportando brillo a su superficie y haciéndolas más atractivas a la vista), o como base para la preparación de colorantes alimentarios.

2.3. TENDENCIAS FUTURAS

2.3.1. Instrumentación y metodología

La colmena de abejas melíferas es, como superorganismo, un valioso indicador de los contaminantes presentes en el medioambiente. En los últimos diez años, la transición de los detectores convencionales a espectrómetros de triple cuadrupolo han permitido alcanzar elevados niveles de sensibilidad en los análisis, pero, en el futuro, las ventajas de la HRMS marcarán probablemente la tendencia en los programas de monitorización, ya que permite la identificación de compuestos desconocidos y/o fuera del alcance de los métodos multirresiduo. Esta técnica ha sido ya empleada con éxito para el cribado *(screening)* de plaguicidas y otros contaminantes ambientales en muestras de cera y abejas, entre otras matrices apícolas [168,169]. El proceso comienza generalmente con la deconvolución y comparación de los espectros de masas obtenidos experimentalmente con bibliotecas espectrales. Esto, sumado a la obtención de masas exactas de los iones, hace posible conocer la composición elemental de los compuestos detectados, elucidar su estructura química y realizar identificaciones tentativas que podrían ser confirmadas a través de patrones analíticos. Esta metodología permitirá determinar no sólo la presencia de plaguicidas en el medioambiente y en las colmenas de abejas, sino también sus efectos sobre éstos y otros organismos. Existen ya trabajos que, a través de técnicas de HRMS, vinculan la exposición de abejas a plaguicidas con una disminución en la concentración de neuropéptidos, esenciales para la regulación fisiológica [170].

Paralelamente, se está empezando a realizar un seguimiento del glyphosate y de otros compuestos iónicos o que requieren de un análisis específico, los cuales han recibido en el pasado escasa atención en los programas de monitorización. Las evaluaciones futuras permitirán, de este modo, determinar la presencia de estos compuestos tanto en el medioambiente como en productos apícolas.

2.3.2. Legislación y monitorizaciones

Se espera que la regulación de la miel y otros productos apícolas en todo el mundo sea sometida a cambios importantes tras la aprobación de las nuevas directrices de la Unión Europea. Es previsible que, en los próximos años, la legislación de diferentes partes del mundo abarque no sólo la reglamentación de los acaricidas de uso veterinario, sino también la de los plaguicidas agrícolas, siguiendo el modelo europeo. Debido al efecto que un gran mercado como el de la Unión Europea tiene sobre las prácticas agrícolas de los países exportadores, es de esperar que las naciones extranjeras se adapten progresivamente a la nueva legislación de la UE. Se profundizará en el conocimiento de los efectos de los plaguicidas sobre el comportamiento y la salud de las abejas, ya que los nuevos estudios de campo impuestos por las nuevas normativas permitirán conocer mejor las vías de entrada de los plaguicidas a la colmena, las transformaciones que sufren y su efecto sobre las abejas, el medioambiente y la salud humana. Las directrices de la Unión Europea también suponen un paso adelante en la regulación de los plaguicidas en las materias primas derivadas de apicultura en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, que probablemente serán actualizadas y definidas en mayor profundidad en el futuro. Los laboratorios deberán asimismo adaptarse a las nuevas legislaciones e incluir una creciente cantidad de analitos en sus alcances, así como el análisis de matrices que incluyan los productos finales a disposición de los consumidores.

Por su parte, los programas de monitorización ambiental basados en muestras apícolas fomentan el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para evaluar los diferentes contaminantes a los que están expuestas las colonias y ayudan a establecer los criterios necesarios para realizar un correcto seguimiento de los mismos:

- Alcanzar sensibilidades muy elevadas (capaces de detectar trazas incluso a nivel de ng/kg) e incluir el análisis de una gran cantidad de sustancias con diferentes propiedades fisicoquímicas, a fin de no perder información sobre los contaminantes presentes en las muestras.
- Adaptarse a las nuevas sustancias activas que se lanzan al mercado para ser empleadas como plaguicidas o tratamientos veterinarios, mediante una constante actualización de los métodos de análisis.
- Incluir, independientemente de la zona sometida a monitorización, ciertos contaminantes detectados de forma frecuente por estudios previos. Aunque las prácticas agrícolas típicas de cada región (o incluso los alrededores de la colmena) definen en gran medida los plaguicidas que se encontrarán, hay ciertos contaminantes que se detectan con mucha frecuencia. Los hallazgos reiterados de determinados compuestos por parte de investigaciones independientes ofrecen una idea sobre los plaguicidas a los que se debe dar prioridad en cualquier programa de seguimiento.
- Incluir además los principales metabolitos y productos de transformación de los analitos, para favorecer la identificación de todos los compuestos presentes en la muestra e incluidos en el alcance analítico.
- Analizar diferentes matrices apícolas con propiedades fisicoquímicas diversas. La naturaleza de las matrices apícolas determina qué tipo de contaminantes se acumulará mayoritariamente en cada una, provocando que un estudio centrado únicamente en una matriz resulte poco representativo de toda la colonia.

2.3.3. Ciencia ciudadana

Los resultados de los programas de monitorización atraen cada vez más al público general, que está progresivamente más interesado en la protección de las abejas y el medioambiente, así como en la reducción del uso de productos fitosanitarios. Todo esto queda patente en el aumento del consumo de productos ecológicos (en torno a un 250 % de aumento en la superficie agrícola ecológica en España entre 2012 y 2020), y en las acciones ciudadanas encaminadas a proteger el medioambiente y a las abejas [171].

De profesión, actor (y apicultor)

En 2019, el actor Morgan Freeman convirtió su rancho de 50 hectáreas en un santuario para abejas. El actor ha aprovechado además varias entrevistas recientes para hablar sobre su experiencia con la apicultura y la necesidad de proteger a estos animales. El rancho, situado en el estado de Misisipi de Estados Unidos, cuenta con al menos 26 colmenas que el actor afirma cuidar personalmente [172]. Por su parte, Leonardo DiCaprio ha utilizado sus redes sociales para difundir mensajes sobre la importancia de las abejas y los riesgos a los que se enfrentan. Este tipo de declaraciones realizadas por personajes célebres ayudan a despertar la conciencia social y a, poco a poco, implicar a la población en la conservación y cuidado de ésta y otras especies.

La mayor implicación de la sociedad en este tipo de estudios puede resultar en un cambio de paradigma relacionado con su organización: en los últimos años, la ciencia ciudadana ha adquirido una mayor presencia en numerosos ámbitos relacionados con la investigación. Esta práctica se basa en la participación del público no especializado en diferentes etapas de la experimentación científica, especialmente en la recogida de datos y muestras. Los programas de investigación basados en ciencia ciudadana pueden recoger enormes cantidades de información, permitiendo así realizar estudios mucho más amplios de forma sencilla y sin necesidad de mayor financiación. Sin embargo, estos estudios presentan el reto añadido de facilitar la comunicación entre organizadores y voluntarios, además de asegurar una organización eficiente con un gran número de participantes y mantener el interés y la implicación de los mismos durante todo el proyecto [173].

Los científicos ciudadanos pueden tener diferentes grados de conocimiento en el tema de la investigación, incluyendo desde niños hasta personas especializadas como aficionados a la astronomía, ornitólogos o apicultores. Existen formas tan sencillas de participación como aplicaciones para ordenadores y móviles que permiten a los científicos recoger datos de los usuarios a medida que las utilizan. Por ejemplo, el juego online *Eyewire* es un puzle tridimensional que proporciona información sobre el procesamiento de la visión en el cerebro humano y que cuenta con más de 150 000 jugadores procedentes de 145 países [174]. Otros proyectos requieren que los participantes recolecten muestras o tomen imágenes que después son analizadas en un laboratorio o procesadas por los organizadores, respectivamente.

La ciencia ciudadana es particularmente útil en el campo de la ecología, donde permite entender procesos que tienen lugar a gran escala en el medioambiente y que son imposibles de muestrear de forma extensiva utilizando los modelos de investigación tradicionales (la obtención de muestras es una de las mayores limitaciones en una evaluación ambiental). A través de este tipo de proyectos se han podido monitorizar diferentes especies de plantas y animales, lo que permite evaluar el estado del medioambiente y los ecosistemas. En el campo de la apicultura, el proyecto *The Great Sunflower* surgió en 2008 con el objetivo de comprender las dinámicas poblacionales de las abejas y otros polinizadores en diferentes entornos [175]. Sus más de 100 000 participantes recogen información sobre las visitas de insectos polinizadores a girasoles plantados cerca de sus hogares, permitiendo así evaluar el estado de las colonias en diferentes zonas de Estados Unidos y las posibles causas de su disminución. De forma similar, el grupo *The Bee Conservancy* ha desarrollado una aplicación móvil para que cualquier usuario pueda enviar imágenes de polinizadores desde diferentes zonas [176]. En otros casos se requiere de la participación de apicultores como científicos ciudadanos, ya que éstos pueden aportar información más específica y participar en la toma de muestras apícolas. Es el caso de la asociación *Bee Informed Partnership*, que organiza diferentes investigaciones gracias a la participación de apicultores que proporcionan muestras de abejas e información de primera mano sobre plagas y otros indicadores del estado de las colonias [177]. El auge de este tipo de programas permitirá realizar evaluaciones más precisas sobre las causas del declive en las poblaciones de polinizadores, así como su relación con el uso de productos fitosanitarios y la presencia en los ecosistemas de otros contaminantes ambientales.

2.3.4. Muestreo pasivo

Tal y como se ha descrito previamente, las abejas melíferas acumulan en sus colmenas los plaguicidas a los que están expuestas a través del contacto directo y el consumo de matrices contaminadas como la cera, el polen, la miel o el néctar. De este modo, podría argumentarse que las abejas melíferas concentran todas las rutas de los contaminantes presentes en la colonia, lo que las convertiría en la matriz más representativa para la evaluación ambiental y de riesgos. Sin embargo, los plaguicidas presentes en las abejas melíferas no proporcionan necesariamente una información completa debido a (a) los rápidos procesos de biotransformación y excreción que sufren los plaguicidas en el organismo, y (b) a la falta de representatividad de toda la colonia debido al reducido número de abejas muestreadas (cada análisis utiliza menos de 50 abejas en colmenas que suelen superar los 10 000 individuos). El análisis de estos organismos podría presentar, además, implicaciones éticas debido a la necesidad de matar a los organismos a los que se intenta proteger.

El polen es otra de las matrices apícolas más utilizadas para la determinación de plaguicidas. Es además la matriz apícola que está más intensamente ligada con los puntos de aplicación de los plaguicidas, y no presenta un carácter particularmente lipófilo ni hidrófilo, por lo que puede adsorber en su superficie productos de diferente polaridad con más facilidad que la miel o la cera. Por otro lado, su marcada porosidad favorece la acumulación de sustancias en su superficie (*véase* ***Figura 5***). Sin embargo, la disponibilidad de esta matriz es limitada, ya que sólo podrá obtenerse de las colmenas cuando las abejas hayan salido a recolectarlo; así pues, su ausencia de las colmenas pondrá en riesgo la viabilidad de las campañas de monitorización. Esto dificulta o incluso impide, a su vez, la utilización reiterada de una misma colmena para numerosos análisis secuenciales, pues puede llegar un momento en que se hayan consumido todos los recursos de las abejas y se produzca la desaparición de la colonia. El mismo problema se da con el análisis de otras matrices como miel, cera, pan de abeja o propóleo y se potencia con el muestreo conjunto de varias matrices, necesario para obtener una imagen completa de los contaminantes presentes en la colmena.

Por último, el análisis de fragmentos de panal permite solucionar la falta de representatividad asociada al análisis de un solo tipo de matriz apícola: al estar compuesto por una mezcla de matrices con distinta naturaleza y propiedades, puede proporcionar una imagen más amplia de la contaminación en la colonia. Sin embargo, como se mencionó en secciones anteriores, el muestreo de este tipo de matriz es de los más dañinos para la colonia al consumir buena parte de los recursos de las abejas. Además, la diferente proporción de cada componente en estas muestras resulta en una diferente acumulación de contaminantes en las muestras, dificultando así su comparación.

Por otro lado, la elección de un determinado método de extracción de contaminantes puede afectar a la recuperación de los diferentes analitos. En general, cada autor introduce ciertas variaciones al proceso de tratamiento de muestra en función de la matriz, lo que podría tener efectos sobre la recuperación de los contaminantes acumulados en ella. Esto dificulta aún más la obtención de resultados representativos en un determinado estudio y, por ende, la comparación entre diferentes trabajos cuando no existe una validación.

En general, el muestreo activo conlleva la pérdida de alimentos almacenados, de partes completas de las colmenas o incluso de individuos activos ocasionando así graves perjuicios en las colonias, lo cual resulta contradictorio si uno de los objetivos de dichos muestreos consiste en determinar las causas del declive de sus poblaciones. En este contexto, un enfoque no destructivo basado en muestreo pasivo permite minimizar las interacciones humanas con las colonias y realizar múltiples muestreos (en el marco de programas de monitorización a gran escala) sobre una misma colmena sin deteriorarla, superando además las implicaciones éticas del muestreo de organismos vivos y/o sus recursos. El uso de un muestreador que tuviera la suficiente versatilidad para captar contaminantes con propiedades muy diferentes permitiría además simplificar enormemente el proceso de análisis, pues se reduciría el número de matrices necesarias para obtener información precisa de todos los contaminantes presentes en la colmena, independientemente de su naturaleza.

En la actualidad ya existen algunos trabajos que describen este tipo de muestreos, como el realizado en 2019 por Bullock *et al.,* quienes emplearon pulseras de silicona colocadas en diferentes puntos de las colmenas para determinar la presencia de diferentes productos naturales de carácter lipofílico [178].

Diseño de muestreadores pasivos: sustancias adsorbentes

La mayoría de las sustancias adsorbentes pueden englobarse en dos grandes grupos: las estructuras derivadas de carbón y los polímeros orgánicos porosos. El primer grupo incluye los adsorbentes basados en carbón poroso, activo o en forma de tamices moleculares [179]. En algunos de estos adsorbentes puede producirse, en ocasiones, la unión preferente e irreversible de compuestos polares o incluso agua en estado gaseoso, lo que interfiere en su capacidad de absorción de analitos [180,181]. Por el contrario, existen otros adsorbentes basados en carbono con un carácter marcadamente hidrófobo, como las estructuras de carbono grafitizado [182]. Los polímeros orgánicos porosos, por su parte, pueden tener composiciones y propiedades muy diferentes: por ejemplo, las resinas XAD, empleadas para el muestreo de contaminantes ambientales en aire [183], presentan una baja estabilidad térmica (de menos de 200 °C), mientras que otros polímeros pueden soportar hasta 400 °C [184].

Entre los adsorbentes más versátiles, térmicamente estables y con mayor aplicación se encuentra el Tenax® (en adelante, Tenax), nombre comercial del poli(óxido de 2,6-difenil-*p*-fenileno). Se trata de un polímero poroso derivado del 2,6-difenilfenol que tiene importantes aplicaciones en el muestreo de compuestos orgánicos volátiles en muestras de aire, tanto por muestreo pasivo como activo [185–187], así como hidrocarburos aromáticos policíclicos en agua o suelo [188–190], entre otros. Las uniones de los analitos al Tenax son en general fácilmente reversibles mediante el uso de disolventes orgánicos o altas temperaturas, lo que facilita su posterior desorción tanto térmica como mediante disolventes, en función del tipo de analitos y de la técnica instrumental empleada. Por otro lado, la estructura porosa del Tenax se asemeja a la del polen, lo que facilita la acumulación de sustancias como plaguicidas en la superficie de ambas matrices (**Figura 12**).

El Tenax se ha descrito también en numerosos trabajos como adsorbente para el muestreo de plaguicidas en muestras de aire [191–193], lo cual demuestra su potencial para el muestreo de contaminantes ambientales a través de colonias de abejas. Además, el Tenax presenta una propiedad que puede resultar especialmente útil para su uso en muestreadores apícolas: su solubilidad en disolventes organoclorados. Esta cualidad permite crear láminas de Tenax con una superficie uniforme pero que conservan la capacidad de adsorción de las partículas sólidas [194], lo que evita la necesidad de introducir las pequeñas partículas de Tenax en el interior de las colmenas.

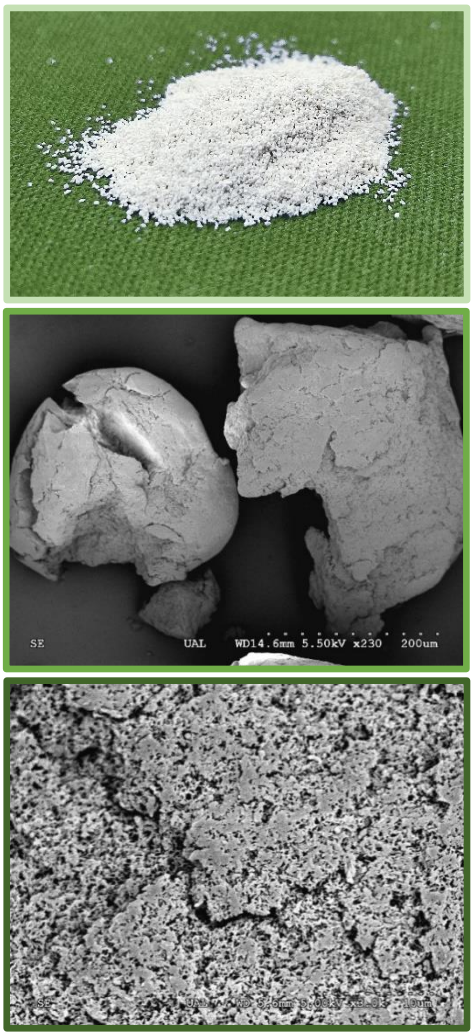


Figura 12. Partículas de Tenax a escala macroscópica y microscópica (imágenes microscópicas adquiridas mediante Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución de Emisión de Campo) junto a su fórmula química

2.4. EL PROYECTO INSIGNIA

El proyecto INSIGNIA (*Pilot study on environmental monitoring of pesticide use through honey bees*, número SANTE/2018/E4/SI2.788418-SI2.788452) comenzó en 2018 con la participación de 17 grupos de investigación y entidades procedentes de diferentes países europeos, entre los que se incluía la Universidad de Almería (representada por el grupo de investigación del Prof. Dr. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba), junto a expertos en diferentes disciplinas como la apicultura, la química o la estadística y la modelización. Fue dirigido por Jozef J. M. Van der Steen y estuvo financiado por la *European Commission* con más de 1 000 000 €. Los principales objetivos establecidos para sus 30 meses de duración fueron:

1. Desarrollo de un protocolo de monitorización ambiental (biodiversidad y presencia de plaguicidas) a través de colmenas de abeja melífera.
2. Aplicación a gran escala de dicho protocolo a través de ciencia ciudadana en múltiples países.

El protocolo de monitorización ambiental incluía, por un lado, el análisis de polen mediante caracterización genética *(metabarcoding)* para evaluar la biodiversidad vegetal disponible para las abejas como alimento y, por otro lado, la identificación de los plaguicidas acumulados en el interior de las colmenas. Mientras que la primera parte requiere necesariamente del muestreo activo de polen, el análisis de plaguicidas podía hacerse a través de matrices apícolas o a través de un muestreador pasivo. Durante el primer año de proyecto (2019), el equipo de la Universidad de Almería trabajó en el desarrollo de un nuevo muestreador pasivo (no biológico) para el análisis de plaguicidas en colmenas de abejas: la APIStrip (*Adsorb-Pesticide-Inhive Strip*). Los contaminantes detectados a través de estos muestreadores fueron a continuación comparados con aquéllos identificados en muestras de fragmentos de panal y pan de abeja procedentes de las mismas colonias. En base a los resultados de esta comparación, se seleccionó la APIStrip como la matriz óptima para ser incluida en el protocolo final de monitorización.

Así, mientras que el primer año de proyecto se centró en el desarrollo de un procedimiento de monitorización y en la realización de pruebas a pequeña escala, el segundo año implicó estrategias de ciencia ciudadana para aplicar el protocolo final a gran escala. En esta segunda etapa participaron 81 apicultores que actuaron como científicos ciudadanos en nueve países europeos, recogiendo un total de 1620 muestras. Dos características principales permitieron realizar tal monitorización utilizando una cantidad limitada de recursos: la ciencia ciudadana, ya que los propios apicultores de diferentes países estaban a cargo de los muestreos, y el uso de colmenas de abeja como puntos de muestreo, que permitió evaluar la contaminación en zonas amplias de terreno a través de una única muestra. En este aspecto, además, el empleo de muestreadores pasivos resultó un factor determinante para asegurar la disponibilidad de muestras durante todo el periodo de muestreo (de seis meses de duración), así como para minimizar el impacto producido en las colonias empleadas.

Consorcio del proyecto INSIGNIA durante una reunión en la Universidad de Almería (enero 2020)

2.4.1. INSIGNIA-EU

Tanto el protocolo desarrollado como los resultados obtenidos y la ejecución general valieron al consorcio del proyecto INSIGNIA la obtención de un segundo proyecto que fue ideado como una ampliación del proyecto inicial y que recibió el nombre de INSIGNIA-EU (09.200200/2021/864096/SER/ENV.D.2). Este nuevo proyecto tiene también 30 meses de duración, pero su financiación asciende a 4 002 077.00 € (cuatro veces superior a la del INSIGNIA original). Las ampliaciones descritas en el nuevo proyecto se dividen en dos bloques:

a) Naturaleza de los contaminantes analizados. Mientras que el primer proyecto se centró únicamente en plaguicidas, el INSIGNIA-EU incluye además el análisis de otros contaminantes ambientales como microplásticos, materia particulada, PAHs, VOCs y metales pesados. De nuevo, el primer año de proyecto está centrado en determinar la matriz más adecuada para el análisis de cada grupo de contaminantes, ya sean muestras apícolas o no biológicas.

b) Número de puntos de muestreo. Los países participantes se ampliaron desde los nueve iniciales hasta los 27 que conforman la Unión Europea. Además, se adaptó el número de apicultores (científicos ciudadanos) de cada uno de estos países en función de su extensión geográfica, el uso de terreno y el número de colmenas: en los muestreos a gran escala del INSIGNIA-EU, participarán 315 apicultores.

Este nuevo proyecto seguirá regido por los dos pilares fundamentales de su predecesor: la ciencia ciudadana y el uso de muestreadores pasivos. De este modo, se desarrollarán nuevas estrategias como alternativa al análisis de microplásticos en matrices apícolas, y los muestreadores pasivos desarrollados durante el proyecto inicial serán evaluados para el análisis de PAHs y VOCs.

Se espera que el INSIGNIA-EU permita obtener la primera monitorización ambiental estandarizada a escala europea a través de colmenas de abejas gracias a la colaboración de una red de apicultores que realicen sus propios muestreos como científicos ciudadanos. De tener éxito, los resultados permitirían ampliar el conocimiento sobre la contaminación antropogénica en toda la Unión Europea, permitiendo la identificación de áreas de alta y baja contaminación, así como la naturaleza química de dicha contaminación.

3. REFERENCIAS

[1] Homero, La Odisea; traducción de la versión en inglés y en prosa de Samuel Butler (1900), Clásicos liberados: Blackie Books, 2020.

[2] J.A. Turner, ed., The pesticide manual : a world compendium, British Crop Production Council, 2018.

[3] FAOSTAT, Pesticides indicators, (2022). https://www.fao.org/faostat/en/#data/EP (accessed April 26, 2022).

[4] J.P.G. Webster, R.G. Bowles, N.T. Williams, Estimating the economic benefits of alternative pesticide usage scenarios: Wheat production in the United Kingdom, Crop Prot. 18 (1999) 83–89. https://doi.org/10.1016/S0261-2194(98)00085-4.

[5] M. Eddleston, Poisoning by pesticides, Med. (United Kingdom). 48 (2020) 214–217. https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.12.019.

[6] K.H. Kim, E. Kabir, S.A. Jahan, Exposure to pesticides and the associated human health effects, Sci. Total Environ. 575 (2017) 525–535. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009.

[7] A.F. Hernández, T. Parrón, A.M. Tsatsakis, M. Requena, R. Alarcón, O. López-Guarnido, Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health, Toxicology. 307 (2013) 136–145. https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.06.009.

[8] Official Journal of the European Union, Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC, The European Parliament and the Council of the European Union, 2009.

[9] Official Journal of the European Union, Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides, 2009.

[10] Official Journal of the European Union, Regulation (EC) NO 396/2005 of the European Parliament and the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, 2005.

[11] Official Journal of the European Union, Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, 2012.

[12] D. Barceló, M.C. Hennion, Trace Determination of pesticides and their degradation products in water, Elsevier, 1997.

[13] P. Fantke, R. Juraske, Variability of pesticide dissipation half-lives in plants, Environ. Sci. Technol. 47 (2013) 3548–3562. https://doi.org/10.1021/es303525x.

[14] IUPAC, IUPAC Pesticides Properties Database, (2022). https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/ (accessed April 26, 2022).

[15] Official Journal of the European Union, Commission Decision of 24 June 2011 on establishing the ecological criteria for the award of the EU Ecolabel to lubricants; 2011/381/EU, (2011).

[16] C.G. Bortleson, D.A. Davis, Pesticides in Selected Small Streams in the Puget Sound Basin, 1987-1995, U.S. Geological Survey, (1997) 1–4.

[17] M. Tankiewicz, J. Fenik, M. Biziuk, Determination of organophosphorus and organonitrogen pesticides in water samples, TrAC Trends Anal. Chem. 29 (2010) 1050–1063. https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2010.05.008.

[18] M.D. Taylor, S.J. Klaine, F.P. Carvalho, D. Barcelo, J. Everaarts, Pesticide Residues in Coastal Tropical Ecosystems, CRC Press, London, 2002. https://doi.org/10.1201/9780203165584.

[19] L. Vera-Herrera, C.V.M. Araújo, A. Cordero-de-Castro, J. Blasco, Y. Picó, Assessing the colonization by Daphnia magna of pesticide-disturbed habitats (chlorpyrifos, terbuthylazine and their mixtures) and the behavioral and neurotoxic effects, Environ. Pollut. 311 (2022) 119983. https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2022.119983.

[20] E. Malusá, M. Tartanus, W. Danelski, A. Miszczak, E. Szustakowska, J. Kicińska, E.M. Furmanczyk, Monitoring of DDT in Agricultural Soils under Organic Farming in Poland and the Risk of Crop Contamination, Environ. Manage. 66 (2020) 916–929. https://doi.org/10.1007/S00267-020-01347-9/TABLES/2.

[21] V. Andreu, Y. Picó, Determination of pesticides and their degradation products in soil: Critical review and comparison of methods, TrAC - Trends Anal. Chem. 23 (2004) 772–789. https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.008.

[22] M.S. Majewski, P.D. Capel, Pesticides in the atmosphere: distribution, trends and governing factors, U.S. Geological Survey, 1995.

[23] G.L. Daly, Y.D. Lei, C. Teixeira, D.C.G. Muir, L.E. Castillo, L.M.M. Jantunen, F. Wania, Organochlorine pesticides in the soils and atmosphere of Costa Rica, Environ. Sci. Technol. 41 (2007) 1124–1130. https://doi.org/10.1021/es062349d.

[24] H. Iwata, S. Tañaba, N. Sakai, R. Tatsukawa, Distribution of Persistent Organochlorines in the Oceanic Air and Surface Seawater and the Role of Ocean on Their Global Transport and Fate, Environ. Sci. Tochnol. 27 (1993) 1080–1098. https://pubs.acs.org/sharingguidelines (accessed May 16, 2022).

[25] J.R. Garbarino, E. Snyder-Conn, T.J. Leiker, G.L. Hoffman, Contaminants in artic snow collected over Northwest Alaskan sea ice, Springer, 2002.

[26] L. Feld, M.H. Hjelmsø, M.S. Nielsen, A.D. Jacobsen, R. Rønn, F. Ekelund, P.H. Krogh, B.W. Strobel, C.S. Jacobsen, Pesticide side effects in an agricultural soil ecosystem as measured by amoA expression quantification and bacterial diversity changes, PLoS One. 10 (2015) 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126080.

[27] J.E. Fox, J. Gulledge, E. Engelhaupt, M.E. Burow, J.A. McLachlan, Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 (2007) 10282–10287. https://doi.org/10.1073/pnas.0611710104.

[28] J.S. Lim, H.-K. Son, S.-K. Park, D.R. Jacobs, D.-H. Lee, Inverse associations between long-term weight change and serum concentrations of persistent organic pollutants, Int. J. Obes. 35 (2011) 744–747. https://doi.org/10.1038/ijo.2010.188.

[29] S.O. Pehkonen, Q. Zhang, The Degradation of Organophosphorus Pesticides in Natural Waters: A Critical Review, Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10643380290813444. 32 (2010) 17–72. https://doi.org/10.1080/10643380290813444.

[30] S. KUMAR, G. KAUSHIK, M.A. DAR, S. NIMESH, U.J. LÓPEZ-CHUKEN, J.F. VILLARREAL-CHIU, Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review, Pedosphere. 28 (2018) 190–208. https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60017-7.

[31] E. Chamberlain, H. Shi, T. Wang, Y. Ma, A. Fulmer, C. Adams, Comprehensive screening study of pesticide degradation via oxidation and hydrolysis, J. Agric. Food Chem. 60 (2012) 354–363. https://doi.org/10.1021/jf2033158.

[32] C.K. Remucal, The role of indirect photochemical degradation in the environmental fate of pesticides: A review, Environ. Sci. Process. Impacts. 16 (2014) 628–653. https://doi.org/10.1039/c3em00549f.

[33] J.J. Menn, Comparative aspects of pesticide metabolism in plants and animals, Environ. Health Perspect. Vol. 27 (1978) 113–124. https://doi.org/10.1289/EHP.7827113.

[34] W.G. Aker, X. Hu, P. Wang, H.M. Hwang, Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish Ictalurus furcatus, Environ. Toxicol. 23 (2008) 548–554. https://doi.org/10.1002/TOX.20371.

[35] C. Cámara Rica, Toma y tratamiento de muestras, Síntesis S.A., 2002.

[36] Ł. Rajski, F.J. Díaz Galiano, V. Cutillas, A.R. Fernández-Alba, Coupling ion chromatography to Q-orbitrap for the fast and robust analysis of anionic pesticides in fruits and vegetables, J. AOAC Int. 101 (2018) 1–8. https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0410.

[37] S. Uclés, E. Hakme, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, Analysis of thermally labile pesticides by on-column injection gas chromatography in fruit and vegetables, Anal. Bioanal. Chem. 2018 41026. 410 (2018) 6861–6871. https://doi.org/10.1007/S00216-018-1286-1.

[38] S. Wahab, K. Muzammil, N. Nasir, M.S. Khan, M.F. Ahmad, M. Khalid, W. Ahmad, A. Dawria, L.K.V. Reddy, A.M. Busayli, Advancement and New Trends in Analysis of Pesticide Residues in Food: A Comprehensive Review, Plants. 11 (2022). https://doi.org/10.3390/plants11091106.

[39] European Commission, SANTE 11312/2021 – Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 2021.

[40] F.J. Díaz-Galiano, H. Heinzen, M.J. Martínez-Bueno, Ł. Rajski, A.R. Fernández-Alba, Use of high-resolution mass spectrometry for the first-time identification of gerberin as a tentative marker of the fraudulent organic production of tomatoes, J. Food Compos. Anal. 112 (2022) 104662. https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2022.104662.

[41] T. Walker, Pollination: The Enduring Relationship between Plant and Pollinator, Princeton University Press, 2020.

[42] J. Ollerton, R. Winfree, S. Tarrant, How many flowering plants are pollinated by animals?, Oikos. 120 (2011) 321–326. https://doi.org/10.1111/J.1600-0706.2010.18644.X.

[43] A.M. Klein, B.E. Vaissière, J.H. Cane, I. Steffan-Dewenter, S.A. Cunningham, C. Kremen, T. Tscharntke, Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 274 (2007) 303–313. https://doi.org/10.1098/RSPB.2006.3721.

[44] A.B. Barron, J.A. Plath, The evolution of honey bee dance communication: a mechanistic perspective, (2017). https://doi.org/10.1242/jeb.142778.

[45] L. Bortolotti, C. Costa, Chemical Communication in the Honey Bee Society, in: Neurobiol. Chem. Commun., CRC Press/Taylor & Francis, 2014: pp. 147–210. https://doi.org/10.1201/b16511.

[46] S.A.M. Khalifa, E.H. Elshafiey, A.A. Shetaia, A.A.A. El-Wahed, A.F. Algethami, S.G. Musharraf, M.F. Alajmi, C. Zhao, S.H.D. Masry, M.M. Abdel-Daim, M.F. Halabi, G. Kai, Y. Al Naggar, M. Bishr, M.A.M. Diab, H.R. El-Seedi, Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production, Insects. 12 (2021). https://doi.org/10.3390/INSECTS12080688.

[47] N.W. Calderone, Insect Pollinated Crops, Insect Pollinators and US Agriculture: Trend Analysis of Aggregate Data for the Period 1992–2009, PLoS One. 7 (2012) e37235. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037235.

[48] Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Programa nacional de ayudas a la apicultura 2020-2022, 2019.

[49] S.G. Potts, J.C. Biesmeijer, C. Kremen, P. Neumann, O. Schweiger, W.E. Kunin, Global pollinator declines: trends, impacts and drivers, Trends Ecol. Evol. 25 (2010) 345–353. https://doi.org/10.1016/J.TREE.2010.01.007.

[50] E. Stokstad, The case of the empty hives, Science (80-.). 316 (2007) 970–972. https://doi.org/10.1126/science.316.5827.970.

[51] P. Neumann, N.L. Carreck, Honey bee colony losses, J. Apic. Res. 49 (2010) 1–6. https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01.

[52] D. Goulson, E. Nicholls, C. Botías, E.L. Rotheray, Bee declines driven by combined Stress from parasites, pesticides, and lack of flowers, Science (80-.). 347 (2015). https://doi.org/10.1126/science.1255957.

[53] N. Simon-Delso, G.S. Martin, E. Bruneau, L.A. Minsart, C. Mouret, L. Hautier, Honeybee colony disorder in crop areas: The role of pesticides and viruses, PLoS One. 9 (2014) 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103073.

[54] Adam J. Vanbergen, A cocktail of pesticides, parasites and hunger leaves bees down and out, Nature. 596 (2021) 351–353. https://doi.org/10.1038/d41586-021-02079-4.

[55] J.C. Biesmeijer, S.P.M. Roberts, M. Reemer, R. Ohlemüller, M. Edwards, T. Peeters, A.P. Schaffers, S.G. Potts, R. Kleukers, C.D. Thomas, J. Settele, W.E. Kunin, Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands, Science (80-.). 313 (2006) 351–354. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1127863.

[56] G.C. Nelson, Drivers of Ecosystem Change: Summary Chapter, in: Ecosyst. Hum. Well-Being Curr. State Trends, 2005: pp. 73–76.

[57] BOE núm. 131 (BOE-A-2006-9740), Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo, por el que se establece y regula un Programa nacional de lucha y control de las enfermedades de las abejas de la miel, 2006. https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2006-9740 (accessed May 11, 2022).

[58] D. Laurino, S. Lioy, L. Carisio, A. Manino, M. Porporato, Vespa velutina: An Alien Driver of Honey Bee Colony Losses, Divers. 2020, Vol. 12, Page 5. 12 (2019) 5. https://doi.org/10.3390/D12010005.

[59] H.M. Alfallah, M. Alfituri, M. Hmuda, The impact of bee eater Merops apiaster on the behavior of honey bee (Apis mellifera L.) during foraging, J. Plant Prot. Path., Mansoura Univ. 1 (2010) 1023–1034.

[60] T. Ya, X. Jia-sui, C. Keming, Hand pollination of pears and its implications for biodiversity conservation and environmental protection - A case study from Hanyuan County, Sichuan Province, China, Available at: Https://Buckfastimker.Files.Wordpress.Com/2016/05/Handbestuivingchina.Pdf. (2006) 1–22.

[61] J.P. Van der Sluijs, N. Simon-Delso, D. Goulson, L. Maxim, J.M. Bonmatin, L.P. Belzunces, Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services, Curr. Opin. Environ. Sustain. 5 (2013) 293–305. https://doi.org/10.1016/J.COSUST.2013.05.007.

[62] E.C. Yang, H.C. Chang, W.Y. Wu, Y.W. Chen, Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage, PLoS One. 7 (2012) e49472. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0049472.

[63] A. Wade, C.H. Lin, C. Kurkul, E.R. Regan, R.M. Johnson, Combined Toxicity of Insecticides and Fungicides Applied to California Almond Orchards to Honey Bee Larvae and Adults, Insects 2019, Vol. 10, Page 20. 10 (2019) 20. https://doi.org/10.3390/INSECTS10010020.

[64] P. Dai, C.J. Jack, A.N. Mortensen, J.D. Ellis, Acute toxicity of five pesticides to Apis mellifera larvae reared in vitro, Pest Manag. Sci. 73 (2017) 2282–2286. https://doi.org/10.1002/PS.4608.

[65] A. Prado, M. Pioz, C. Vidau, F. Requier, M. Jury, D. Crauser, J.L. Brunet, Y. Le Conte, C. Alaux, Exposure to pollen-bound pesticide mixtures induces longer-lived but less efficient honey bees, Sci. Total Environ. 650 (2019) 1250–1260. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.102.

[66] J.Y. Wu, C.M. Anelli, W.S. Sheppard, Sub-Lethal Effects of Pesticide Residues in Brood Comb on Worker Honey Bee (Apis mellifera) Development and Longevity, PLoS One. 6 (2011) e14720. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0014720.

[67] L. Carrasco-Letelier, Y. Mendoza-Spina, M.B. Branchiccela, Acute contact toxicity test of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the southwestern zone of Uruguay, Chemosphere. 88 (2012) 439–444. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.02.062.

[68] L. Bakker, W. van der Werf, P. Tittonell, K.A.G. Wyckhuys, F.J.J.A. Bianchi, Neonicotinoids in global agriculture: evidence for a new pesticide treadmill?, Ecol. Soc. Publ. Online Sep 29, 2020 | Doi10.5751/ES-11814-250326. 25 (2020) 1–22. https://doi.org/10.5751/ES-11814-250326.

[69] D.W. Roubik, Ups and Downs in Pollinator Populations: When is there a Decline?, Conserv. Ecol. Publ. Online Apr 05, 2001 | Doi10.5751/ES-00255-050102. 5 (2001). https://doi.org/10.5751/ES-00255-050102.

[70] FAO, Risk Profiles for Focal Crops Aspects Determining the Risk of Pesticides To Wild Bees: Risk Profiles for Focal Crops, 2013.

[71] N. Silvina, J. Florencia, P. Nicolás, P. Cecilia, P. Lucía, S. Abbate, C.L. Leonidas, D. Sebastián, M. Yamandú, C. Verónica, H. Horacio, Neonicotinoids transference from the field to the hive by honey bees: Towards a pesticide residues biomonitor, Sci. Total Environ. 581–582 (2017) 25–31. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2017.01.011.

[72] S. Ghini, M. Fernández, Y. Picó, R. Marín, F. Fini, J. Mañes, S. Girotti, Occurrence and distribution of pesticides in the province of Bologna, Italy, using honeybees as bioindicators, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 47 (2004) 479–488. https://doi.org/10.1007/s00244-003-3219-y.

[73] M.B. Kirkham, J.C. Corey, Pollen as indicator of radionuclide pollution, J. Nucl. Agric. Biol. 6 (1977) 71–74.

[74] M. Beekman, F.L.W. Ratnieks, Long-range foraging by the honey-bee, Apis mellifera L., Funct. Ecol. 14 (2000) 490–496. https://doi.org/10.1046/J.1365-2435.2000.00443.X.

[75] M.E. Conti, F. Botrè, Honeybees and Their Products as Potential Bioindicators of Heavy Metals Contamination, Environ. Monit. Assess. 2001 693. 69 (2001) 267–282. https://doi.org/10.1023/A:1010719107006.

[76] M.F. Sari, F. Esen, Y. Tasdemir, Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) in honeybees and bee products and their evaluation with ambient air concentrations, Atmos. Environ. 244 (2021) 117903. https://doi.org/10.1016/J.ATMOSENV.2020.117903.

[77] O. Lambert, B. Veyrand, S. Durand, P. Marchand, B. Le Bizec, M. Piroux, S. Puyo, C. Thorin, F. Delbac, H. Pouliquen, Polycyclic aromatic hydrocarbons: Bees, honey and pollen as sentinels for environmental chemical contaminants, Chemosphere. 86 (2012) 98–104. https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2011.09.025.

[78] I. Negri, C. Mavris, G. Di Prisco, E. Caprio, M. Pellecchia, Honey Bees (Apis mellifera, L.) as Active Samplers of Airborne Particulate Matter, PLoS One. 10 (2015) e0132491. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0132491.

[79] C. Edo, A.R. Fernández-Alba, F. Vejsnæs, J.J.M. van der Steen, F. Fernández-Piñas, R. Rosal, Honeybees as active samplers for microplastics, Sci. Total Environ. 767 (2021) 144481. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144481.

[80] É.D. Tremblay, M.O. Duceppe, G.B. Thurston, M.C. Gagnon, M.J. Côté, G.J. Bilodeau, High-resolution biomonitoring of plant pathogens and plant species using metabarcoding of pollen pellet contents collected from a honey bee hive, Environ. DNA. 1 (2019) 155–175. https://doi.org/10.1002/EDN3.17.

[81] B.T. Cenci-Goga, P. Sechi, M. Karama, R. Ciavarella, M.V. Pipistrelli, E. Goretti, A.C. Elia, T. Gardi, M. Pallottini, R. Rossi, R. Selvaggi, L. Grispoldi, Cross-sectional study to identify risk factors associated with the occurrence of antimicrobial resistance genes in honey bees Apis mellifera) in Umbria, Central Italy, Environ. Sci. Pollut. Res. 27 (2020) 9637–9645. https://doi.org/10.1007/S11356-020-07629-3/TABLES/6.

[82] G. Cilia, L. Bortolotti, S. Albertazzi, S. Ghini, A. Nanetti, Honey bee (Apis mellifera L.) colonies as bioindicators of environmental SARS-CoV-2 occurrence, Sci. Total Environ. 805 (2022) 150327. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150327.

[83] European Commission, SANTE/11956/2016 rev. 9 Technical guidelines for determining the magnitude of pesticide residues in honey and setting Maximum Residue Levels in honey, 2018.

[84] J.N.G. Marti, V. Kilchenmann, C. Kast, Evaluation of pesticide residues in commercial Swiss beeswax collected in 2019 using ultra - high performance liquid chromatographic analysis, Environ. Sci. Pollut. Res. (2022) 32054–32064. https://doi.org/10.1007/s11356-021-18363-9.

[85] R. Végh, C. Sörös, N. Majercsik, L. Sipos, Determination of Pesticides in Bee Pollen : Validation of a

Multiresidue High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / Mass Spectrometry Method and Testing Pollen Samples of Selected Botanical Origin, (2022). https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c06864.

[86] K.S. Traynor, S. Tosi, K. Rennich, N. Steinhauer, E. Forsgren, R. Rose, G. Kunkel, S. Madella, D. Lopez, H. Eversole, R. Fahey, J. Pettis, J.D. Evans, Dennis vanEngelsdorp, Pesticides in honey bee colonies: Establishing a baseline for real world exposure over seven years in the USA, Environ. Pollut. 279 (2021) 116566. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116566.

[87] J. Xiao, Q. He, Q. Liu, Z. Wang, F. Yin, Y. Chai, Q. Yang, X. Jiang, M. Liao, L. Yu, W. Jiang, H. Cao, Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment, Sci. Total Environ. 805 (2022) 150292. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150292.

[88] C. Friedle, K. Wallner, P. Rosenkranz, D. Martens, W. Vetter, Pesticide residues in daily bee pollen samples (April–July) from an intensive agricultural region in Southern Germany, Environ. Sci. Pollut. Res. 28 (2021) 22789–22803. https://doi.org/10.1007/s11356-020-12318-2.

[89] R. Raimets, A. Bontšutšnaja, V. Bartkevics, I. Pugajeva, T. Kaart, L. Puusepp, P. Pihlik, I. Keres, H. Viinalass, M. Mänd, R. Karise, Pesticide residues in beehive matrices are dependent on collection time and matrix type but independent of proportion of foraged oilseed rape and agricultural land in foraging territory, Chemosphere. 238 (2020). https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124555.

[90] N. El Agrebi, K. Traynor, O. Wilmart, S. Tosi, L. Leinartz, E. Danneels, D.C. de Graaf, C. Saegerman, Pesticide and veterinary drug residues in Belgian beeswax: Occurrence, toxicity, and risk to honey bees, Sci. Total Environ. 745 (2020) 141036. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141036.

[91] V. Bommuraj, Y. Chen, H. Klein, R. Sperling, S. Barel, J.A. Shimshoni, Pesticide and trace element residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration, Food Chem. 299 (2019) 125123. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125123.

[92] A. Lozano, M.D. Hernando, S. Uclés, E. Hakme, A.R. Fernández-Alba, Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products, Food Chem. 274 (2019) 61–70. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.055.

[93] A.I. García-Valcárcel, M.T. Martínez-Ferrer, J.M. Campos-Rivela, M.D. Hernando Guil, Analysis of pesticide residues in honeybee (Apis mellifera L.) and in corbicular pollen. Exposure in citrus orchard with an integrated pest management system, Talanta. 204 (2019) 153–162. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.106.

[94] N. Ostiguy, F.A. Drummond, K. Aronstein, B. Eitzer, J.D. Ellis, M. Spivak, W.S. Sheppard, Honey bee exposure to pesticides: A four-year nationwide study, Insects. 10 (2019) 1–34. https://doi.org/10.3390/insects10010013.

[95] P. Calatayud-Vernich, F. Calatayud, E. Simó, Y. Picó, Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: Assessing beehive exposure, Environ. Pollut. 241 (2018) 106–114. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.062.

[96] G. Daniele, B. Giroud, C. Jabot, E. Vulliet, Exposure assessment of honeybees through study of hive matrices: analysis of selected pesticide residues in honeybees, beebread, and beeswax from French beehives by LC-MS/MS, Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (2018) 6145–6153. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9227-7.

[97] M.D. Gil García, M. Martínez Galera, S. Uclés, A. Lozano, A.R. Fernández-Alba, Ultrasound-assisted extraction based on QuEChERS of pesticide residues in honeybees and determination by LC-MS/MS and GC-MS/MS, Anal. Bioanal. Chem. 410 (2018) 5195–5210. https://doi.org/10.1007/s00216-018-1167-7.

[98] Z. Bargańska, P. Konieczka, J. Namieśnik, Comparison of two methods for the determination of selected pesticides in honey and honeybee samples, Molecules. 23 (2018). https://doi.org/10.3390/molecules23102582.

[99] S. Tosi, C. Costa, U. Vesco, G. Quaglia, G. Guido, A 3-year survey of Italian honey bee-collected pollen reveals widespread contamination by agricultural pesticides, Sci. Total Environ. 615 (2018) 208–218. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.226.

[100] F. Böhme, G. Bischoff, C.P.W. Zebitz, P. Rosenkranz, K. Wallner, Pesticide residue survey of pollen loads

collected by honeybees (Apis mellifera) in daily intervals at three agricultural sites in South Germany, PLoS One. 13 (2018) 1–21. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199995.

[101] M. Perugini, S.M.R. Tulini, D. Zezza, S. Fenucci, A. Conte, M. Amorena, Occurrence of agrochemical residues in beeswax samples collected in Italy during 2013–2015, Sci. Total Environ. 625 (2018) 470–476. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.321.

[102] A. Kumar, J.P.S. Gill, J.S. Bedi, A. Kumar, Pesticide residues in Indian raw honeys, an indicator of environmental pollution, Environ. Sci. Pollut. Res. 25 (2018) 34005–34016. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3312-4.

[103] D.R. Amulen, P. Spanoghe, M. Houbraken, A. Tamale, Di.C. De Graaf, P. Cross, G. Smagghe, Environmental contaminants of honeybee products in Uganda detected using LC-MS/MS and GC-ECD, PLoS One. 12 (2017) 1–14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178546.

[104] M.D.G. García, S.U. Duque, A.B.L. Fernández, A. Sosa, A.R. Fernández-Alba, Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS, Talanta. 163 (2017) 54–64. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.083.

[105] E. Hakme, A. Lozano, M.M. Gómez-Ramos, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, Non-target evaluation of contaminants in honey bees and pollen samples by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry, Chemosphere. 184 (2017) 1310–1319. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.089.

[106] J. Harriet, J.P. Campá, M. Grajales, C. Lhéritier, A. Gómez Pajuelo, Y. Mendoza-Spina, L. Carrasco-Letelier, Agricultural pesticides and veterinary substances in Uruguayan beeswax, Chemosphere. 177 (2017) 77–83. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.131.

[107] P. Kaczynski, I. Hrynko, B. Lozowicka, Evolution of novel sorbents for effective clean-up of honeybee matrix in highly toxic insecticide LC/MS/MS analysis, Ecotoxicol. Environ. Saf. 139 (2017) 124–131. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.033.

[108] T. Kiljanek, A. Niewiadowska, M. Gaweł, S. Semeniuk, M. Borzęcka, A. Posyniak, K. Pohorecka, Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment, Chemosphere. 175 (2017) 36–44. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.028.

[109] E. Mulugeta, Physicochemical Characterization and Pesticide Residue Analysis of Honey Produced in West Shewa Zone, Oromia Region, Ethiopia, Am. J. Appl. Chem. 5 (2017) 101. https://doi.org/10.11648/j.ajac.20170506.13.

[110] P. Calatayud-Vernich, F. Calatayud, E. Simó, Y. Picó, Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax, Sci. Total Environ. 605–606 (2017) 745–754. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.174.

[111] R.C. de Oliveira, S.C. do N. Queiroz, C.F.P. da Luz, R.S. Porto, S. Rath, Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination, Chemosphere. 163 (2016) 525–534. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.022.

[112] G. Codling, Y. Al Naggar, J.P. Giesy, A.J. Robertson, Concentrations of neonicotinoid insecticides in honey, pollen and honey bees (Apis mellifera L.) in central Saskatchewan, Canada, Chemosphere. 144 (2016) 2321–2328. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.135.

[113] S. Herrera López, A. Lozano, A. Sosa, M.D. Hernando, A.R. Fernández-Alba, Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study, Chemosphere. 163 (2016) 44–53. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.07.008.

[114] T. Kiljanek, A. Niewiadowska, S. Semeniuk, M. Gaweł, M. Borzęcka, A. Posyniak, Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry—Honeybee poisoning incidents, J. Chromatogr. A. 1435 (2016) 100–114. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.045.

[115] J. Irungu, A.T. Fombong, J. Kurgat, P. Mulati, J. Ongus, K. Nkoba, S. Raina, Analysis of Honey Bee Hive Products as a Model for Monitoring Pesticide Usage in Agroecosystems, J. Environ. Earth Sci. 6 (2016) 9–16.

[116] C. Porrini, F. Mutinelli, L. Bortolotti, A. Granato, L. Laurenson, K. Roberts, A. Gallina, N. Silvester, P. Medrzycki, T. Renzi, F. Sgolastra, M. Lodesani, The status of honey bee health in Italy: Results from the

nationwide bee monitoring network, PLoS One. 11 (2016) 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155411.

[117] F.M. Malhat, M.N. Haggag, N.M. Loutfy, M.A.M. Osman, M.T. Ahmed, Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study, Chemosphere. 120 (2015) 457–461. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.032.

[118] S. Niell, F. Jesús, C. Pérez, Y. Mendoza, R. Díaz, J. Franco, V. Cesio, H. Heinzen, QuEChERS adaptability for the analysis of pesticide residues in beehive products seeking the development of an agroecosystem sustainability monitor, J. Agric. Food Chem. 63 (2015) 4484–4492. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00795.

[119] P.P. Vázquez, A. Lozano, S. Uclés, M.M.G. Ramos, A.R. Fernández-Alba, A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1426 (2015) 161–173. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.081.

[120] Y. Al Naggar, G. Codling, A. Vogt, E. Naiem, M. Mona, A. Seif, J.P. Giesy, Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (Apis mellifera L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt, Ecotoxicol. Environ. Saf. 114 (2015) 1–8. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.039.

[121] Y. Li, R.A. Kelley, T.D. Anderson, M.J. Lydy, Development and comparison of two multi-residue methods for the analysis of select pesticides in honey bees, pollen, and wax by gas chromatography-quadrupole mass spectrometry, Talanta. 140 (2015) 81–87. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.031.

[122] J. Ravoet, W. Reybroeck, D.C. De Graaf, Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian honey bee wax combs, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 94 (2015) 543–548. https://doi.org/10.1007/s00128-015-1511-y.

[123] S. Panseri, A. Catalano, A. Giorgi, F. Arioli, A. Procopio, D. Britti, L.M. Chiesa, Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources, Food Control. 38 (2014) 150–156. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.024.

[124] Z. Barganska, M. Slebioda, J. Namiesnik, Determination of pesticide residues in honeybees using modified QUEChERS sample work-up and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Molecules. 19 (2014) 2911–2924. https://doi.org/10.3390/molecules19032911.

[125] K.M. Kasiotis, C. Anagnostopoulos, P. Anastasiadou, K. Machera, Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees, Sci. Total Environ. 485–486 (2014) 633–642. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.042.

[126] O. Lambert, M. Piroux, S. Puyo, C. Thorin, M. L'Hostis, L. Wiest, A. Buleté, F. Delbac, H. Pouliquen, Widespread Occurrence of Chemical Residues in Beehive Matrices from Apiaries Located in Different Landscapes of Western France, PLoS One. 8 (2013) 1–12. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067007.

[127] B. Giroud, A. Vauchez, E. Vulliet, L. Wiest, A. Buleté, Trace level determination of pyrethroid and neonicotinoid insecticides in beebread using acetonitrile-based extraction followed by analysis with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, J. Chromatogr. A. 1316 (2013) 53–61. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.088.

[128] B. Łozowicka, The development, validation and application of a GC-dual detector (NPD-ECD) multi-pesticide residue method for monitoring bee poisoning incidents, Ecotoxicol. Environ. Saf. 97 (2013) 210–222. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.010.

[129] K.A. Stoner, B.D. Eitzer, Using a Hazard Quotient to Evaluate Pesticide Residues Detected in Pollen Trapped from Honey Bees (Apis mellifera) in Connecticut, PLoS One. 8 (2013) 1–10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077550.

[130] K.P. Yáñez, J.L. Bernal, M.J. Nozal, M.T. Martín, J. Bernal, Determination of seven neonicotinoid insecticides in beeswax by liquid chromatography coupled to electrospray-mass spectrometry using a fused-core column, J. Chromatogr. A. 1285 (2013) 110–117. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.032.

[131] M.P. Chauzat, A.C. Martel, N. Cougoule, P. Porta, J. Lachaize, S. Zeggane, M. Aubert, P. Carpentier, J.P. Faucon, An assessment of honeybee colony matrices, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France, Environ. Toxicol. Chem. 30 (2011) 103–111.

https://doi.org/10.1002/etc.361.

[132] L. Wiest, A. Buleté, B. Giroud, C. Fratta, S. Amic, O. Lambert, H. Pouliquen, C. Arnaudguilhem, Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 5743–5756. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.079.

[133] M.I. González-Martín, I. Revilla, A.M. Vivar-Quintana, E. V. Betances Salcedo, Pesticide residues in propolis from Spain and Chile. An approach using near infrared spectroscopy., Talanta. 165 (2017) 533–539. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2016.12.061.

[134] N. Gérez, A. Pérez-Parada, M.V. Cesio, H. Heinzen, Occurrence of pesticide residues in candies containing bee products, Food Control. 72 (2017) 293–299. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.10.006.

[135] M. Murcia Morales, M.J. Gómez Ramos, P. Parrilla Vázquez, F.J. Díaz Galiano, M. García Valverde, V. Gámiz López, J. Manuel Flores, A.R. Fernández-Alba, Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood, Sci. Total Environ. 710 (2020) 136288. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136288.

[136] A. Luna, R. Alonso, V.M. Cutillas, C.M. Ferrer, M.J. Gómez-Ramos, D. Hernando, A. Valverde, J.M. Flores, A.R. Fernández-Alba, A.R. Fernández-Alba, Removal of pesticide residues from beeswax using a methanol extraction-based procedure: A pilot-scale study, Environ. Technol. Innov. 23 (2021) 101606. https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.101606.

[137] R. Alonso Águila, A. Rodríguez Fernández-Alba, M.D. Hernando Guil, A. Rodríguez Fernández-Alba, M.J. Gómez Ramos, V.M. Cutillas Juárez, C.M. Ferrer Amate, A. Valverde García, J.M. Flores Serrano, WO2021123485 Method for removing contaminants from beeswax, PCT/ES2020/070802, 2021. https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2021123485 (accessed July 21, 2022).

[138] A. Pérez-Parada, M. Colazzo, N. Besil, L. Geis-Asteggiante, F. Rey, H. Heinzen, Determination of coumaphos, chlorpyrifos and ethion residues in propolis tinctures by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to flame photometric and mass spectrometric detection, J. Chromatogr. A. 1218 (2011) 5852–5857. https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.06.097.

[139] M. Anastassiades, E. Scherbaum, B. Taşdelen, D. Štajnbaher, Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis, in: Pestic. Chem. Crop Prot. Public Heal. Environ. Saf., John Wiley & Sons, Ltd, 2007: pp. 439–458. https://doi.org/10.1002/9783527611249.CH46.

[140] V. Cutillas, M. Murcia-Morales, M. del M. Gómez-Ramos, S.M. Taha, A.R. Fernández-Alba, Supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in dried spices. Benefits and drawbacks, Anal. Chim. Acta. 1059 (2019) 124–135. https://doi.org/10.1016/J.ACA.2019.01.010.

[141] S. Niell, N. Gerez, F. Jesús, V. Cesio, H. Heinzen, Case Study: Beehive Devastation by Microencapsulated Parathion-Methyl, Chromatographia. 79 (2016) 1085–1090. https://doi.org/10.1007/s10337-016-3027-y.

[142] University of Hertfordshire, PPDB - Pesticides Properties DataBase, (2022). http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/ (accessed July 22, 2022).

[143] R.M. Johnson, H.S. Pollock, M.R. Berenbaum, Synergistic Interactions Between In-Hive Miticides in Apis mellifera, J. Econ. Entomol. 102 (2009) 474–479. https://doi.org/10.1603/029.102.0202.

[144] W. Zhu, D.R. Schmehl, C.A. Mullin, J.L. Frazier, Four Common Pesticides, Their Mixtures and a Formulation Solvent in the Hive Environment Have High Oral Toxicity to Honey Bee Larvae, PLoS One. 9 (2014) e77547. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0077547.

[145] J.A. Shimshoni, R. Sperling, M. Massarwa, Y. Chen, V. Bommuraj, M. Borisover, S. Barel, Pesticide distribution and depletion kinetic determination in honey and beeswax: Model for pesticide occurrence and distribution in beehive products, PLoS One. 14 (2019) 1–29. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212631.

[146] K.M. Kasiotis, E. Zafeiraki, E. Kapaxidi, E. Manea-Karga, S. Antonatos, P. Anastasiadou, P. Milonas, K. Machera, Pesticides residues and metabolites in honeybees: A Greek overview exploring Varroa and Nosema potential synergies, Sci. Total Environ. 769 (2021) 145213. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.145213.

[147] M. Martinello, C. Manzinello, A. Borin, L.E. Avram, N. Dainese, I. Giuliato, A. Gallina, F. Mutinelli, A survey from 2015 to 2019 to investigate the occurrence of pesticide residues in dead honeybees and other matrices related to honeybee mortality incidents in Italy, Diversity. 12 (2020). https://doi.org/10.3390/d12010015.

[148] Rachel Carson, Silent Spring, Penguin Classics, 2000.

[149] US EPA, DDT Ban Takes Effect - EPA Press Release, in: 1972. https://www.epa.gov/archive/epa/aboutepa/ddt-ban-takes-effect.html (accessed July 22, 2022).

[150] G.G. Pandit, S.K. Sahu, S. Sharma, V.D. Puranik, Distribution and fate of persistent organochlorine pesticides in coastal marine environment of Mumbai, Environ. Int. 32 (2006) 240–243. https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2005.08.018.

[151] V. Turusov, V. Rakitsky, L. Tomatis, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, persistence, and risks, Environ. Health Perspect. 110 (2002) 125–128. https://doi.org/10.1289/EHP.02110125.

[152] N.L. Hungerford, M.T. Fletcher, H.H. Tsai, D. Hnatko, L.J. Swann, C.L. Kelly, S.R. Anuj, U. Tinggi, D.C. Webber, S.T. Were, B.L.L. Tan, Occurrence of environmental contaminants (pesticides, herbicides, PAHs) in Australian/Queensland Apis mellifera honey, Food Addit. Contam. Part B Surveill. 14 (2021) 193–205. https://doi.org/10.1080/19393210.2021.1914743.

[153] T.S. Thompson, J.P. van den Heever, R.E. Limanowka, Determination of glyphosate, AMPA, and glufosinate in honey by online solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Food Addit. Contam. Part A. 36 (2019) 434–446. https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1577993.

[154] L. Pareja, F. Jesús, H. Heinzen, M.D. Hernando, Ł. Rajski, A.R. Fernández-Alba, Evaluation of glyphosate and AMPA in honey by water extraction followed by ion chromatography mass spectrometry. A pilot monitoring study, Anal. Methods. 11 (2019) 2123–2128. https://doi.org/10.1039/C9AY00543A.

[155] National Geographic, Colored Honey Made by Candy-Eating French Bees, (2012). https://www.nationalgeographic.com/animals/article/121011-blue-honey-honeybees-animals-science (accessed May 30, 2022).

[156] European Commission, Commission implementing Regulation (EU) 2022/686 of 28 April 2022 amending Implementing Regulations (EU) 2015/1295 and (EU) No 540/2011 as regards the conditions of approval of the active substance sulfoxaflor, 2022.

[157] European Food Safety Authority (EFSA), Modification of the existing maximum residue level for boscalid in honey, Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2019. https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5897.

[158] European Commission, EU Pesticides Database, (2022). https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en (accessed July 19, 2022).

[159] The Japan Food Chemical Research Foundation, Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods, (2022). http://db.ffcr.or.jp/front/ (accessed July 19, 2022).

[160] US Departmen of Agriculture (Foreign Agricultural Service), Maximum Residue Limits (MRL) Database, (2022). https://www.fas.usda.gov/maximum-residue-limits-mrl-database (accessed July 19, 2022).

[161] Government of Canada, Maximum residue limits search - Health Canada, (2022). https://pest-control.canada.ca/pesticide-registry/en/mrl-search.html (accessed July 19, 2022).

[162] A. Bradford, The Brussels effect : how the European Union rules the world, OUP USA, 2020.

[163] China's National Health Commission, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, State Administration for Market Regulation, GB 2763-2019. National Food Safety Standard Maximum Residue Limits for Pesticides in Foods, 2019.

[164] China Food and Drug Administration, GB 2762-2017. National Food Safety Standard Maximum Levels of Contaminants in Foods, 2017.

[165] Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, F2022C00572. Agricultural and Veterinary Chemicals Code (MRL Standard), 2022.

[166] Russian Federation, Hygiene Norms 1.2.3111-13. Hygiene Norms for Presence of Pesticides in external

entities, 2014.

[167] OMS, The WHO recommended clasification of pesticides by hazard, 2020.

[168] M.M. Gómez-Ramos, A.I. García-Valcárcel, J.L. Tadeo, A.R. Fernández-Alba, M.D. Hernando, Screening of environmental contaminants in honey bee wax comb using gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry, Environ. Sci. Pollut. Res. 23 (2016) 4609–4620. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5667-0.

[169] M.M. Gómez-Ramos, S. Ucles, C. Ferrer, A.R. Fernández-Alba, M.D. Hernando, Exploration of environmental contaminants in honeybees using GC-TOF-MS and GC-Orbitrap-MS, Sci. Total Environ. 647 (2019) 232–244. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.009.

[170] M. del M. Gómez-Ramos, M.J. Gómez Ramos, M. Martínez Galera, M.D. Gil García, A.R. Fernández-Alba, Analysis and evaluation of (neuro)peptides in honey bees exposed to pesticides in field conditions, Environ. Pollut. 235 (2018) 750–760. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.091.

[171] Eurostat, Organic crop production by crops from 2012 onwards, (2022). https://ec.europa.eu/eurostat/databrowser/view/org_croppro/default/table?lang=en (accessed August 12, 2022).

[172] T. Nace, Morgan Freeman Converted His 124-Acre Ranch Into A Giant Honeybee Sanctuary To Save The Bees, (2019). https://www.forbes.com/sites/trevornace/2019/03/20/morgan-freeman-converted-his-124-acre-ranch-into-a-giant-honeybee-sanctuary-to-save-the-bees/?sh=584e3294dfa5 (accessed August 6, 2022).

[173] K. Gratzer, R. Brodschneider, How and why beekeepers participate in the INSIGNIA citizen science honey bee environmental monitoring project, Environ. Sci. Pollut. Res. 28 (2021) 37995–38006. https://doi.org/10.1007/s11356-021-13379-7.

[174] University of Princeton, EyeWire, (2022). https://eyewire.org/explore (accessed August 13, 2022).

[175] The Great Sunflower Project, (2019). https://www.greatsunflower.org/ (accessed August 13, 2022).

[176] Citizen Community Science for Bees - The Bee Conservancy, (2021). https://thebeeconservancy.org/citizen-community-science-for-bees/ (accessed August 13, 2022).

[177] Bee Informed Partnership, (2022). https://beeinformed.org/citizen-science/ (accessed August 13, 2022).

[178] E.J. Bullock, A.M. Schafsnitz, C.H. Wang, R.L. Broadrup, A. Macherone, C. Mayack, H.K. White, Silicone wristbands as passive samplers in honey bee hives, Vet. Sci. 7 (2020). https://doi.org/10.3390/vetsci7030086.

[179] E. Matisová, S. Škrabáková, Applicability of a novel carbon sorbent for the preconcentration of volatile chlorinated hydrocarbons, Anal. Chim. Acta. 309 (1995) 181–188. https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00089-I.

[180] J. Rudling, Improvement of activated carbon for air sampling, J. Chromatogr. A. 503 (1990) 33–40. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)81489-8.

[181] M. Gawryś, P. Fastyn, J. Gawłowski, T. Gierczak, J. Niedzielski, Prevention of water vapour adsorption by carbon molecular sieves in sampling humid gases, J. Chromatogr. A. 933 (2001) 107–116. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01250-X.

[182] P. V. Doskey, M.S. Costanza, M.C. Hansen, W.T. Kickels, Solid sorbent method for the collection and analysis of volatile halogenated organic compounds in soil gas, J. Chromatogr. A. 738 (1996) 73–81. https://doi.org/10.1016/0021-9673(96)00079-9.

[183] M.F. Silva-barni, M. Gonzalez, K. Silvia, B. Miglioranza, Comparison of the epiphyte Tillandsia bergeri and the XAD-resin based passive air sampler for monitoring airborne pesticides, Atmos. Pollut. Res. 10 (2019) 1507–1513. https://doi.org/10.1016/j.apr.2019.04.008.

[184] K. Dettmer, W. Engewald, Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 490–500. https://doi.org/10.1007/s00216-002-1352-5.

[185] K. Heitmann, H. Wichmann, M. Bahadir, J. Gunschera, N. Schulz, T. Salthammer, Chemical composition

of burnt smell caused by accidental fires: Environmental contaminants, Chemosphere. 82 (2011) 237–243. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.065.

[186] S.F. Patil, S.T. Lonkar, Determination of benzene, aniline and nitrobenzene in workplace air: a comparison of active and passive sampling, J. Chromatogr. A. 688 (1994) 189–199. https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00762-4.

[187] H.R. Bollan, T.A. Goodall, R. Kearn, S. Woods, A. Chapman, J.L. Brokenshire, I.P. May, J.A. Breach, T.F. Limero, Development of passive sampling regime in royal navy submarine atmospheres for retrospective analysis of organic compounds, SAE Tech. Pap. (2008) 776–790. https://doi.org/10.4271/2008-01-2129.

[188] D. Zhao, J.J. Pignatello, Model-aided characterization of Tenax-TA for aromatic compound uptake from water, Environ. Toxicol. Chem. 23 (2004) 1592–1599. https://doi.org/10.1897/03-161.

[189] J. You, A.D. Harwood, H. Li, M.J. Lydy, Chemical techniques for assessing bioavailability of sediment-associated contaminants: SPME versus Tenax extraction, J. Environ. Monit. 13 (2011) 792–800. https://doi.org/10.1039/c0em00587h.

[190] M.T. Leppänen, J.V.K. Kukkonen, Evaluating the role of desorption in bioavailability of sediment-associated contaminants using oligochaetes, semipermeable membrane devices and Tenax extraction, Environ. Pollut. 140 (2006) 150–163. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.010.

[191] J.L. Freixo, E.F.G.D.C. Dores, R.D. Villa, Sampling and analysis of pesticides in the gas phase of air: Method validation using a volatilization chamber, Anal. Methods. 7 (2015) 8255–8261. https://doi.org/10.1039/c5ay01691f.

[192] C. Raeppel, M. Fabritius, M. Nief, B.M.R. Appenzeller, O. Briand, L. Tuduri, M. Millet, Analysis of airborne pesticides from different chemical classes adsorbed on Radiello® Tenax® passive tubes by thermal-desorption-GC/MS, Environ. Sci. Pollut. Res. 22 (2015) 2726–2734. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3534-z.

[193] I.D. Rushworth, C. Higgitt, M. Smith, L.T. Gibson, Non-invasive multiresidue screening methods for the determination of pesticides in heritage collections, Herit. Sci. 2 (2014) 1–8. https://doi.org/10.1186/2050-7445-2-3.

[194] B. Alfeeli, L.T. Taylor, M. Agah, Evaluation of Tenax TA thin films as adsorbent material for micro preconcentration applications, Microchem. J. 95 (2010) 259–267. https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.12.011.

CAPÍTULO 2

MUESTREO ACTIVO

CAPÍTULO 2. MONITORIZACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN COLMENAS DE ABEJA MELÍFERA MEDIANTE MUESTREO ACTIVO

Estudio de las aplicaciones, ventajas y puntos débiles de las estrategias clásicas de muestreo en matrices apícolas

Las abejas en estado larvario son especialmente sensibles a la presencia de plaguicidas en las colmenas, los cuales pueden tener efectos letales o subletales que afecten a su viabilidad y desarrollo. Las larvas están en contacto directo con la cera durante todo su crecimiento y su dieta incluye pan de abeja, que puede asimismo estar contaminado. Sin embargo, el análisis de abejas se centra típicamente en individuos adultos, ignorando en general aquéllos que aún no han completado su desarrollo. Para evaluar las consecuencias reales de la presencia de plaguicidas en la colmena, es necesario conocer en qué medida estos contaminantes alcanzan a las crías, de forma que pueda establecerse una correlación realista con los efectos a medio y largo plazo observados en los apiarios.

En el presente capítulo se describe la aplicación de un método para el análisis de 428 residuos de plaguicidas en colmenas de abeja melífera mediante LC-MS/MS y GC-MS/MS, basado en la aplicación de estrategias clásicas de muestreo activo y tratamiento de diferentes matrices apícolas. El muestreo incluyó abejas en estado larvario junto a dos de las matrices que suponen un riesgo más importante para ellas: cera y pan de abeja. Se realizaron cinco muestreos en un total de 10 colmenas del mismo apiario, detectando hasta 31 residuos de plaguicidas diferentes. La frecuencia de los muestreos fue mensual para asegurar la disponibilidad de material (tanto larvas como pan de abeja).

Los resultados hallados en este estudio ilustran la gran estabilidad de los contaminantes apolares en cera: se hallaron altas concentraciones de coumaphos y tau-fluvalinate en esta matriz a pesar de que no habían sido aplicados como tratamiento veterinario. También se detectaron en esta matriz plaguicidas de origen agrícola, en general con un log P superior a 3.5, mientras que aquéllos detectados sólo en pan de abeja tenían en general un log P inferior. Sólo nueve de los 31 plaguicidas fueron detectados tanto en cera como en pan de abeja, lo que muestra la necesidad de analizar más de una matriz apícola para obtener información representativa sobre la contaminación acumulada en la colmena. Por otro lado, se detectó migración de cinco contaminantes hacia las larvas, todos ellos detectados en cera (a alta concentración) y pan de abeja.

Publicación 1

Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood

María Murcia Morales, María José Gómez Ramos, Piedad Parrilla Vázquez, Francisco José Díaz Galiano, Mar García Valverde, Victoria Gámiz López, José Manuel Flores, Amadeo R. Fernández-Alba

Science of the Total Environment 710 (2020)

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.136288

Science of the Total Environment 710 (2020) 136288

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood

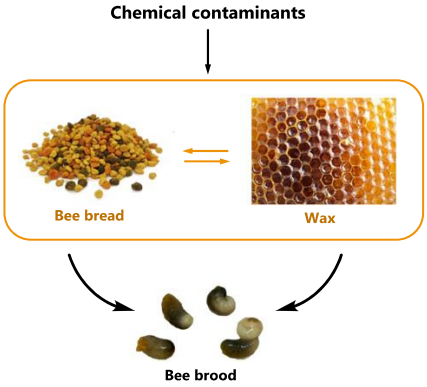
María Murcia Morales [a], María José Gómez Ramos [a,*], Piedad Parrilla Vázquez [a], Francisco José Díaz Galiano [a], Mar García Valverde [a], Victoria Gámiz López [b], José Manuel Flores [b], Amadeo R. Fernández-Alba [a]

[a] Chemistry and Physics Department, University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), 04120 Almería, Spain
[b] Department of Zoology, University of Córdoba, Campus of Rabanales, 14071, Córdoba, Spain

HIGHLIGHTS

- Pesticide multiresidue analysis in beeswax, bee bread and bee brood
- Presence, persistence and distribution of chemical residues in the beehive
- Migration of chemicals to the bee brood through contaminated beeswax and bee bread
- The findings evidence the presence of veterinary treatment residues in bee brood
- Chemical residues can be transferred to bee brood due to the use of recycled wax.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 19 July 2019
Received in revised form 19 December 2019
Accepted 20 December 2019
Available online 26 December 2019

Editor: Yolanda Picó

Keywords:
Veterinary treatments
Agriculture pesticides
Beeswax
Beebread
Immature bees
Larvae

ABSTRACT

Honeybee (*Apis mellifera*) is one of the most important crop and wild plant pollinators, playing an essential role in the agricultural production and the natural ecosystems. However, the number of honeybee colonies is decreasing alarmingly, which has motivated extensive research on the factors affecting their development and survival in some regions. Honeybees' exposure to pesticides and other chemicals has been identified as one of the causes of their decline. The present study evaluates the distribution of plant protection products, veterinary treatments and environmental contaminants inside the beehive, their persistence and their migration to the bee brood. During the five-month sampling period, only amitraz was applied to the colonies. Samples of beeswax, beebread (processed pollen) and bee brood were extracted and analyzed using GC-MS/MS and LC-MS/MS with a multiresidue method. The results showed the presence of 31 chemical residues in the samples. The highest concentrations of residues were detected in the beeswax and corresponded to amitraz (expressed as the sum of DMF and DMPF), coumaphos and tau-fluvalinate, with total concentrations of up to 16,858, 7102 and 1775 μg kg^{-1}, respectively. These and other veterinary treatments were found to accumulate in the beeswax and migrate to other beehive matrices such as beebread and bee brood. Plant protection products used in agriculture were also found in the beehive matrices, especially in the beebread. Five different chemical residues (acrinathrin, amitraz, coumaphos, cypermethrin and tau-fluvalinate) were found in bee brood samples at concentration levels

* Corresponding author.
E-mail addresses: mariamurcia@ual.es (M. Murcia Morales), mjramos@ual.es (M.J. Gómez Ramos), parrilla@ual.es (P. Parrilla Vázquez), diaz-galiano@ual.es (F.J. Díaz Galiano), mgv644@ual.es (M. García Valverde), ba1flsej@uco.es (J. Manuel Flores), amadeo@ual.es (A.R. Fernández-Alba).

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136288
0048-9697/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

ranging from 1 to 167 μg kg^{-1}. These findings reveal that bee brood reared in field conditions is in fact exposed to plant protection products and veterinary residues through direct contact with contaminated wax and via beebread although they had not been applied to the beehive.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Honeybees and other pollinators provide key ecosystem services for 35% of global agricultural land, sustaining the growth of close to 75% of the leading fruit and seed crops for human consumption worldwide (FAO, n.d.). The effective and healthy progress of pollination services ensures the sustainability of agriculture and natural ecosystems. However, there is an increasing number of studies on the severe losses in honeybee colonies, especially in Europe and the US (Stokstad, 2007). Possible contributing factors implicated in honeybee colony declines include mites as *Varroa destructor* and other parasites, exposure to both agrochemicals applied to agricultural crops and beekeeper-applied pesticides, along with other factors such as a reduction in the availability of natural habitats and poor bee nutrition (Sanchez-Bayo et al., 2016; Goulson et al., 2015).

Recently, the high levels of acaricide and agrochemical residues found in beeswax, food storage products (beebread or honey) and bees has raised serious concerns about pesticide exposure on the honeybees' health (Mullin et al., 2010; Colin et al., 2019; Pohorecka et al., 2017). In Spain, Lozano et al. reported levels of the varroacides fluvalinate-tau, coumaphos and two amitraz transformation products, *N*-2,4-dimethylphenyl-*N*′-methylformamidine (DMPF) and *N*-2,4-dimethylphenylformamide (DMF), between 13 and 13,900 μg kg^{-1} in beehive matrices (Lozano et al., 2019). Other studies also detected veterinary residues introduced by beekeepers in an attempt to combat *Varroa* infestations in the majority of the beehive products (Garcia et al., 2017; Herrera Lopez et al., 2016; Calatayud-Vernich et al., 2018; Shimshoni et al., 2019; Boi et al., 2016).

From an analytical point of view, apicultural samples are considered difficult matrices that contain large amounts of components including fats or proteins. In the last decade, analytical approaches have been improved in terms of selectivity and sensitivity with wider scopes for the determination of multiple chemical residues in honeybee, beeswax, beebread and honey. Liquid chromatography (LC) coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and gas chromatography (GC) coupled to tandem mass spectrometry (GC–MS/MS) instruments have been widely used due to their high specificity and low limits of detection in multiple reaction monitoring (MRM) methods (Lozano et al., 2019; Garcia et al., 2017; Herrera Lopez et al., 2016; Calatayud-Vernich et al., 2018; Vazquez et al., 2015).

In-hive acaricide treatments and agrochemicals cause the accumulation of residues in beeswax due to a lack of elimination of these lipophilic compounds, which could be intensified in case of over dosage or a high frequency of application. Highly lipophilic chemicals, like most acaricides, exhibit an extraordinary persistence and affinity to beeswax, and in general, they do no degrade in this microbiologically stable beehive product, estimating a large period before these residues fully disappear from beeswax (Serra-Bonvehí and Orantes-Bermejo, 2010-(Medici et al., 2016)). Hence, it is not surprising to find them ubiquitously in beeswax, reaching up considerable amounts of residues at mg/kg levels (Herrera Lopez et al., 2016; Shimshoni et al., 2019; Serra-Bonvehi and Orantes-Bermejo, 2010). Most acaricides are not eliminated during the wax recycling process (Medici et al., 2016), in which empty hive combs are melted with hot water, centrifuged, re-melted and in some cases treated with activated carbon, magnesium or aluminium silicates, or diatomaceous earth. Several studies described in the literature for the analysis of chemical residues in beeswax samples detected acaricides even though they had not been administered in the course of the campaign itself (Lozano et al., 2019; Serra-Bonvehi and Orantes-Bermejo, 2010; Calatayud-Vernich et al., 2017; Ostiguy and Eitzer, 2015). However, the established quality control criteria for beeswax or beebread is rather insufficient, since no maximum residue levels (MRLs) are fixed for these matrices even when they are used for cosmetics, pharmaceutical purposes or food preparations.

In the beehive, all the matrices are connected and contaminants may migrate by diffusion/partition from the beeswax to the stored honey, beebread, adult bees and even bee brood (immature bees: eggs, larvae and pupae) (Tremolada and Vighi, n.d.). Kochansky et al. investigated the migration of coumaphos from beeswax contaminated with 1000 μg $kg^{-1}$to honey, reaching 430 μg kg^{-1} after 26 weeks (Jan Kochansky and Feldlaufer, 2001). Lozano et al. also evaluated the distribution and migration trends of acaricides in beehive matrices (wax, honey, beebread) (Lozano et al., 2019). The authors found that the amounts of veterinary residues in honey were approximately 4%, as average value, respect to the sum of amounts detected in the other beehive products (beeswax and beebread). The distribution of chemical residues inside the beehive depends on their lipophilicity, initial deposition and nature of the beehive matrix, the more hydrophilic ones tending to be present at higher levels in honey samples. Specifically, bee brood is reared in closer contact with beeswax and are fed on beebread and honey at certain development stages (Haydak, 1970), therefore immature bees may be contaminated with residues of acaricides and other pesticides indirectly via food ingestion or portioning with the contaminated matrices they are in contact with (Paolo Tremolada et al., 2004) . The transfer of residues from contaminated beeswax and beebread to bee brood may depend on different factors, such as the amount of these residues in the foundation wax, the physicochemical properties of the chemicals the veterinary treatments applied, time of treatment, temperature, life stage and feeding source (hypopharyngeal gland, beebread…).

It has been found that some of the most common varroacides such as coumaphos, amitraz, cypermethrin and tau-fluvalinate are toxic to both adult and immature bees with oral LD_{50} values between 0.31 and 21.71 μg/bee (Dai et al., 2017). Lethal or sub-lethal effects in honeybees could occur due to chronic exposure after several days of repeated ingestion or contact with a certain chemical. Such impacts can affect honeybees by disrupting their cognitive abilities (ie, learning and orientation skills) and behaviours (ie, food collection) (Rortais et al., 2005). Survival of honeybee colonies depends on correct larval development, and the exposure levels of bee brood to chemical residues that can cause irreversible damage at the cellular, physiological and morphological levels, which can endanger the development of the honeybee (Becher et al., 2013; Tavares et al., 2015; Zhu et al., 2014).

While previous research on the presence of chemical residues in beehive has typically focussed on adult honeybees and beehive products such as wax, beebread or honey, the chemical residue presence and accumulation in honeybee brood has been largely ignored. The exposure of immature bees to chemicals in experimental exposure conditions has already been described (Thompson et al., 2014). However, field experiments are essential to the risk assessment concerning pesticide impact in bee brood health. In this context, the aim of the present study was to examine the content, distribution and persistence of chemical residues inside the hive, evaluating the migration of contaminants in the wax-beebread-larvae system. Sensitive multiresidue methods based on GC–MS/MS and LC-MS/MS were employed for the analysis of 428 chemical residues belonging to different categories, including in-hive pesticide treatments and plant protection products.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

All high-purity pesticide standards were obtained from LGC (Teddington, United Kingdom), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) or Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and were stored at −30 °C. Individual pesticide stock solutions (1000–2000 mg/L) were prepared in acetonitrile and were stored in amber screw-capped glass vials in the dark at −20 °C. Individual standard solutions, used for the optimization, along with standard-mix solutions, used for the calibration, were prepared from the stock standards.

Optima LC-MS grade water was obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). LC-MS grade methanol and ethyl acetate for pesticide residue analysis were purchased from Fluka Analytical (Steinheim, Germany). Ultra-gradient HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck. Ammonium formate, formic acid, anhydrous magnesium sulphate, sodium chloride, sodium hydrogenocitrate sesquihydrate and sodium citrate tribasic dihydrate were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). PSA and *Z*-Sep sorbents were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Bondesil-C18 (40 μm) was supplied by Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

2.2. Honeybee colonies location and sampling of beehive matrices

The sampling was made from 10 honeybee colonies of an experimental apiary located at the University of Córdoba (37° 55′33.5″N, 4° 43′26.1″W), Córdoba, South of Spain. The area presents a Mediterranean Continental and Oceanic climatic zone, characterized by mild autumns and springs, not very cold winters and scorching summers. The rainfalls are distributed among autumn, winter and spring, although this is a very irregular characteristic since it may change every year. The rainfalls during the summer are very scarce or null (Capel-Molina, 1981). The apiary was located in a mixed zone. The 3 km ratio where the bees' main foraging activity takes place (Visscher and Seeley, 1982) is located between the Guadalquivir River (south) and Sierra Morena foothills (north). There are small streams nearby, with low or null flow during the experiment, as well as natural areas, agricultural areas, residential areas, an animal farm and a small industrial zone (Fig. 1) (MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), n. d.). The natural areas include Mediterranean vegetation dominated by holmoaks (*Quercus ilex*). The shrub layer and herb layer with the highest attraction for bees consists mainly on the families Cistaceae, Boraginaceae, Myrtaceae, Lamiaceae, Asteraceae and Ericaceae. The agricultural area includes cereal crops and, to a lesser extent, sunflower. The main woody crop is olive tree (Olea europea). In the non-cropped areas there are eucalyptus trees (Eucalyptus sp.), black locust (Robinea sp.) and the herbaceous Boraginaceae, Lamiaceae Cruciferae and Asteraceae (Talavera Lozano et al., 1988; *La vegetación de Andalucía*, 1993). The main sources of chemical exposure for bees are derived from the treatments applied by the beekeepers to control Varroa destructor mite and the use of plant protection products in the crops nearby. Other risks include the animal farm located 500 m away from the apiary, the residential area and the industrial zone.

Honeybee colonies (*Apis mellifera* iberiensis, Engel) were built in the previous beekeeping season, June 2017, with new swarms consisting of four combs with bee brood, honey, pollen, approximately 500 adult bees and young queens free mated (queens were reared at the experimental Apiary, University of Córdoba, Spain). One comb foundation was added. Swarms were kept in 5-frame Langstroth nucleus boxes until next season. Bees were artificially fed for maintenance throughout the autumn and winter. Each bee colony was supplied with two kg of food (23.6% saccharose, 23.6% dextrose, 52.8% glucose syrup). In early spring 2018, swarms were moved to 10-frame boxes and 5 comb foundations were added. For this study, conventional wax from two different suppliers was used: wax 1 for five colonies and wax 2 for the other five colonies. The bee hives were placed on platforms raised 50 cm above ground level and maintained with the everyday handling of a beekeeper.

During the essay, the bee colonies were sampled five times, coinciding with critical moments of the trial (2018). The first sampling was carried out on May; the wax of this first sampling corresponds to a pool of the foundation wax, taken before the constitution of the new combs. On May 30th and 31st, during the building of the new combs, the first bee brood and bee breed sampling was carried out. There was no wax analysis at the end of May. The second sampling (June19th) was carried out just before the obligatory treatment, according to the regulatory measures (Royal Decree 608, 2006). The colonies were treated from

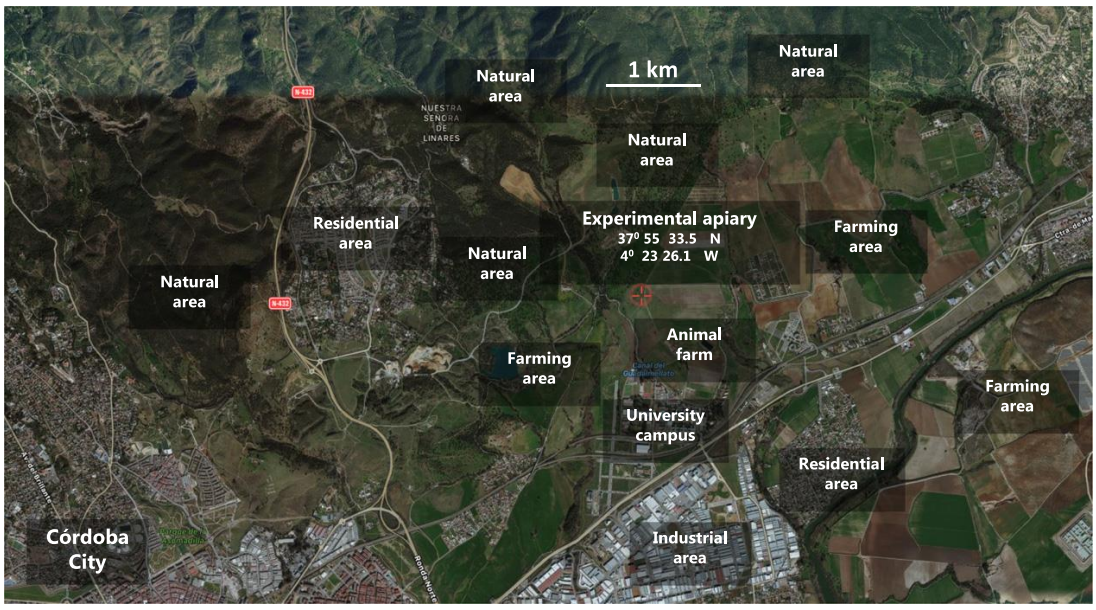


Fig. 1. Location and surroundings of the test apiary.

July5thto July23rd. This treatment consisted of the administration of two sustained-release strips with amitraz per beehive (Amicel Varroa®, 500 mg). No additional synthetic veterinary treatments were applied. The third sampling was just in the end of the treatment (July23rd). The fourth sampling was carried out on September 4th and the final sampling was on October 2nd.

Pieces of combs (approx. 25 cm^2) containing beeswax, beebread and bee brood (various larval stages) of three different parts from each beehive were collected for residue analysis. In the laboratory, the beebread and bee brood were carefully separated from the beeswax manually. All the samples were labelled accordingly and quickly stored at −20 °C prior to the analyses. Samples from the 5 honeybee colonies built with the same kind of wax were pooled (beehive group 1 and beehive group 2). Therefore, the variability among different beehives of the same type could not be assessed in this study.

2.3. Sample preparation

Sample treatment was carried out using modified QuEChERS methods including ultrasound-assisted extraction (UAE) for the larvae samples and a thermostatted holder with automatic shake for the wax and beebread samples (Garcia et al., 2017; Herrera Lopez et al., 2016; Vazquez et al., 2015; Gil Garcia et al., 2018). For the most complex samples (beebread) a freezing-out step followed by d-SPE with PSA, C18 and *Z*-Sep was the chosen clean-up procedure to ensure a better removal of co-extracted matrix compounds. These extraction methods have been previously validated (Vazquez et al., 2015; Gil Garcia et al., 2018).

For the extraction of bee brood, a modified QuEChERS method including ultrasound-assisted extraction (UAE) was employed. First, 2 g of each bee brood sample were weighed in a 50-mL PTFE centrifuge tube and 5 mL of ultrapure water were added. The samples were then shaken manually and let stand for 5 min. Subsequently,5 mL of acetonitrile was added and the samples were sonicated with a Sonoplus HD 3100 sonicator (Bandelin, Germany) for 21 s using the following operational parameters: amplitude: 75%; pulse: 5 s; let stand: 2 s. After the sonication, the samples were shaken in an automatic axial extractor (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain) for 15 min. Afterwards, 2 g $MgSO_4$, 0.5 g NaCl, 0.5 g trisodium citrate dihydrate and 0.25 g sodium hydrogencitrate sesquihydrate were added and the samples were shaken again in the automatic axial extractor for 5 additional min. The samples were then centrifuged (3500 rpm) for 5 min. Finally, a 1 mL aliquot of the above extract was percolated through an SPE cartridge containing 40 mg of *Z*-Sep at a flow rate of 0.8 mL/min in the extraction manifold system at a pressure of 1.09 psi for the vacuum system (SPE cartridge preconditioned prior to percolation with 1 mL of ACN). The eluates were transferred to amber vials and acidified with 10 μL of 5% formic acid per mL of extract. This extraction procedure entails a 2.5-fold dilution that was undone during the preparation of the injection vials.

The extraction of the wax samples was performed following the QuEChERS method with a thermostatted automatic shake. A 10 g portion of homogenized sample was weighed in a 50-mL PTFE centrifuge tube and 10 mL of water were added. After 5 min of water addition, 10 mL of acetonitrile were added and the samples were shaken in an automatic axial extractor for 4 min. Then, 4 g $MgSO_4$, 1 g NaCl, 1 g trisodium citrate dihydrate and 0.5 g disodium hydrogencitrate sesquihydrate were added and the samples were shaken in the automatic axial extractor for 5 min using the holder temperature at 40 °C. The extracts were then centrifuged (4500 rpm) for 5 min. A 5 mL volume of the supernatant was transferred to a 15-mL PTFE centrifuge tube containing 750 mg of $MgSO_4$ and 125 mg of PSA. The samples were shaken in a vortex for 30 s and centrifuged again (3500 rpm) for 5 min. The extracts were transferred to amber vials and they were acidified with 10 μL of formic acid 5% per mL of extract.

The extraction of the beebread samples was also performed with a modified QuEChERS method including a freezing-out step to remove their lipid portion. First, 2 g of the samples were weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube and 2 mL of water were added. The tubes were then vortexed for 30 s and 4 mL acetonitrile were added. After agitation in the automatic axial extractor for 4 min, 0.8 g $MgSO_4$, 0.2 g NaCl, 0.2 g trisodium citrate dihydrate and 0.1 g sodium hydrogencitrate sesquihydrate were added and the samples were automatically shaken again for 4 min. They were then centrifuged (5 min, 4500 rpm) and 4 mL supernatant were taken. These extracts were put in dry ice for 3 min, with the appearance of a lipid precipitate. Then, 2 mL of the supernatant were taken and the clean-up salts (50 mg PSA, 50 mg C18, 50 mg Zsep and 300 mg $MgSO_4$) were added. After shaking for 30 s, the samples were centrifuged for 5 min (4500 rpm) and transferred to amber vials, to which formic acid 5% was added (10 μL per mL of extract). This extraction procedure entails a 2-fold dilution.

For the extraction of all samples, procedural internal standards were used as surrogate standards to control the extraction performance: dichlorvos-d6, malathion-d10, carbendazim-d3 and triphenyl phosphate (TPP). The recovery of dichlorvos-d6, malathion-d10 and carbendazim-d3 was checked by LC and the recovery of malathion-d10 and triphenyl phosphate was tested by GC. If the recovery of those compounds was not acceptable (outside the 60–140% range), the sample was re-extracted.

2.3.1. Vial preparation

During the preparation of the sample vials, different procedures were followed according to the matrix and the analytical technique. For gas chromatography, 50 μL of the pollen extracts were evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 50 μL of ethyl acetate. In the case of bee brood, 125 μL of extract were evaporated and reconstituted with 50 μL of ethyl acetate in order to undo the extraction dilution. Wax samples were known to contain a high amount of pesticides and were diluted twice in the vials (50 μL of extract reconstituted with 100 μL of ethyl acetate). For liquid chromatography, 100 μL of the beebread samples were diluted with 400 μL of ultrapure water. In the case of bee brood samples, the dilution ratio extract:water was 100:300 and, for wax samples, 50:950.

Matrix-matched calibration curves were prepared as follows: a blank extract (50 μL for GC-MS/MS, 100 μL for LC-MS/MS) was evaporated and reconstituted with the same volume of an organic solvent (ethyl acetate for GC-MS/MS, acetonitrile for LC-MS/MS) containing a mixture of pesticides at 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 200, 300 or 1000 μg/L. For the LC vials, 400 μL of ultrapure water were added. Dimethoate-d6 and lindane-d6 were used as injection internal standards in all vials for LC and GC, respectively.

2.4. GC-QqQ-MS/MS analysis

The analyses by gas chromatography were performed in an Agilent Intuvo 9000 GC system equipped with an Agilent 7693 autosampler and an Agilent 7010 GC-MS/MS triple quadrupole. Data acquisition and processing was developed by Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis software version 10.0. The samples were injected using a multimode injector inlet in splitless mode, through an Agilent ultra-inert inlet liner with a glass wool frit. The injection volume was 1 μL. The injector temperature was kept at 80 °C during the solvent evaporation stage (0.1 min) and then ramped up to 300 °C at 600 °C min^{-1} for 5 min and finally to 250 °C at 100 °C min^{-1}. Two planar columns (Agilent), HP-5MS UI 15 m long × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness were used.

The oven temperature program was as follows: 60 °C for 0.5 min, up to 170 °C at 80 °C min^{-1} and finally up to 310 °C at 20 °C min^{-1}. The total run time was 12.4 min with 2.1 additional min for backflushing at 310 °C. The instrument worked at a constant flow (1.28 mL/min column 1, 1.48 mL/min column 2). The system worked in dynamic MRM,

acquiring the transitions in a ± 0.2 min window from the retention time of the analyte. Helium (99.999% purity) was used as the carrier and quenching gas, and nitrogen (99.999% purity) as the collision gas. The collision and quenching gas flows were 1.5 mL/min and 2.25 mL/min, respectively. Both the transfer line and the ion source -operated in electron ionization- were maintained at 280 °C. The quadrupole analyzer temperature was fixed at 150 °C. The solvent delay was 2.6 min.

For the optimization of the MS parameters, all pesticides were monitored in full-scan mode in the 50–550 *m/z* range. The first step was the selection of the precursor/s ion/s for each analyte and the retention time, injecting individual solutions for each pesticide at 1 mg kg^{-1} in full-scan mode. The ion with the highest intensity and *m/z* relationship was selected as the precursor ion. Precursor ion fragmentation was performed by collision-induced dissociation with nitrogen, from which the best fragment ions were chosen. Once the fragment ions were selected, the adequate CE for each transition was assayed in the 3–40 eV range. Retention times, transitions and CEs for the analyzed compounds were already presented by Hakme et al. in a previous work (Hakme et al., 2018).

2.5. LC-QqQ-MS/MS analysis

An Agilent UPLC 1290 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to an Agilent Technologies 6490 Triple Quad LC/MS was used for this study. Data acquisition and processing was developed by Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis software version 10.0, using dynamic MRM software features with a retention time window of 0.8 min. The injection volume was 5 μL except for the bee brood samples (10 μL), and the chromatographic separation was carried out with a Zorbax Eclipse Plus C8 column (Agilent), 2.1 mm × 100 mm × 1.8 μm. The system employed 0.1% formic acid in milliQ water (mobile phase A), and 0.1% formic acid and 5% water in acetonitrile (mobile phase B)with the following gradient: 20% of B for 2 min, a linear gradient up to100% of B in 13 min and finally an isocratic mode at 100% of B for2 min. Subsequently, an equilibration step coming back to 20% of B(2.5 min) was performed. The system was provided with a JetStream electrospray ion source, employing nitrogen as the nebulizer gas. This ion source was configured as follows: 120 °C for the drying gas temperature, 13 L/min for the drying gas flow rate, 45 psi for the nebulizer pressure, 375 °C for the sheath gas temperature and 10 L/min for the sheath gas flow rate. The MS used nitrogen as the collision gas (99.999% purity), 380 V for the fragmentor and 3000 V for the capillary voltage, both in positive and negative mode.

For the optimization of the MS parameters, all pesticides at 0.1 mg/L (acetonitrile:water, 1:1, *v*/v) were injected directly into the MS system in full-scan mode within the 50–800 *m/z* range. From this injection, the precursor ion was selected. Then, one more injection in product ion mode was needed to choose two fragment ions and the optimum collision energy (CE) for each transition. The most intense transition was selected as the quantifier transition (SRM1), while the second most intense was chosen as the qualifier transition (SRM2). Retention times, transitions and CEs for each analyzed compound were previously published in a previous study (Ucles et al., 2017).

2.6. Identification and quantification

The identification and quantification of compounds and method validation were performed on the basis of the SANTE Document (SANTE/11813/2017) criteria (SANTE/11813/2017, 2017). The validation procedures have been described in previous works (Herrera Lopez et al., 2016; Serra-Bonvehi and Orantes-Bermejo, 2010; Talavera Lozano et al., 1988; *La vegetación de Andalucía*, 1993). The positive findings showed two fully overlapping transitions with the same retention time as the standard (± 0.1 min time tolerance). The ion ratio of these ions was within the ±30% deviation range with regard to the calibration standards. Signal-to-noise ratio was higher than 3 for all the reported positives.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the distribution of chemical residues in the beehive

The analyses performed by LC-MS/MS and GC-MS/MS revealed the presence of 31chemical residues of diverse classes, including insecticides, acaricides, fungicides, herbicides and environmental contaminants in the matrices from each beehive group (BG1 and BG2). The results of each sampling month for the matrices (beeswax, bee brood and beebread) are shown in Table 1. Our instrumental LOQ was established as the lowest limit of the calibration curve that complied with the criteria to be identified (SANTE/11813/2017, 2017). For all the detected compounds, the LOQ value was 1.0 μg kg^{-1} in the studied beehive matrices. Beeswax, bee brood and beebread from beehive groups 1 and 2 showed similar results for most pesticides in terms of presence, concentration and distribution among the different matrices.

As can be seen in Table 1, amitraz (expressed as the sum of DMF and DMPF because no DMA was detected in any sample) showed the highest concentration levels, with values over 9000 and 5000 μg kg^{-1}in the wax from beehive group 1 and 2 respectively. Coumaphos (more than 3000 μg kg^{-1}) and tau-fluvalinate were also very abundant. These three chemicals are commonly used in beekeeping to mitigate the effects of *Varroa* and other infestations, so their concentration in wax and beebread samples is usually very high (Lozano et al., 2019). The presence of veterinary drug residues in beeswax can be caused by (i) the administration of these veterinary products to the beehives and/or (ii) the use of recycled, commercial wax in beekeeping practices, which may accumulate chemical residues applied in previous beekeeping seasons, especially the highly lipophilic ones. In this case, amitraz was the only veterinary treatment applied during the study (beehives 1 and 2, July). Therefore, the other positive findings correspond to chemicals accumulated in the recycled wax samples in previous beekeeping seasons, reaching values of 3798 μg kg^{-1}(coumaphos, Wax Foundation, hive 1) even when they had not been applied by the current beekeepers. These results are in agreement with previous studies, where coumaphos and other veterinary treatments were found in the same concentration ranges in beeswax (Lozano et al., 2019).

Beeswax acts as a reservoir of veterinary residues, pronounced by its lipophilic properties and the low polarity of the pesticides (log P in the range of 3.8–7.0 for all the detected veterinary products), which promotes their accumulation over time. In the present study, these residues have been found at a wide concentration range in the wax foundation samples (7.5–3798 μg kg-^{1}). These contaminants can then migrate from the wax to other parts of the beehive such as the beebread or the larvae, as shown in Table 1. Even though most chemical residues remain in the wax, the migration over the wax- beebread- larvae system is a crucial factor that could affect the evolution of the colony. In the case of coumaphos, up to 135 μg kg^{-1} were detected in beebread samples over the sampling period. This means that bee brood could be contaminated both indirectly via food intake (beebread) or through direct contact with the contaminated wax they are in contact with beebread.

In addition to the veterinary residues, pesticides used in agriculture were also detected. Chlorfenvinphos, parathion, propargite and some pyrethroids (acrinathrin, bifenthrin, cypermethrin, permethrin), were found at concentrations ranging from 2 to 235 μg kg-1 in the beehive products. Other pesticide residues were also found in the hives at lower concentration levels (1.0 to 16 μg kg-1). Most of these compounds act as fungicides, acaricides or insecticides, although two herbicides (oxasulfuron and pendimethalin) were also found. The origin of these pesticides not applied in beekeeping lies in the pollen and nectar collected by the bees in the fields, which are employed in the beebread production. Therefore, plant protection treatments applied in agriculture are mainly found in the beebread. For example, residues of the

Table 1
Concentrations of pesticide residues found in beehive groups (BG) 1 and 2 (μg kg^{-1}).

Compound	Activity	log P[a]	Matrix	Concentrations in BG 1 (μg kg^{-1})						Concentrations in BG 2 (μg kg^{-1})					
				Wax Foundation	*May	Jun	Jul	Sep	Oct	Wax Foundation	*May	Jun	Jul	Sep	Oct
Amitraz (DMF + DMPF)	Acaricide	2.1 (DMF), 2.9 (DMPF)	Wax	9.3		4.5	9247	1968	1764	88		54	5729	461	527
			Bee bread		–	–	271	138	98		2.2	–	152	66	7.4
			Bee brood		–	–	153	4.6	35		–	–	167	7.0	1.9
Coumaphos	Acaricide, insecticide	3.9	Wax	3798		1385	526	768	625	3070		1248	645	646	687
			Bee bread		109	16	13	21	18		135	64	34	25	13
			Bee brood		1.5	7.0	12	2.2	3.8		1.5	6.7	1.6	1.1	3.9
Tau-fluvalinate	Acaricide, insecticide	7.0	Wax	244		232	235	169	239	513		296	313	220	433
			Bee bread		16	8.5	6.6	6.9	8.0		23	15	7.3	6.9	4.2
			Bee brood		–	2.9	3.1	–	4.7		1.6	1.0	3.4	–	2.8
Acrinathrin	Acaricide, insecticide	6.3	Wax	235		135	50	78	67	188		99	50	58	58
			Bee bread		5.1	2.1	1.4	1.6	1.2		6.9	3.3	1.8	1.4	–
			Bee brood		–	–	1.6	–	–		–	–	–	–	–
Cypermethrin	Insecticide	5.6	Wax	15		19	10	21	53	7.5		4.0	2.4	2.2	4.6
			Bee bread		1.7	4.7	2.6	1.2	1.2		–	–	2.3	–	–
			Bee brood		–	–	–	–	5.7		–	–	–	–	–
Chlorfenvinphos	Insecticide	3.8	Wax	198		71	25	33	28	291		110	60	63	62
			Bee bread		6.4	–	–	–	–		21	5.7	3.2	2.4	–
Chlorpyrifos	Insecticide	4.7	Wax	7.2	7.2	2.1	1.0	1.0	1.0	14		4.7	2.5	2.4	2.1
			Bee bread		1.1	1.1	–	–	1.3		1.5	–	1.0	–	–
Tebuconazole	Fungicide	3.7	Wax	–		–	–	–	–	3.5		–	–	–	–
			Bee bread		–	–	–	–	–		–	–	1.1	–	–
Azoxystrobin	Fungicide	2.5	Wax	–		–	–	–	–	1.4		–	–	–	–
			Bee bread		–	–	–	–	–		–	1.0	–	1.4	–
Propiconazole	Fungicide	3.7	Wax	5.9		1.8				10		3.3	1.8	1.4	2.0
Cyprodinil	Fungicide	4.0	Wax	1.0		2.2	2.0	1.4	1.9	–		2.0	2.1	2.5	2.1
Parathion	Acaricide, insecticide	3.8	Wax	10		3.6	–	–	–	–		–	–	–	–
Permethrin	Insecticide	6.1	Wax	3.0		–	–	–	–	3.7		1.7	1.0	–	1.1
Propargite	Acaricide Insecticide	5.7	Wax	4.0		2.1	1.0	1.0	–	1.8		–	–	–	–
Bifenthrin	Acaricide, insecticide	6.6	Wax	6.6		2.3	–	–	–	–		–	–	–	–
Anthraquinone	Env. Contam.	3.5	Wax	2.1		–	–	–	–	1.7		–	–	–	–
4,4′-DDT	Env. Contam.	6.9	Wax	1.7		–	–	–	–	1.3		–	–	–	–
Oxasulfuron	Herbicide	0.8	Wax	2.6		–	–	–	–	–		–	–	–	–
Prothiofos	Insecticide	5.7	Wax	–		–	–	–	–	2.3		–	–	–	–
Phosmet	Acaricide, insecticide	2.8	Bee bread		–	14	16	7.6	17		–	10	9.0	8.1	3.6
Pendimethalin	Herbicide	5.4	Bee bread		–	–	4.7	2.3	28		–	–	5.6	–	–
Thiophanate-methyl	Fungicide	1.4	Bee bread		–	–	6.4	3.5	1.4		–	–	1.9	5.9	6.3
Dimethoate	Acaricide, insecticide	0.8	Bee bread		–	–	–	–	–		–	–	–	–	15
Chlorpyrifos-methyl	Insecticide	4.0	Bee bread		–	1.6	–	–	–		–	2.1	–	–	–
Epoxiconazole	Fungicide	3.3	Bee bread		1.2	–	–	1.1	1.3		–	–	–	–	–
Chlorantraniliprole	Insecticide	2.9	Bee bread		–	–	1.8	–	–		–	–	–	–	–
Imidacloprid	Insecticide	0.6	Bee bread		–	–	–	2.3	–		–	–	–	–	–
Pyridaben	Acaricide, insecticide	6.4	Bee bread		1.5	–	1.0	–	–		–	–	–	–	–
Fluopyram	Fungicide	3.3	Bee bread		–	–	–	–	–		–	–	1.0	–	–
Iprovalicarb	Fungicide	3.2	Bee bread		–	–	–	1.2	–		–	–	–	–	–

(*) No wax analysis was made on May.
[a] Octanol-water partition coefficient logarithm (pH 7, 20 °C) data obtained from ChemSpider, PubChem or the Pesticide Properties Database.

insecticide phosmet (17 and 10 μg kg^{-1} in the hives 1 and 2, respectively) were found only in the beebread samples, with no migration to other parts of the hive. The same happened with other ten compounds including other insecticides (dimethoate, chlorpyrifos-methyl, chlorantraniliprole, imidacloprid and pyradaben) fungicides (thiophanate-methyl, epoxiconazole, fluopyram and iprovalicarb) and an herbicide (pendimethalin), which are only detected in beebread (see Table 1).These residues can come from the use of pesticides in the agricultural fields or even in gardens of residential areas near the experimental apiary, where honeybees probably perform their foraging activities (see Fig. 1). However, eight plant protection residues were found only in the wax samples, with concentration levels in the range of 1.0–10 μg kg^{-1}. This is the case of, for example, prothiofos, cyprodinil or propiconazole (log P 3.7–6.0). This can be partially explained on the basis of their polarity: in most cases, the plant protection products found in wax samples possess higher log P (and, thus, higher lipophilicity) and tend to accumulate in a non-polar matrix as is the wax. This accumulation can continue over the beekeeping seasons due to the use of recycled wax, as happens with the veterinary products.

3.1.1. Chemical residues evolution in the beehive over time

Three acaricides with different log P have been chosen as an example to illustrate the distribution and contamination of chemicals in the beehive over time: amitraz (DMF 2.1 and DMPF 2.9), coumaphos (3.9) and tau-fluvalinate (7.0). Residues with a highly lipophilic nature are expected to have a greater tendency to be retained in beeswax, while both lipophilic and hydrophilic chemicals can be found in beebread and bee brood. The three chemicals used as an example are the ones found with the highest concentration in the three studied matrices, making their study easier.

Fig. 2 shows the tendency of coumaphos, tau-fluvalinate and amitraz in the wax and beebread samples from beehive 1 throughout the five sampling months (May to October 2018). The results from each pesticide have been standardized so that 100% represents the maximum concentration found for each pesticide in the matrix. As shown, the highest concentration of coumaphos in both wax and beebread samples were detected in the foundation wax or in May, respectively. The concentration decreased meaningfully over time: less than 20% of the initial load was detected in the subsequent months.

In the case of tau-fluvalinate, only a slight elimination tendency can be observed in beebread throughout the sampling period. Moreover, its concentration in wax samples showed minimal variations over the sampling months, each one showing close to 100% of the maximum concentration (169–244 μg kg^{-1}). The different accumulation patterns of coumaphos and tau-fluvalinate could be explained on the basis of their physicochemical properties: tau-fluvalinate (log P 7.0) is more lipophilic than coumaphos (log P 3.9) and, therefore, it has a stronger tendency to accumulate in matrices with a high content of nonpolar components such as wax and, to a lesser extent, beebread.

Amitraz was applied to the beehives in July and as expected, the highest concentration in the matrices was observed in that month (9247 μg kg^{-1} in wax samples, 271 μg kg^{-1} in beebread). In September, the concentrations decreased to 1968 (21%) and 138 μg kg^{-1} (51%) in wax and beebread, respectively. Both DMF (log P 2.1) and DMPF (log P 2.9) are polar compounds and, consequently, they do not tend to accumulate in those matrices. Amitraz residues (DMF and DMPF) are however prone to accumulation in polar matrices such as honey, as described by Lozano et al. (Lozano et al., 2019).

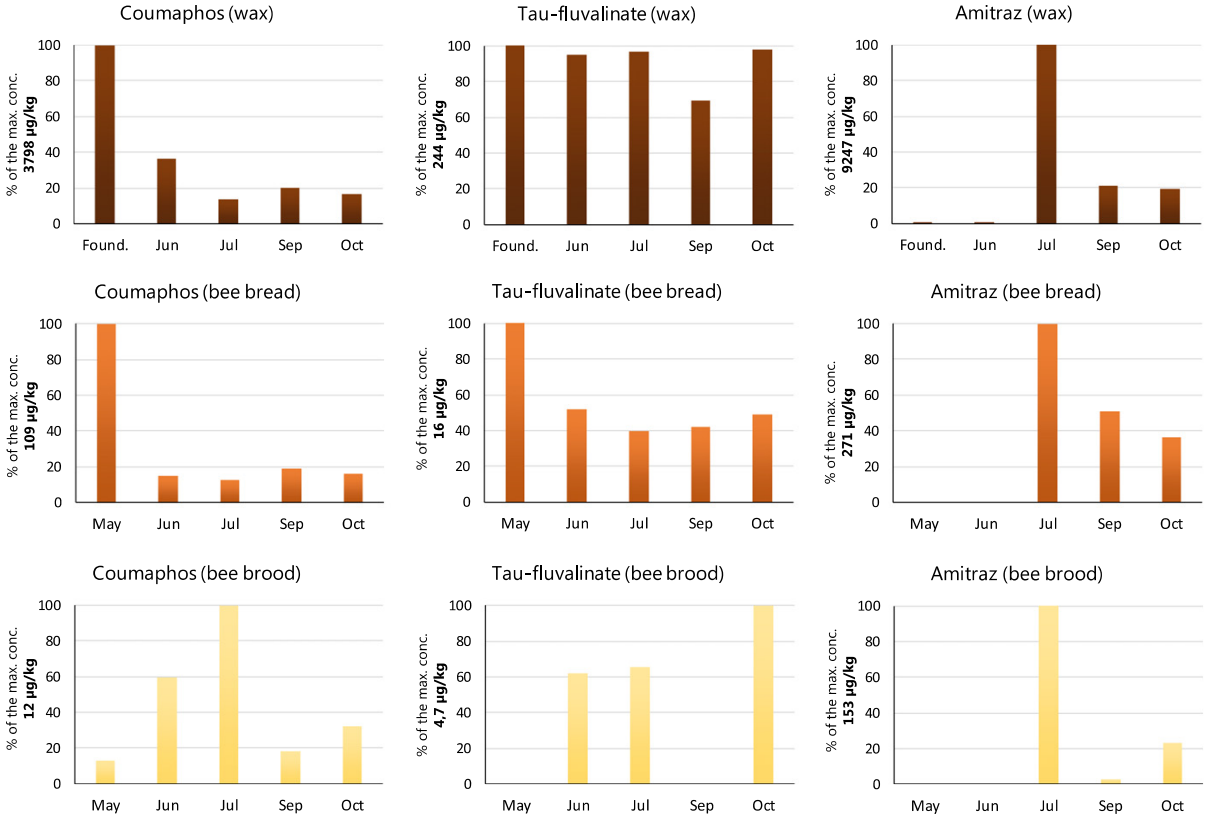


Fig. 2. Residue contamination evolution of coumaphos, tau-fluvalinate and amitraz in the beehive matrices. The Y-axis has been standardized so that 100% represents the maximum concentration found of the chemical in the matrix.

Table 2
Concentration of the pesticide residues found in bee brood samples.[a]

	Bee Brood 1					Bee brood 2				
	May	June	July	Sept	Oct	May	June	July	Sept	Oct
Amitraz	–	–	153 (19)	4.6 (0.6)	35 (4.4)	–	–	167 (21)	7.0 (0.9)	1.9 (0.2)
Coumaphos	1.5 (0.2)	7.0 (0.9)	12 (1.5)	2.2 (0.3)	3.8 (0.5)	1.5 (0.2)	6.7 (0.8)	1.6 (0.2)	1.1 (0.1)	3.9 (0.5)
Fluvalinate-tau	–	2.9 (0.4)	3.1 (0.4)	–	4.7 (0.6)	1.6 (0.2)	1.0 (0.1)	3.4 (0.4)	0.4 (0.1)	2.8 (0.4)
Cypermethrin	–	–	–	–	5.7 (0.7)	–	–	–	–	–
Acrinathrin	–	–	1.6 (0.2)	–	–	–	–	–	–	–
Total	1.5 (0.2)	9.8 (1.2)	169 (21)	6.8 (0.8)	49 (6.2)	3.1 (0.4)	7.8 (1.0)	172 (22)	8.5 (1.1)	8.7 (1.1)

[a] Values in μg kg^{-1} and (ng/larvae).

3.2. Chemical residues in bee brood

Five different chemical residues were found in bee brood samples at concentration levels ranging from 1.0 to 167 μg kg^{-1}: acrinathrin, amitraz (expressed as sum of DMF and DMPF), coumaphos, cypermethrin and tau-fluvalinate. Table 2 shows the concentrations of these pesticides in each bee brood sample in two different units: μg kg^{-1} larvae and ng per larva. In order to obtain the concentration value in terms of ng per larva, 2 g of bee brood sample were weighed (5 replicates) and the mean weight per larva was calculated as 125 mg. To the best of our knowledge, this is the first field research that investigates the migration of pesticides from the beehive matrices (beebread, wax) to the bee brood in field conditions.

All compounds detected in bee brood samples were insecticides/acaricides present at high concentrations in the wax samples. In Europe, only amitraz, coumaphos and fluvalinate-tau are registered for treatment against Varroa. However, the presence of high levels of other acaricides in beeswaxes could be attributed to the carrying out of treatments, nowadays or formerly, with non-authorized products or to the importation of beeswax batches from other countries (Boi et al., 2016; Serra-Bonvehi and Orantes-Bermejo, 2010). Fig. 3 shows the chromatogram of coumaphos in the matrix-matched standard (1.0 μg kg^{-1}) and in the bee brood sample 2 (September), with a calculated concentration of 1.1 μg kg^{-1}. Plant protection products, despite being present in the beebread used for feeding bee larvae and pupae, were not found in bee brood samples. Even though these contaminants can

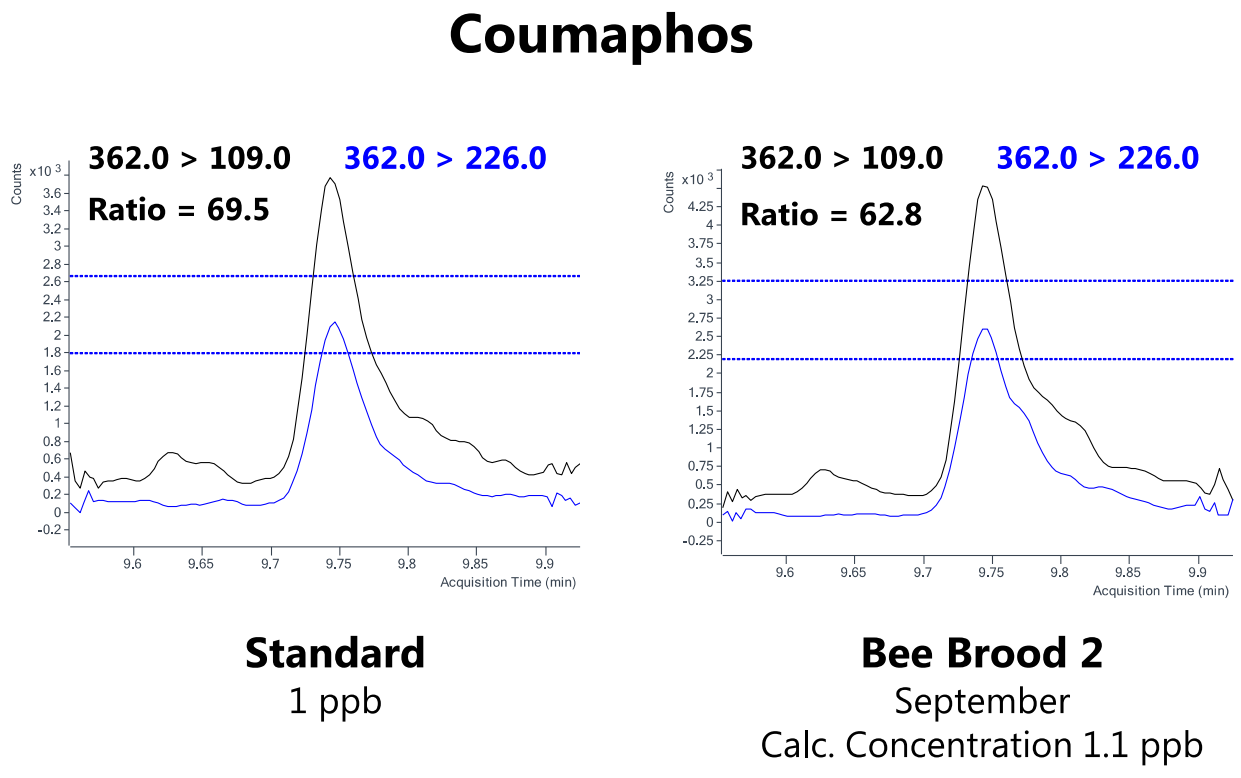


Fig. 3. Chromatogram of coumaphos corresponding to the matrix-matched standard (1 μg kg^{-1}) and in the bee brood sample 2 (September).

be incorporated in the bee brood's organism through diet, significant amounts of plant protection products could not be detected in bee brood samples. Therefore, it can be stated that the contaminated wax inside the beehive plays the main role in the exposure of the developing bees to chemical residues, either directly (direct contact of the larvae with the wax) or indirectly (through migration of the contaminants from the wax to the beebread used for feeding).

In this study, only amitraz was applied to the colonies (July). As can be seen in Table 2, amitraz is the predominant residue after the treatment month and it has a significant impact in the total load of pesticides found in bee brood. However, it is also remarkable that the other four pesticides present in bee brood samples (acrinathrin, coumaphos, cypermethrin and tau-fluvalinate) come from contamination in the recycled wax and/or transfer to the beebread. These pesticides reached concentrations up to 11.7 μg kg^{-1} of larvae, with one of them (coumaphos) being present in all samples. This means that the developing bees can be exposed to veterinary products even if the beekeepers do not apply them to the colony, and highlights the importance of developing effective recycling methods for the wax before their reuse.

No tendency in the chemical residues concentration could be detected in bee brood samples throughout the sampling months (Fig. 2). The presence of chemicals in the bee brood may depend on a range of factors such as the level of beebread consumption, which depends on the age of bee brood (eggs, larvae and/or pupae) or the beeswax/beebread contamination, resulting in irregular residue concentrations throughout the study.

3.2.1. Implications of the findings in bee brood

The larval development is a critical stage that can be affected by the presence of chemical contaminants, as suggested by Zhu et al. (Zhu et al., 2014). In this study, we confirmed the presence of five veterinary substances in bee brood reared under field conditions, which could have a great impact on the colony health and structure. The amount of each chemical was in all cases lower than the individual LD_{50} values found in literature for adult and/or immature honeybees. In the case of tau-fluvalinate, the maximum concentration found was 0.58 ng/larva, compared to a contact LD_{50} of 12 ng/bee (*EFSA J.*, 2010). The same happened with cypermethrin: the concentration was in all cases lower than 0.8 ng/larva and the reported LD_{50} is 33 ng/bee (European Commission: Health and consumer protection directorate, 2004). However, the possibility exists that synergetic effects between the different acaricides might lead to a toxic effect on the immature bees.

In addition to the mortality effects caused by pesticides, sub-lethal effects can also affect the colony performance and survival. However, the toxicity effects of pesticides in bee brood have only been assessed via in-vitro experiments. Wu et al. discovered delayed larval development and reduced adult longevity of bee brood reared in combs contaminated with mixtures of up to 17 pesticides including coumaphos, cypermethrin and fluvalinate at concentration levels similar to those found in the present experiment (Wu et al., 2011), the consequences being more intense when the exposition to pesticides occurs during the early stages of larval development. Another crucial aspect to consider regarding the transmission of contaminants to the bee brood is that larval defecation does not occur efficiently until they reach a certain life stage development (Wu et al., 2011).

These findings reveal that bee brood reared in field conditions is in fact exposed to chemicals through direct contact with contaminated wax and beebread although they had not been applied to the beehive. This may result in alterations of the whole colony development even if the residues are present in sub-lethal doses (concentrations lower than the LD_{50}). Further research is needed in this context to perform an adequate risk assessment regarding bee brood exposure to chemicals.

4. Conclusions

Samples of beeswax, beebread and bee brood from two different colonies have been analyzed by LC-MS/MS and GC-MS/MS applying pesticide multiresidue methods. Chemical residues have been found in wax samples at concentration levels ranging from 1 to 3798 μg kg^{-1}, with the highest concentrations corresponding to veterinary treatments such as amitraz, coumaphos or fluvalinate-tau. These compounds are transferred to beebread, which also contained plant protection residues such as chlorpyrifos or phosmet. As expected, the persistence of chemical residues in beeswax and beebread is favored by their lipophilicity: the accumulation of highly lipophilic compounds such as fluvalinate-tau is more intense than the one of amitraz residues (DMF and DMPF) or coumaphos. For the first time, bee brood samples reared under field conditions have been analyzed to assess the presence of chemicals. Five veterinary treatment residues have been detected in bee brood: acrinathrin, amitraz (sum of DMF and DMPF), coumaphos, cypermethrin and tau-fluvalinate. These compounds were also found at high concentrations in beeswax samples, and their transfer to bee brood may have occurred by direct contact with the beeswax or though the ingestion of contaminated beebread. Only amitraz had been applied to the colonies (reaching values of 167 μg kg^{-1} in bee brood in one of the sampling months), which implies that chemical residues can be transferred to bee brood due to the use of recycled wax combs.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors acknowledge funding support from the National Plan for Scientific and Technical Research and Innovation 2013–2016; National Institute for Agricultural and Food Research and Technology – INIA, in Spain, Ref. Project RTA2017-00058-C04-03. Dr. María José Gómez Ramos acknowledges funding obtained from the Spanish Government for a Ramón y Cajal Research Fellowship (RYC-2015-17959) and Francisco José Díaz-Galiano acknowledge the pre-doctoral Training University Lecturer (FPU) fellowship program (grant FPU18/05113) awarded by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities.

References

Becher, M.A., Osborne, J.L., Thorbek, P., Kennedy, P.J., Grimm, V., 2013. Towards a systems approach for understanding honeybee decline: a stocktaking and synthesis of existing models. J. Appl. Ecol. 50, 868–880.
Boi, M., Serra, G., Colombo, R., Lodesani, M., Massi, S., Costa, C., 2016. A 10 year survey of acaricide residues in beeswax analysed in Italy. Pest Manag. Sci. 72, 1366–1372.
Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simo, E., Pico, Y., 2017. Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. Sci. Total Environ. 605-606, 745–754.
Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simo, E., Pico, Y., 2018. Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: assessing beehive exposure. Environ. Pollut. 241, 106–114.
J.J. Capel-Molina, Los climas de España, in: Oikos-Tau (Ed.), 1981, pp. 432.
Colin, T., Meikle, W.G., Paten, A.M., Barron, A.B., 2019. Long-term dynamics of honey bee colonies following exposure to chemical stress. Sci. Total Environ. 677, 660–670.
Dai, P., Jack, C.J., Mortensen, A.N., Ellis, J.D., 2017. Acute toxicity of five pesticides to Apis mellifera larvae reared in vitro. Pest Manag. Sci. 73, 2282–2286.
Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tau-fluvalinate. EFSA J. 8.
European Commission: Health & consumer protection directorate, 2004a. Review Report for the Active Substance Alpha-Cypermethrin. SANCO/4335/2000. .
FAO, d. Document card "Why bees matter: the importance of bees and other pollinators for food and agriculture"http://www.fao.org/documents/card/en/c/i9527en.
Garcia, M.D., Duque, S.U., Fernandez, A.B., Sosa, A., Fernandez-Alba, A.R., 2017. Multiresidue method for trace pesticide analysis in honeybee wax comb by GC-QqQ-MS. Talanta 163, 54–64.
Gil Garcia, M.D., Martinez Galera, M., Ucles, S., Lozano, A., Fernandez-Alba, A.R., 2018. Ultrasound-assisted extraction based on QuEChERS of pesticide residues in

honeybees and determination by LC-MS/MS and GC-MS/MS. Anal. Bioanal. Chem. 410, 5195–5210.
Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347, 1255957.
Hakme, E., Lozano, A., Ucles, S., Fernandez-Alba, A.R., 2018. Further improvements in pesticide residue analysis in food by applying gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ-MS/MS) technologies. Anal. Bioanal. Chem. 410, 5491–5506.
Haydak, M.H., 1970. Honey bee nutrition. Annu. Rev. Entomol. 15, 143–156.
Herrera Lopez, S., Lozano, A., Sosa, A., Hernando, M.D., Fernandez-Alba, A.R., 2016. Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC-ESI-MS/MS. A pilot study. Chemosphere 163, 44–53.
Jan Kochansky, K.W., Feldlaufer, Mark, 2001. Comparison of the transfer of coumaphos from beeswax into syrup and honey. Apidologie 32, 119–125.
La vegetación de Andalucía. In: Cabezudo, B., Nieto, J.M. (Eds.), Introducción a la Flora Andaluza, Agencia de Medio Ambiente. Consejería de Cultura y Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
Lozano, A., Hernando, M.D., Ucles, S., Hakme, E., Fernandez-Alba, A.R., 2019. Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. Food Chem. 274, 61–70.
MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), d. Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC)http://sigpac.mapa.es/fega/visoR/.
Medici, S.K., Maggi, M.D., Sarlo, E.G., Ruffinengo, S., Marioli, J.M., Eguaras, M.J., 2016. The presence of synthetic acaricides in beeswax and its influence on the development of resistance in Varroa destructor. J. Apic. Res. 54, 267–274.
Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., Vanengelsdorp, D., Pettis, J.S., 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. PLoS One 5, e9754.
Ostiguy, N., Eitzer, B., 2015. Overwintered brood comb honey: colony exposure to pesticide residues. J. Apic. Res. 53, 413–421.
Paolo Tremolada, I.B., Colombo, Mario, Spreafico, Massimo, Vighi, Marco, 2004. Coumaphos distribution in the hive ecosystem: case study for modeling applications. Ecotoxicology 13.
Pohorecka, K., Szczęsna, T., Witek, M., Miszczak, A., Sikorski, P., 2017. The exposure of honey bees to pesticide residues in the hive environment with regard to winter colony losses. Comput. Struct. Biotechnol. J. 61, 105–125.
Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., Touffet-Briens, F., 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie 36, 71–83.
Royal Decree 608, 2006. Of May 19, Which Establishes and Regulates a National Program for the Control of Diseases of Honey Bees.
Sanchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N., 2016. Are bee diseases linked to pesticides? - a brief review. Environ. Int. 89-90, 7–11.
SANTE/11813/2017, 2017. Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed.
Serra-Bonvehi, J., Orantes-Bermejo, J., 2010. Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. Pest Manag. Sci. 66, 1230–1235.
Shimshoni, J.A., Sperling, R., Massarwa, M., Chen, Y., Bommuraj, V., Borisover, M., Barel, S., 2019. Pesticide distribution and depletion kinetic determination in honey and beeswax: model for pesticide occurrence and distribution in beehive products. PLoS One 14, e0212631.
Stokstad, E., 2007. Entomology. The case of the empty hives. Science 316, 970–972.
S. Talavera Lozano, Herrera, J., Arroyo Marín, J., Devesa Alcaraz, J.A. y Ortiz Ballesteros, P.L., Estudio de la flora apícola de Andalucia Occidental, Lagascalia, 15 (extra) (1988) 567–591.
Tavares, D.A., Roat, T.C., Carvalho, S.M., Silva-Zacarin, E.C., Malaspina, O., 2015. In vitro effects of thiamethoxam on larvae of Africanized honey bee Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae). Chemosphere 135, 370–378.
Thompson, H.M., Levine, S.L., Doering, J., Norman, S., Manson, P., Sutton, P., von Merey, G., 2014. Evaluating exposure and potential effects on honeybee brood (Apis mellifera) development using glyphosate as an example. Integr. Environ. Assess. Manag. 10, 463–470.
P. Tremolada, Vighi, M., Mathematical models for the comprehension of chemical contamination into the hive, In Silico Bees, CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 153–178.
Ucles, S., Lozano, A., Sosa, A., Parrilla Vazquez, P., Valverde, A., Fernandez-Alba, A.R., 2017. Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. Talanta 174, 72–81.
Vazquez, P.P., Lozano, A., Ucles, S., Ramos, M.M., Fernandez-Alba, A.R., 2015. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1426, 161–173.
Visscher, P.K., Seeley, T.D., 1982. Foraging strategy of honeybee colonies in a temperate deciduous forest. Ecology 63.
Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (Apis mellifera) development and longevity. PLoS One 6, e14720.
Zhu, W., Schmehl, D.R., Mullin, C.A., Frazier, J.L., 2014. Four common pesticides, their mixtures and a formulation solvent in the hive environment have high oral toxicity to honey bee larvae. PLoS One 9, e77547.

CAPÍTULO 3

APISTRIPS

CAPÍTULO 3. CONCEPTUALIZACIÓN, DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE LA APISTRIP PARA EL MUESTREO PASIVO DE CONTAMINANTES

Desarrollo de una alternativa al muestreo activo de matrices apícolas

Como se ha descrito en el Capítulo 1, en 2018 comenzó el proyecto INSIGNIA (*Pilot project on environmental monitoring of pesticide use through honeybees*), dirigido por representantes de diferentes países europeos, incluida la Universidad de Almería. Este proyecto fue concebido con el objetivo de diseñar y probar un protocolo de monitorización ambiental no invasivo y basado en ciencia ciudadana, que se aplicaría después para realizar una monitorización a gran escala en los países participantes. Las monitorizaciones permitirían determinar la presencia de plaguicidas en el medioambiente, así como conocer el estado de la biodiversidad vegetal a través del *metabarcoding* del polen. El rol de la Universidad de Almería consistía en desarrollar un muestreador pasivo capaz de captar los contaminantes que circulan en el interior de las colmenas, y en realizar su posterior análisis multirresiduo.

El adsorbente seleccionado para este fin fue el Tenax, que ya había demostrado tener una gran versatilidad tanto de aplicaciones como de compuestos que puede captar. Se aprovechó su solubilidad en disolventes organoclorados para crear láminas uniformes que quedaban completamente adheridas al soporte plástico, de forma que se asegurase su integridad física durante todo el periodo de muestreo. Por su parte, las dimensiones del soporte plástico se optimizaron de forma que se facilitara su inserción en las colmenas.

Se crearon de este modo las primeras APIStrips (*Absorb–Pesticide–Inhive Strip*), que fueron sometidas a unas pruebas preliminares para determinar la cantidad óptima de Tenax a emplear, así como el periodo mínimo de muestreo, la estabilidad de los plaguicidas adsorbidos y su reproducibilidad como muestreadores. En este último aspecto, tanto las pruebas preliminares como los primeros estudios de campo sugerían que el análisis APIStrips era más representativo que el de matrices apícolas clásicas, y que estos muestreadores constituían una alternativa más sencilla que además resulta inocua para las abejas. En las 120 APIStrips empleadas en los muestreos de Dinamarca durante 2019 en el marco del proyecto INSIGNIA se identificaron hasta 40 residuos de plaguicidas diferentes, algunos de ellos de forma continuada en el tiempo.

Publicación 2

APIStrip, a new tool for environmental contaminant sampling through honeybee colonies

María Murcia-Morales, Jozef J.M. Van der Steen, Flemming Vejsnæs, Francisco José Díaz-Galiano, José Manuel Flores, Amadeo R. Fernández-Alba

Science of the Total Environment 729 (2020)

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138948

Science of the Total Environment 729 (2020) 138948

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

APIStrip, a new tool for environmental contaminant sampling through honeybee colonies

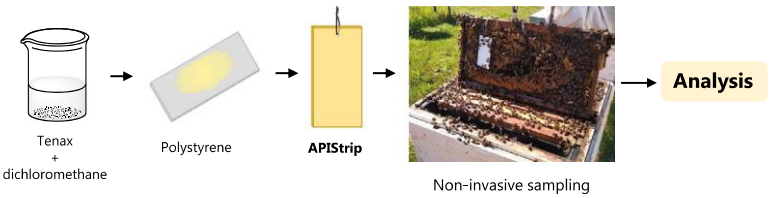
María Murcia-Morales [a], Jozef J.M. Van der Steen [b], Flemming Vejsnæs [c], Francisco José Díaz-Galiano [a], José Manuel Flores [d], Amadeo R. Fernández-Alba [a,*]

[a] Chemistry and Physics Department, University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), 04120 Almería, Spain
[b] Alveus AB Consultancy, Oisterwijk, the Netherlands
[c] Danish Beekeepers Association, Fulbyvej 15, 4180 Sorø, Denmark
[d] Department of Zoology, University of Córdoba, Campus of Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

HIGHLIGHTS

- Honeybee colonies can be used to monitor the environmental contamination.
- Passive sampling minimizes the interactions derived from monitoring studies.
- The APIStrip is an in-hive passive sampler that binds contaminants to its surface.
- APIStrip-based sampling is reproducible and non-invasive.
- Field studies performed in Cordoba –Spain– and Denmark.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 March 2020
Received in revised form 20 April 2020
Accepted 22 April 2020
Available online 28 April 2020

Editor: Yolanda Picó

Keywords:
Passive sampling
Tenax
Environmental monitoring
Pesticide residues
Beehives

ABSTRACT

Honeybee colonies are proven bio-samplers in their foraging area, as organic contaminants such as pesticides are continuously deposited in their hives. However, the use of honeybee colonies for the biomonitoring of contaminants requires the sampling of biological matrices such as bees, pollen, honey or beeswax. This active sampling alters the colonies, especially in the case of frequent sampling intervals. In this study, a non-biological passive sampler based on Tenax TA is described: the APIStrip (Adsorb Pesticide In-hive Strip). A concentrated solution of Tenax in dichloromethane has been applied to a polystyrene strip, resulting in a bee-proof, in-hive passive sampler. The pesticides and related contaminants adsorbed onto its surface can be extracted in acetonitrile and analyzed by LC-MS/MS and GC–MS/MS. The APIStrip preparation has been optimized, the optimal exposure period has been stablished as 14 days and the stability of the pesticides on the APIStrip surface has been evaluated. Preliminary tests demonstrated the efficacy, sensitivity, representativeness and reproducibility of the APIStrip-based sampling when compared to the analysis of beeswax comb, which facilitates the detection of contaminants even in beehives exposed to low polluting pressure. Field studies in Denmark, performed in the INSIGNIA monitoring study over a six-month period, demonstrated their value and applicability by detecting 40 different pesticide residues.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The potential of honeybee colonies to act as active samplers of xenobiotics and the interest in properly evaluating their exposure to

* Corresponding author at: University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Ctra. Sacramento S/N°, La Cañada de San Urbano, 04120 Almería, Spain.
E-mail address: amadeo@ual.es (A.R. Fernández-Alba).

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138948
0048-9697/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

contaminants has focused attention on improving beehive sampling procedures. Even though there have been a few hundred papers published on these topics, there is still a considerable lack of information because of (i) the wide variety of matrices analyzed (bees, beeswax, beebread etc.) making result harmonization or standardization difficult, (ii) the often limited number of metabolites included in the evaluation, (iii) the different analytical tests applied in terms of scope and LOQs and (iv) the scarcity of studies regarding the air within the hive.

Contaminants can enter the hive via different routes: during the foraging flights, during the actual foraging, via air flux and by chemical application into the hive (Krupke et al., 2012; Porrini et al., 2003). Previous studies have shown that the pesticides found at the highest concentrations in the beehive matrices are usually veterinary products used by the beekeepers in an attempt to control pests, although phytosanitary products are also frequently detected (Lozano et al., 2019). Bees are exposed to plant protection products such as herbicides or insecticides during their foraging activities, in which they are in close contact with crops in a ratio up to 12 km^2 from their beehive. The many thousands of foraging bees from one honeybee colony transport nectar and pollen to a single location, the hive. Inside the hive, along with the nectar and pollen, xenobiotics and plant pathogens are exchanged among the in-hive bees via trophallaxis, auto- and allogrooming and physical contact (DeGrandi-Hoffman and Hagler, 2000). Within a few hours, all of the bees in the hive carry the collected particles to a greater or lesser extent (Rortais et al., 2005; Paalhaar et al., 2007). Therefore, the analysis of beehive matrices can be a useful tool for the assessment of environmental contamination, as stated by previous authors (Lambert et al., 2012; Kammoun et al., 2019).

Until very recently, colony sampling was performed invasively by removing the bees, pollen, honey or wax (Lozano et al., 2019; Chauzat et al., 2011). Apart from the ethical issues concerning killing honeybees or taking their food, sampling is a delicate balance between disruption and alteration of the test system and its natural buffer capacity of bees and food, notably in case the honeybee colony is applied for monitoring study with frequent sampling. Furthermore, as it has been commented above, results from bee related samples are very difficult to standardize as possible inhomogeneous xenobiotic distribution, different sizes and contamination history etc.

This problem can be overcome by using passive samplers. These devices physically or chemically bind the molecules that pass through the sampler without impacting the environment (Kalina et al., 2017). The first-generation of passive samplers used in honeybee studies were in tubes placed outside the hive entrance (Steen et al., 2017). For this reason, they were not the target for hygienic removal. The bees came into contact with the sampler as they walked through the tube when leaving or entering the hive; a cohort of between 25 and 40% of the colony population would do so, the contact being, by definition, shallow. A potential risk/disadvantage of using the outside-hive passive sampler is its exposure to climatic conditions, which might impact the binding capacity and contact moments (Clarke and Robert, 2018). Conversely, in-hive passive samplers are not exposed to these climate conditions given that the in-hive conditions are relatively constant, especially in the brood nest area. Inside the hive, the bees perform a *Perpetuum mobile*, carrying out age-related tasks, food exchange, food storage and regulating the colony temperature, forming a homogeneous population of castes (van der Steen et al., 2015). Therefore, there is be a continuous contact between the bees and the passive samples, and the xenobiotics can be adsorbed onto the sampler surface both by direct contact with bees and the materials they are carrying, and through indirect adsorption from the air inside the beehive. In theory, the application of an in-hive passive sampler is a logical step for correctly standardizing the analytical results. Nonetheless, there are still the extreme hygienic features of the honeybee colony to contend with as the bees make sure that anything in the hive that does not belong there will be removed - this demands a "bee-proof" passive sampler.

In the INSIGNIA pilot study, non-invasive sampling performed by citizen-science apiculturists was a prerequisite. Apiculture citizen-science studies require simple tools. The challenge was to develop an effective in-hive passive pesticide sampler that the citizen-scientist beekeepers could easily handle and store.

In this context, Tenax TA (a porous polymer resin based on 2,6-diphenyl-*p*-phenylene oxide) is one of the most versatile adsorbents used for the sampling of environmental contaminants (Dettmer and Engewald, 2002; Maier and Fieber, 1988). This material, which shows high thermal stability (>400 °C), has been typically employed for the passive detection of compounds such as benzene and its derivatives in the air by diffusion through tube-type samplers (Patil and Lonkar, 1994). The use of these tubes, covered with Tenax TA particles, for the monitoring of substances in the atmosphere can be also performed actively by pumping the air (Heitmann et al., 2011). A different application of Tenax TA consists in the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), pesticides, chlorobenzenes and other contaminants from sediments (Sormunen et al., 2010; Cornelissen et al., 1997; You et al., 2011; Lydy et al., 2015). In this case, the sample is mixed with Tenax TA and shaken; afterwards, the residues are desorbed with the use of an organic solvent.

Tenax TA has also been used in the form of thin films for the coating of miniaturized preconcentrators (μPCs) (Alfeeli et al., 2010a) and for solid-phase microextraction purposes (Alfeeli et al., 2010b). In these cases, its high solubility in chlorinated hydrocarbons is employed for the preparation of homogeneous layers of adsorbent material. These studies showed that the adsorption properties of Tenax are the same when it is used in solid phase (commercial Tenax beads) and in film form (after being dissolved in dichloromethane) (Alfeeli et al., 2010b). It has also been shown that there is a direct proportion between the film concentration and the adsorption capacity.

The main objective of the present study was the development of a new "bee-proof" passive sampling device to be introduced inside the beehives, avoiding the need of taking apicultural samples: the APIStrip (Adsorb-Pesticide-Inhive Strip). Tenax has been selected as the coating material for the pesticide and contaminant monitoring. The device is intended to provide information about the bees' exposure to chemicals and to perform an environmental monitoring under field conditions. The subsequent desorption of contaminants and their analysis using multiresidue methods based on gas chromatography and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC–MS/MS and LC-MS/MS) has also been assayed. The scope of the methods covers 442 pesticide residues and their main metabolites at low limits of quantification (sub μg/kg).

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

All high-purity pesticide standards were obtained from LGC (Teddington, United Kingdom), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) or Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and were stored at −30 °C. Individual pesticide stock solutions (1000–2000 mg/L) were prepared in acetonitrile and were stored in amber screw-capped glass vials in the dark at −20 °C. Individual standard solutions, used for the optimization, along with standard-mix solutions, used for the calibration, were prepared from the stock standards.

Optima LC-MS grade water was obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). LC-MS grade methanol and ethyl acetate for pesticide residue analysis were purchased from Fluka Analytical (Steinheim, Germany). Ultra-gradient HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck.

The following glues were tested during the APIStrip design optimization: heavy duty double-sided adhesive tape (Ceys Montack Express), spray adhesive (Rayt Novopren), polyurethane glue (Brink-Cen B-1438), SMP adhesive (UHU Polymax cristal Ref.17759315), polyester

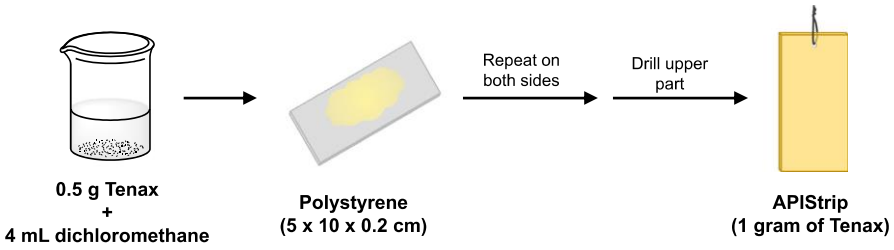


Fig. 1. Preparation of APIStrips.

resin (Regarsa 453,010), adhesive sealant (Ceys Total Tech 7204099) and epoxy resin (Presto 19428843).

2.2. APIStrip preparation, characterization and sampling

A thin polystyrene plastic layer was selected as the base for the sampling device. This non-toxic and inert material shows high mechanic resistance, flexibility, no water absorption and resistance to light and temperature.

For the preparation of the APIStrips, 8 mL of a Tenax solution in dichloromethane at high concentration (125 mg/mL) were applied to both sides of the polystyrene layer ($5 \times 10 \times 0.2$ cm). After the evaporation of the solvent under a gentle nitrogen current, the upper section of the strip is drilled to form a small hole (Fig. 1). The resulting APIStrips contain 1 g of Tenax each (0.5 g per side). A thread or wire is then introduced inside the hole to facilitate the introduction of the APIStrips inside the beehive, where they remain for two weeks (sampling period).

SEM micrographs were taken to assess the porous nature of the commercial Tenax beads (Fig. 2a), and the Tenax solution in dichloromethane (Fig. 2b). As can be seen, both matrices are highly porous, with a pore structure similar to that described previously in literature (Alfeeli et al., 2010b). Fig. 2c shows the transversal section of the APIStrip: the upper part of the image represents the Tenax layer, and the lower part corresponds to the polystyrene support. As can be seen, the Tenax solution penetrates into the top layer of the plastic support, which ensures a strong adherence.

2.3. APIStrip extraction procedure

The desorption procedure of the pesticides from the Tenax surface was carried out at follows: first, the APIStrips were cut in small pieces and placed inside 50 mL PTFE centrifuge tubes. Then, 10 mL of

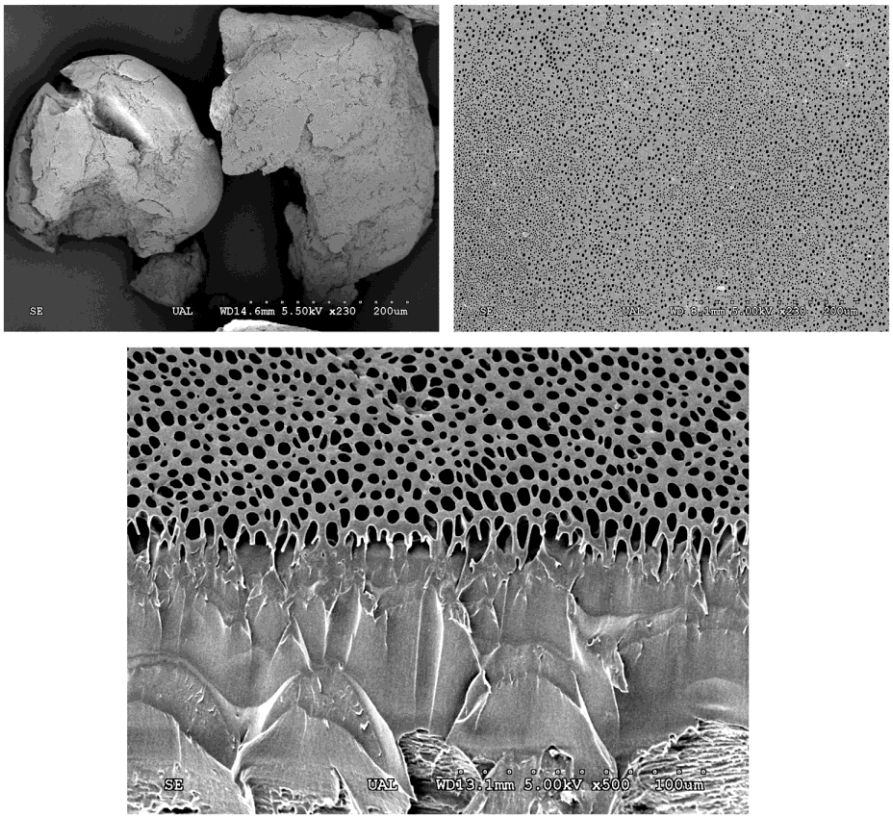


Fig. 2. SEM micrographs of (a) Tenax TA commercial beads; (b) Tenax solution in dichloromethane (125 mg/mL); (c) transversal section of the APIStrip.

acetonitrile were added and the samples were automatically shaken at 1250 rpm (Geno/Grinder 2010, SPEX) for 3.5 min and centrifuged at 4000 rpm for 5 min.

Procedural internal standards were used as surrogate standards to control the extraction performance: dichlorvos-D6, malathion-D10, carbendazim-D3 and triphenyl phosphate (TPP). The recovery of dichlorvos-D6, malathion-D10 and carbendazim-D3 was checked by LC and the recovery of malathion-D10 and triphenyl phosphate was tested by GC.

For the preparation of the injection vials, different procedures were followed according to the analytical technique. For liquid chromatography vials, 1 mL of extract was evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 100 μL of acetonitrile; afterwards, 400 μL of ultrapure water were added. For gas chromatography, 500 μL of extract were evaporated and reconstituted with 50 μL of ethyl acetate. In both cases, the vial preparation entails a 10-fold concentration. Injection internal standards (dimethoate-d6 for LC, lindane-d6 for GC) were employed to check the variations in the injection volume.

Calibration curves were prepared as follows: a blank APIStrip extract (500 μL for GC–MS/MS, 1 mL for LC-MS/MS) was evaporated and reconstituted with an organic solvent (50 μL ethyl acetate for GC–MS/MS, 100 μL acetonitrile for LC-MS/MS) containing a mixture of pesticides at 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 or 200 μg/L. For the LC vials, 400 μL of ultrapure water were added.

2.4. Extraction of honey samples

The extraction of the honey samples was performed following the QuEChERS method with a thermostatted automatic shake. A 10 g portion of homogenized sample was weighed in a 50 mL PTFE centrifuge tube and 10 mL of acetonitrile were added. The samples were shaken in an automatic axial extractor for 4 min. Then, 4 g MgSO4, 1 g NaCl, 1 g trisodium citrate dihydrate and 0.5 g disodium hydrogencitrate sesquihydrate were added and the samples were shaken in the automatic axial extractor for 5 min using the holder temperature at 40 °C. The extracts were then centrifuged (4500 rpm) for 5 min. A 5 mL volume of the supernatant was transferred to a 15 mL PTFE centrifuge tube containing 750 mg of $MgSO_4$ and 125 mg of PSA. The samples were shaken in a vortex for 30 s and centrifuged again (3500 rpm) for 5 min. Finally, the extracts were transferred to an amber vial and they were acidified with 10 μL of formic acid 5% per mL of extract. Procedural internal standards were used as surrogate standards to control the extraction performance as in the APIStrip extractions.

During the preparation of the sample vials, different procedures were followed according to the analytical technique. For gas chromatography, 50 μL of the honey extracts were evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 50 μL of ethyl acetate. For the LC injection vials, 100 μL of the extract were diluted with 400 μL of water. Dimethoate-d6 and lindane-d6 were used as injection internal standards in all vials for LC and GC, respectively.

Calibration curves were prepared as follows: a blank extract (50 μL for GC–MS/MS, 100 μL for LC-MS/MS) was evaporated and reconstituted with the same volume of an organic solvent (ethyl acetate for GC–MS/MS, acetonitrile for LC-MS/MS) containing a mixture of pesticides at 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 or 200 μg/L. For the LC vials, 400 μL of ultrapure water were added.

2.5. GC-QqQ-MS/MS analysis

The analyses by gas chromatography were performed in an Agilent Intuvo 9000 GC system equipped with an Agilent 7693 autosampler and an Agilent 7010 GC–MS/MS triple quadrupole. Data acquisition and processing was developed by Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis software version 10.0. The samples were injected using a multimode injector inlet in splitless mode, through an Agilent ultra-inert inlet liner with a glass wool frit. The injection volume was 1 μL. The injector temperature was kept at 80 °C during the solvent evaporation stage (0.1 min) and then ramped up to 300 °C at 600 °C/min for 5 min and up to 250 °C at 100 °C/min. Two planar columns (Agilent), HP-5MS UI 15 m long × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness were used.

The oven temperature program was as follows: 60 °C for 0.5 min, up to 170 °C at 80 °C/min and finally up to 310 °C at 20 °C/min. The total run time was 12.4 min with 2.1 additional min for backflushing at 310 °C. The instrument worked at a constant flow (1.28 mL/min column 1, 1.48 mL/min column 2). The system worked in dynamic MRM, acquiring the transition in a ± 0.2 min window from the retention time of the analyte. Helium (99.999% purity) was used as the carrier and quenching gas, and nitrogen (99.999% purity) as the collision gas. The collision and quenching gas flows were 1.5 mL/min and 2.25 mL/min, respectively. Both the transfer line and the ion source -operated in electron ionization- were maintained at 280 °C. The quadrupole analyzer temperature was fixed at 150 °C. The solvent delay was 2.6 min.

For the optimization of the MS parameters, all pesticides were monitored in full-scan mode in the 50–550 *m/z* range. The first step was the selection of the precursor/s ion/s for each analyte and the retention time, injecting individual solutions for each pesticide at 1 mg kg^{-1} in full-scan mode. The ion with the highest intensity and *m/z* relationship was selected as the precursor ion. Precursor ion fragmentation was performed by collision-induced dissociation with nitrogen, from which the best fragment ions were chosen. Once the fragment ions were selected, the adequate CE for each transition was assayed in the 3–40 eV range. Retention times, transitions and CEs for the analyzed compounds were already presented by Hakme et al. in a previous work (Hakme et al., 2018).

2.6. LC-QqQ-MS/MS analysis

An Agilent UPLC 1290 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to an Agilent Technologies 6490 Triple Quad LC/MS was used for this study. Data acquisition and processing was developed by Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis software version 10.0, using dynamic MRM software features with a retention time window of 0.8 min. The injection volume was 5 μL except for the bee brood samples (10 μL), and the chromatographic separation was carried out with a Zorbax Eclipse Plus C8 column (Agilent), 2.1 mm × 100 mm × 1.8 μm. The system employed 0.1% formic acid in milliQ water (mobile phase A),and 0.1% formic acid and 5% water in acetonitrile (mobile phase B)with the following gradient: 20% of B for 2 min, a linear gradient up to100% of B in 13 min and finally an isocratic mode at 100% of B for2 min. Subsequently, an equilibration step coming back to 20% of B (2.5 min) was performed. The system was provided with a JetStream electrospray ion source, employing nitrogen as the nebulizer gas. This ion source was configured as follows: 120 °C for the drying gas temperature, 13 L/min for the drying gas flow rate, 45 psi for the nebulizer pressure, 375 °C for the sheath gas temperature and 10 L/min for the sheath gas flow rate. The MS used nitrogen as the collision gas (99.999% purity), 380 V for the fragmentor and 3000 V for the capillary voltage, both in positive and negative mode.

For the optimization of the MS parameters, all pesticides at 0.1 mg/L (acetonitrile:water, 1:1, v/v) were injected directly into the MS system in full-scan mode within the 50–800 *m/z* range. From this injection, the precursor ion was selected. Then, one more injection in product ion mode was needed to choose two fragment ions and the optimum collision energy (CE) for each transition. The most intense transition was selected as the quantifier transition (SRM1), while the second most intense was chosen as the qualifier transition (SRM2). Retention times, transitions and CEs for each analyzed compound were previously published in a previous study (Ucles et al., 2017).

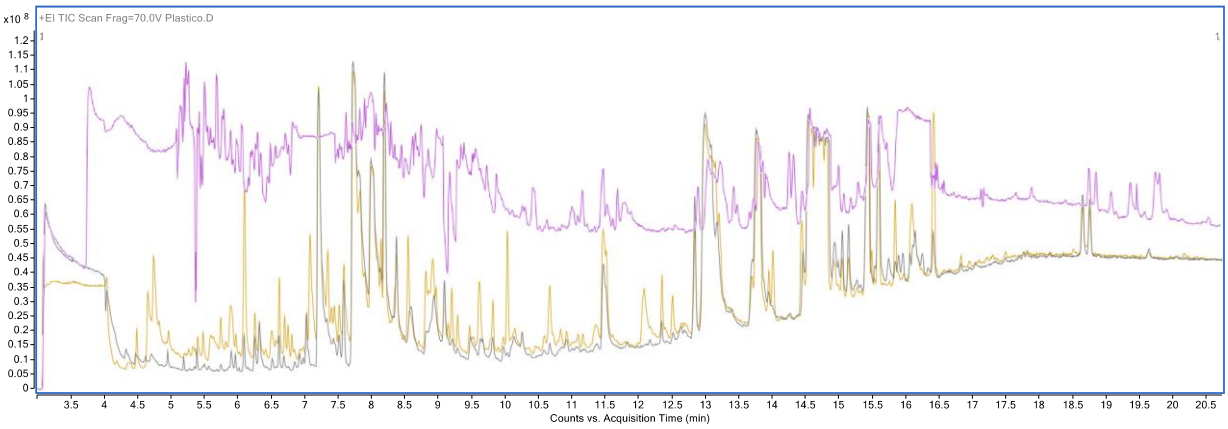


Fig. 3. Total ion chromatogram (TIC) obtained by GC-TOF-MS for different APIStrip designs: polystyrene support only (lower line), APIStrip with Tenax layer in dichloromethane (middle line), APIStrip prepared with epoxy resin (upper line).

2.7. Field studies

2.7.1. Validation field studies

The preliminary experiments for the optimization of the APIStrips (sampling time and reproducibility) took place in experimental apiaries located at the University of Cordoba (37° 55′33.5″N, 4° 43′26.1″W), in the South of Spain. The apiary was located in a mixed zone. The 3 km ratio where the bees' main foraging activity takes place is located between the Guadalquivir River (south) and Sierra Morena foothills (north). There are small streams nearby, with low or null flow during the experiment, as well as natural areas, agricultural areas, residential areas, an animal farm and a small industrial zone. The main toxic risks for bees are derived from the treatments applied by the beekeepers to control the parasitic mite *Varroa destructor* and the use of phytosanitary products in the crops nearby. Other risks include the animal farm located 500 m away from the apiary, the residential area and the industrial zone.

The validation essays that took place in Cordoba beehives always involved an extra blank APIStrip that was sent to the apiary and then sent back to the laboratory. This APIStrip was used to check if crossed contamination occurred during the transportation of the APIStrip samples.

2.7.2. Biomonitoring field studies

Four apiaries were used for the field studies in Denmark on the island of Zealand (apiary 1 55°32′53.6″N, 11°34′32.1″E; apiary 2 55°27′36.3″N, 11°34′12.3″E; apiary 3 55°55′57.9″N, 11°55′17.2″E; apiary 4 55°57′14.1″N, 12°17′33.4″E). All apiaries were within 100 km of distance and covered different pollution gradient, ranging from heavy farming (high pollution) to organic forest areas (very low pollution). The veterinary treatments employed against the parasitic mite *Varroa destructor* in all apiaries followed the EU recommendation for organic beekeeping, using biotechnical methods (dronebrood removal) and organic acids like formic acid and oxalic acid, which are substances naturally present in honey. Thymol treatment is regarded as well as a natural approach against *Varroa destructor* and can be found natural in honey.

All samplings were mainly performed on the same weekday every second Friday during the sampling season. First APIStrips were inserted on the 26th April 2019 and the last sampling was on the 13th September 2019. All apiaries were in driving distance and, therefore, an adviser was present during all samplings. The transportation of the samples where direct to the national coordinator, where they were stored in the freezer (minimum at minus 18°) until express shipment to the analytical laboratory in Almeria, Spain. Shipment was performed at room temperature.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of Tenax coating on the plastic surface

One of the main aspects that were considered during the development of the APIStrips was their robustness. Bees try to remove the foreign objects introduced inside their hives and, as a close contact with the strips is expected, there is a risk of partial loss of the adsorbent material. To avoid this, Tenax should be strongly coated on the plastic surface to ensure it will not cause harm to the colony. The following glues and modes of preparation were tested: heavy duty double-sided adhesive tape, spray adhesive, polyurethane glue, SMP (silyl modified polymer) adhesive, polyester resin, adhesive sealant and epoxy resin. However, the small Tenax beads were not retained enough on the plastic surface with any of these methods and the resulting device did not meet the absolute requirement of a solid passive sampler. Even if the strips seemed solid, bees managed to remove part of the Tenax beads during the preliminary tests.

Therefore, a different approach was adopted. Tenax is soluble in certain chlorinated solvents such as dichloromethane, resulting in Tenax films that can be used as sorbents (Alfeeli et al., 2010a; Alfeeli et al., 2010b). Alfeeli et al. stated that the adsorption capacity is directly related to the solution's concentration when analyzing volatile organic compounds (Alfeeli et al., 2010b). For the preparation of the APIStrips, the Tenax solution in dichloromethane was prepared at 125 mg/mL, obtaining a dense liquid. The freshly prepared solution was applied to the plastic surface before the solvent evaporation took place.

Polypropylene shows a reduced resistance to dichloromethane and it can be partially solved in it. Therefore, the Tenax solution penetrates into the upper layers of the plastic support and the adsorbent is completely adhered to it, ensuring the resistance of the APIStrip.

Table 1
Concentration (in μg/kg) of the pesticides detected in the APIStrips prepared with different amounts of Tenax.

Pesticide	0.5 g of Tenax	1 g of Tenax	2 g of Tenax
Acrinathrin	77	69	74
Coumaphos	50	52	46
Fluvalinate-tau	46	43	42
Phosmet	4.4	4.0	3.7
Thymol	26	21	22
Chlorfenvinphos	0.7	0.7	0.6
DMF	60	73	63
DMPF	39	46	44

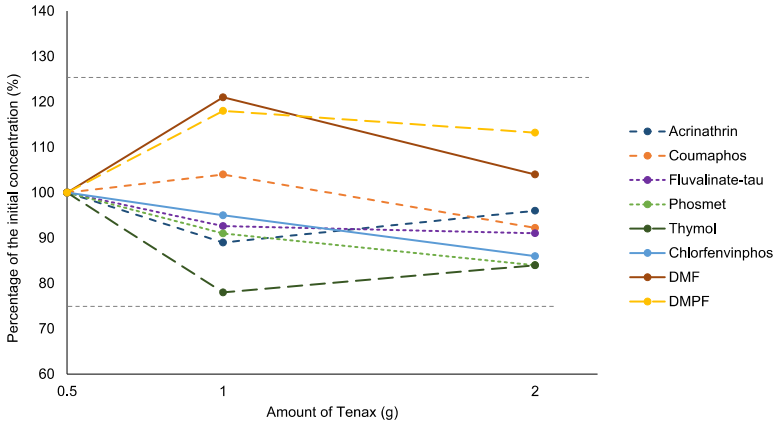


Fig. 4. Standardized concentration of the pesticides detected in the APIStrips prepared with different amounts of Tenax. The dashed horizontal lines represent a ±25% variation with regard to the 0.5-gram APIStrip.

The use of a Tenax layer avoids the need of using additional substances such as glues. The APIStrips consist exclusively of the polystyrene support and the Tenax layer, as the dichloromethane is quickly evaporated from the surface. This has two main effects:

- The APIStrips contain only inert materials and they do not release any substance into the beehives; the only effect is the adsorption of organic molecules in the hive's environment.
- The number of co-extracted compounds is greatly reduced and the APIStrip matrix contains a very small amount of interferences. This facilitates their analysis by GC–MS/MS and LC-MS/MS, as the background baseline and the interferences are considerably low (Fig. 3).

3.2. Optimization of the Tenax amount per APIStrip

The amount of Tenax necessary to obtain the maximum adsorption capability was essayed by preparing 3 APIStrips with different concentrations of Tenax: 0.5 g, 1 g and 2 g. The volume of dichloromethane was the same in all cases, the difference being the mass of Tenax solved in it. These 3 APIStrips were placed close together in the same beehive for a fixed amount of time (14 days) and the results of their analyses by GC–MS/MS and LC-MS/MS were compared (Table 1). The concentration units of all the APIStrip analyses are expressed as μg of detected residue per kg of Tenax.

In Fig. 4, these results have been standardized so that 100% represents the concentration in the 0.5-gram APIStrip. The use of 2 g of Tenax does not allow the detection of higher amount of pesticides nor higher concentration of them. Likewise, the pesticides and concentrations detected when using only 0.5 g of Tenax were very similar to those obtained with the use of 1 g. The small variations are in the range of the inherent uncertainty values of these types of analyses: in all cases, the results show a deviation lower than 25% from the concentration found in the APIStrip containing 0.5 g of Tenax. Therefore, the amount of Tenax per APIStrip could be reduced to 0.5 g, but further research is needed to ensure that the adsorption capability would not be affected. In the APIStrips containing 1 g of Tenax, employed for the subsequent field studies, the concentration units (μg/kg Tenax) are equivalent to ng of residue per APIStrip (ng/APIStrip).

3.3. Optimization of the sampling time period

The time that the APIStrips remain inside the beehives to achieve an acceptable adsorption of the pesticides has been assayed. For that purpose, four different APIStrips were placed simultaneously and very close together inside a same beehive. Each APIStrip was removed after a defined amount of time: 3 days, 7 days, 10 days and 14 days. The results of the pesticides detected by GC–MS/MS and LC-MS/MS are shown in Table 2.

In Fig. 5, the results have been standardized so that 100% represents the concentration found in the 3-day APIStrip (considered as the initial concentration). As can be seen, all of the detected pesticides show a higher concentration after a minimum of 10 days inside the beehive. In some of them, such as tau-fluvalinate, the concentration reaches values three times higher than the initial results. Moreover, phosmet (a pesticide present at a very low concentration) can only be detected if the APIStrip has remained in the beehive for at least 10 days.

3.4. Reproducibility of the APIStrip-based sampling

The minimum number of APIStrips required per beehive to obtain representative results was also studied. With this aim, four APIStrips were distributed in different parts of a single beehive (A, bee bread zone; B, bee brood zone; C, honey zone; D, mixed zone). After a period of two weeks, these APIStrips were analyzed separately. Four beehive portions that had been in direct contact with each APIStrip were also extracted following a procedure described elsewhere (Lozano et al., 2019) and the results of each individual matrix were compared (Table 3). In the four cases, the portions of beehive were directly collected from the beehives and consisted of a mixture of beeswax, honey, bee brood and pollen (the wax being always the major component).

Ten pesticide residues were detected in the beehive samples (amitraz concentration defined as the sum of DMF and DMPF), and

Table 2
Concentration of the pesticides detected in the APIStrips placed for different amounts of time in the beehive (μg/kg).

Sampling time	Acrinathrin	Coumaphos	Fluvalinate-tau	Phosmet	Thymol	DMF	DMPF
3 days	11	13	3.2	–	25	92	67
7 days	11	15	4.4	–	24	271	150
10 days	28	35	10	0.8	34	297	199
14 days	27	31	11	0.5	27	198	190

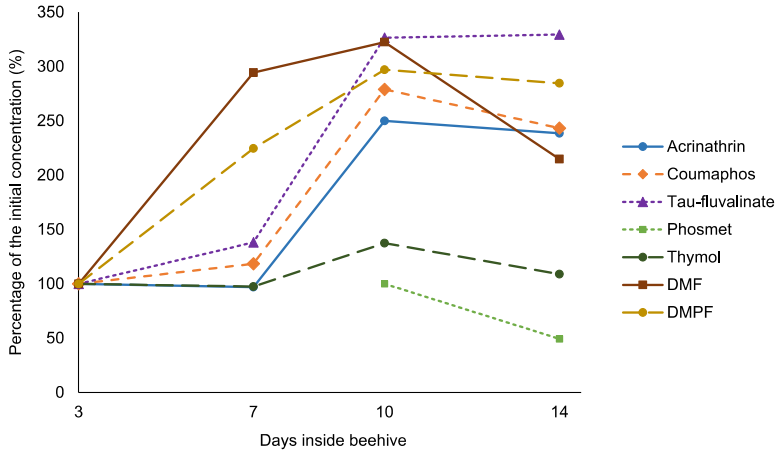


Fig. 5. Standardized concentration of the pesticides detected in the APIStrips placed for different amounts of time in the beehive.

eight were found in the APIStrips. The average concentrations of both matrices were in all cases very similar, e.g. 5 μg/kg of acrinathrin in the beehive samples and 4 μg/kg in the APIStrips. However, the individual concentrations in the beehive samples show in general a higher variability (in terms of % RSD) than those found in APIStrips. This means that a single APIStrip provides similar or even more representative results than a single beehive sample, i.e. a concentration closer to the average value in the beehive. Therefore, the colocation of one APIStrip per beehive results in more efficient and easier samplings. This can be explained on the basis of an unequal distribution of the pesticides in beehive matrices such as beeswax, beebread or honey. In these matrices, a non-homogeneous exposure to pesticides and/or veterinary treatments is expected, thus reducing the representability of a single sample. On the other hand, the APIStrips adsorb the pesticides circulating in the whole beehive environment (including the air and the residues carried by the bees on their bodies). Furthermore, the use of APIStrips allows unlimited samplings without the destruction of the matrix (as opposed to the active sampling of beebread, beeswax or other matrices, which are consumed in the process).

Two pesticides were detected in beehive samples but not in APIStrips: cypermethrin and prothiofos. In these cases, only one out of the four beehive samples showed a positive result and the concentration was low (4.0 and 0.9 μg/kg respectively).

3.5. Stability of pesticides on the APIStrip surface

A mixture containing 196 LC-amenable and GC-amenable pesticides was prepared at 1 mg/L. This solution was employed for the spiking of five APIStrips, at a final concentration of 100 μg/kg (100 ng per gram of Tenax). One of the APIStrips was immediately extracted and analyzed by LC-MS/MS and GC–MS/MS, and the recoveries of the pesticide residues were assessed. The other four APIStrips were stored in the dark (covered by aluminium foil) at room temperature and their extraction and analysis was performed after different amounts of time: after 1 day, 7 days, 21 days and 35 days.

The recovery of all compounds in the 'day 0' APIStrip was found to be in the range of 83–112% for all the compounds analyzed. The recoveries corresponding to the other samples were standardized so that 100% represents the concentration found in the 'day 0' APIStrip (considered as the initial recovery). A deviation of ±20% regarding the initial recovery was not considered relevant. Out of the 196 pesticides, 187 showed stable recovery values over the 5-week period of this study. Only 8 of them (4% of the compounds) showed a certain degradation: dodemorph, fenpropidin, fenpropimorph, fenthion, hexaconazole, metalaxyl, phorate and terbufos (Table 4). These results support the possibility of storing and shipping the APIStrips at room temperature.

3.6. Field studies in Denmark

APIStrips were sent to Denmark to perform an environmental monitoring of pesticide use in different areas of the country. Four apiculturists took part in the study, each one providing three colonies of their apiaries. Ten biweekly sampling rounds took place between April and September 2019, resulting in a total of 120 APIStrips. These APIStrips were extracted and analyzed in the laboratory by multiresidue methods based on LC-MS/MS and GC–MS/MS (Table 5 and Fig. 6).

Table 3
Individual and average concentrations (in μg/kg) of the pesticides detected in APIStrips and beehive samples in close contact with them.

	Acrinathrin	Azoxystrobin	Chlorpyrifos	Coumaphos	Cypermethrin	Fluvalinate-tau	Prothiofos	Chlorfenvinphos	Phosmet	Amitraz (DMF + DMPF)
Beehive sample A	1.0	5.3	0.5	16		38		1.1	4.0	46
Beehive sample B	1.4		0.5	29		14		6.8		198
Beehive sample C	1.7	1.3	0.7	63		13		6.9		68
Beehive sample D	18	2.5	0.8	75	4.2	18	0.9	13		12
Average conc. (μg/kg)	5.4	3.0	0.6	46	4.2	21	0.9	7.0	4.0	81
RSD (%)	*150*	*68*	*24*	*60*		*56*		*71*		*100*
APIStrip A	3.1	3.6	0.6	22		33		1.3	17	66
APIStrip B	1.9	4.1	0.6	30		17		1.6	10	187
APIStrip C	4.0	2.6	0.5	38		18		1.9		33
APIStrip D	8.0	3.2	0.5	42		21		3.2		54
Average conc. (μg/kg)	4.2	3.4	0.5	33	ND	22	ND	2.0	14	85
RSD (%)	*63*	*19*	*10*	*26*		*33*		*40*	*40*	*82*

ND: not detected.

Table 4
Recovery of the pesticides that show a certain degradation after different time periods on the APIStrip surface.

	Day 0	Day 1	Day 7	Day 21	Day 35
Dodemorph	100	81	68	52	43
Fenpropidin	100	83	77	53	40
Fenpropimorph	100	82	88	72	57
Fenthion	100	110	93	83	65
Hexaconazole	100	94	88	78	69
Metalaxyl	100	76	62	67	55
Phorate	100	118	74	69	53
Terbufos	100	94	72	70	53

Forty different pesticide residues were detected in the samples, out of which 32 showed a concentration above the instrumental LOQ (set as 0.5 μg/kg for all compounds). Thymol, a natural derivative of cymene allowed in organic apiculture, was the only veterinary treatment employed against *Varroa destructor* by three out of the four apiculturists taking part in the study. This compound was applied at the end of August and it was detected at very high concentrations (above 1000 μg/kg) in the APIStrips collected after this sampling period. Thymol was also detected at low concentrations in the APIStrips from samplings prior the application of the veterinary treatment: the use of recycled wax in the beehives may have caused its detection in trace levels. DMF (amitraz metabolite) was also detected in one APIStrip sample at a concentration of 1.5 μg/kg. This finding can be due to different phenomena such as honeybees from other colonies that entered the beehive in a punctual occasion, or the use of recycled beeswax containing trace levels of this compound. The remaining chemical residues can be attributed in all cases to phytosanitary products: insecticides (40%), fungicides (40%) and herbicides (2%).

On average, 3 different residues were detected on each APIStrip sample. The average concentration was 28.4 μg/kg, although, if the contribution of thymol is not considered, the average concentration of pesticides per APIStrip drops to 2.7 μg/kg. The number of blank APIStrips (with no pesticide residues detected) is 5, corresponding to 4% of the samples, demonstrating 96% of the APIStrips did bind pesticide residues and showing an almost continuous exposure of the colony to contaminants.

3.6.1. Honey analyses

During the last sampling round, two of the apiculturists collected honey from their colonies and sent them to the laboratory, resulting in six honey samples. The results of their analysis by LC-MS/MS and GC–MS/MS are shown in Table 6. As can be observed, only three chemical residues were detected: boscalid, prosulfocarb and thymol. The latter was found at a very high concentration in all cases, as the veterinary treatment had just been applied in the six colonies. The migration of thymol to honey samples had been previously reported (Stefan Bogdanov and Kilchenmann, 1998). Boscalid was detected at trace levels (below the instrumental LOQ of 0.5 μg per kg of honey) in three colonies, and prosulfocarb was detected once at a concentration of 1.6 μg/kg. These two compounds had also been detected in the APIStrips from the corresponding colonies. These findings imply that, even when all the matrices in the beehive are connected, chemical residues had high difficulties to migrate to the honey as a consequence of the

Table 5
Pesticide residues detected in the 120 APIStrips used for sampling in Denmark. The LOQ has been stablished as 0.5 ng per g of Tenax.

Name	Activity	Detections (total)	Detections above LOQ	Average concentration (μg/kg)
Thymol	Acaricide (veterinary)	63	55	829
Boscalid	Fungicide	31	14	2.7
Azoxystrobin	Fungicide	26	12	8.1
Chlorpyrifos	Insecticide	18	6	1.1
Thiacloprid	Insecticide	15	7	0.9
Tebuconazole	Fungicide	13	5	1.3
Fluopyram	Fungicide	13	3	1.1
Diazinon	Insecticide	13	0	–
Epoxiconazole	Fungicide	11	2	0.7
Pyraclostrobin	Fungicide	10	6	2.5
Fludioxonil	Fungicide	7	5	0.7
Chlorpropham	Herbicide	7	1	0.7
Bifenthrin	Acaricide/insecticide	6	6	3.3
Phoxim	Acaricide/insecticide	6	5	1.7
Propamocarb	Fungicide	6	5	14
Fipronil	Insecticide	6	2	1.1
Dimethoate	Acaricide/insecticide	5	1	0.8
Metaflumizone	Insecticide	4	2	1.9
Tolylfluanid	Fungicide	3	3	6.9
Difenoconazole	Fungicide	3	2	0.9
Malathion	Acaricide/insecticide	3	2	18
Prosulfocarb	Herbicide	3	2	0.8
Terbutryn	Herbicide	3	2	0.8
Chlorfenvinphos	Insecticide	3	0	–
Pirimicarb	Insecticide	3	0	–
Dichlofluanid	Fungicide	2	2	2.6
Pendimethalin	Herbicide	2	2	0.7
Triallate	Herbicide	2	2	0.9
Omethoate	Acaricide/insecticide	2	1	0.9
Acetamiprid	Insecticide	2	0	–
Chlorothalonil	Fungicide	1	1	0.9
Diclobutrazol	Fungicide	1	1	0.6
DMF	Acaricide (veterinary)	1	1	1.5
Lindane	Insecticide	1	1	1.2
Metrafenone	Fungicide	1	1	0.9
Propiconazole	Fungicide	1	1	–
Demeton-S-methylsulfone	Insecticide	1	0	–
Fenuron	Herbicide	1	0	–
Penthiopyrad	Fungicide	1	0	–
Pirimiphos-methyl	Insecticide	1	0	–

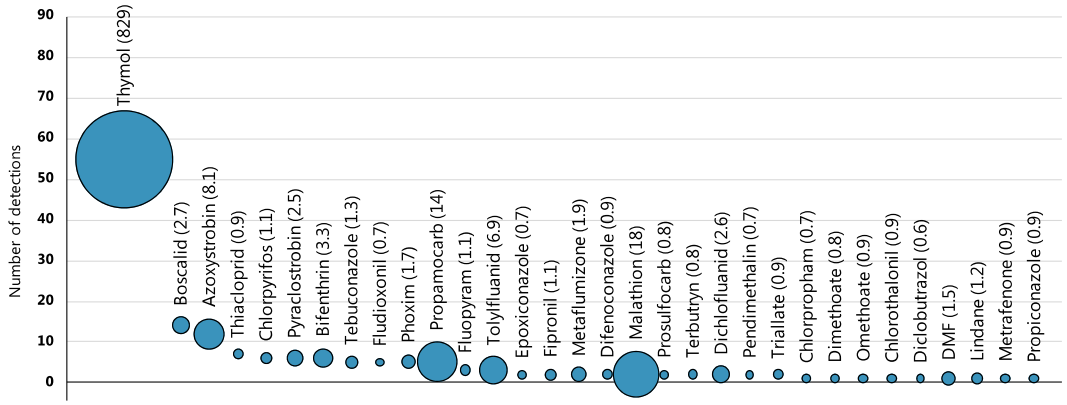


Fig. 6. Pesticide residues detected above the instrumental LOQ in the 120 APIStrips used for sampling in Denmark during all sampling period. The size of the bubbles is proportional to the average concentration of each pesticide (included between round parentheses).

different physicochemical properties. Therefore, the analysis of APIStrips provides more valuable information regarding the presence of contaminants inside the beehive than the analysis of honey samples.

4. Conclusions

The APIStrip has proven to be a very powerful and reliable tool for the evaluation of the contaminants present inside beehives. Their stability and ease of handling facilitates the development of monitoring studies on contamination processes in the environment while, at the same time, evaluating the contaminant pressure within the honeybee colonies. These passive samplers can adsorb contaminants that enter the beehive through different sources, including veterinary treatments applied by the beekeepers and also those transported by the bees themsleves. Bi-weekly sampling periods, a size of 5 × 10 cm and 1 g of Tenax per APIStrip have been the selected as the parameters for the use of these samplers in monitoring studies. A total of 40 pesticides have been detected, identified and quantified over a six-month period in 120 APIStrips used in field studies in Denmark, the most frequently detected residues being thymol –veterinary treatment-, boscalid and azoxystrobin –fungicides-. In general, the amounts of the compounds detected were around 1 μg/kg and their migration to the honey was negligible.

CRediT authorship contribution statement

María Murcia-Morales: Methodology, Validation, Investigation, Writing - original draft. **Jozef J.M. Van der Steen:** Project administration, Funding acquisition, Visualization. **Flemming Vejsnæs:** Methodology, Resources. **Francisco José Díaz-Galiano:** Methodology, Validation, Investigation. **José Manuel Flores:** Methodology, Resources. **Amadeo R. Fernández-Alba:** Conceptualization, Supervision, Investigation, Visualization.

Table 6
Results (in μg per kg of Tenax) of the six honey samples analyzed.

	Boscalid	Prosulfocarb	Thymol
Colony 1			>1000
Colony 2	<LOQ		>1000
Colony 3			>1000
Colony 4	<LOQ		>1000
Colony 5			>1000
Colony 6	<LOQ	1.6	>1000

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was part of the EC/DG SANTE project: Pilot project on environmental monitoring of pesticide use through honeybees" No SANTE/2018/E4/SI2.788418-SI2.788452, acronym: INSIGNIA.

References

Alfeeli, B., Hogg, D., Agah, M., 2010a. Solid-phase microextraction using silica fibers coated with tenax-TA films. Procedia Engineering 5, 1152–1155.
Alfeeli, B., Taylor, L.T., Agah, M., 2010b. Evaluation of Tenax TA thin films as adsorbent material for micro preconcentration applications. Microchem. J. 95, 259–267.
Chauzat, M.P., Martel, A.C., Cougoule, N., Porta, P., Lachaize, J., Zeggane, S., Aubert, M., Carpentier, P., Faucon, J.P., 2011. An assessment of honeybee colony matrices, Apis mellifera (Hymenoptera: Apidae) to monitor pesticide presence in continental France. Environ. Toxicol. Chem. 30, 103–111.
Clarke, D., Robert, D., 2018. Predictive modelling of honey bee foraging activity using local weather conditions. Apidologie 49, 386–396.
Cornelissen, G., van Noort, P.C.M., Govers, H.A.J., 1997. Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax® and effects of contact time and solute hydrophobicity. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1351–1357.
DeGrandi-Hoffman, G., Hagler, J., 2000. The flow of incoming nectar through a honey bee (Apis mellifera L.) colony as revealed by a protein marker. Insect. Soc. 47, 302–306.
Dettmer, K., Engewald, W., 2002. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. Anal. Bioanal. Chem. 373, 490–500.
Hakme, E., Lozano, A., Ucles, S., Fernandez-Alba, A.R., 2018. Further improvements in pesticide residue analysis in food by applying gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry (GC-QqQ-MS/MS) technologies. Anal. Bioanal. Chem. 410, 5491–5506.
Heitmann, K., Wichmann, H., Bahadir, M., Gunschera, J., Schulz, N., Salthammer, T., 2011. Chemical composition of burnt smell caused by accidental fires: environmental contaminants. Chemosphere 82, 237–243.
Kalina, J., Scheringer, M., Boruvkova, J., Kukucka, P., Pribylova, P., Bohlin-Nizzetto, P., Klanova, J., 2017. Passive air samplers as a tool for assessing long-term trends in atmospheric concentrations of semivolatile organic compounds. Environ Sci Technol 51, 7047–7054.
Kammoun, S., Mulhauser, B., Aebi, A., Mitchell, E.A.D., Glauser, G., 2019. Ultra-trace level determination of neonicotinoids in honey as a tool for assessing environmental contamination. Environ. Pollut. 247, 964–972.
Krupke, C.H., Hunt, G.J., Eitzer, B.D., Andino, G., Given, K., 2012. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. PLoS One 7, e29268.
Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Larhantec, M., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. Environ. Pollut. 170, 254–259.
Lozano, A., Hernando, M.D., Ucles, S., Hakme, E., Fernandez-Alba, A.R., 2019. Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. Food Chem. 274, 61–70.

Lydy, M.J., Harwood, A.D., Nutile, S.A., Landrum, P.F., 2015. Tenax extraction of sediments to estimate desorption and bioavailability of hydrophobic contaminants: a literature review. Integr. Environ. Assess. Manag. 11, 208–220.
Maier, I., Fieber, M., 1988. Retention characteristics of volatile compounds on tenax TA. J. High Resolut. Chromatogr. 11, 566–576.
Paalhaar, J.C., Boot, J.N.M., Steen, W.J., van der, J.J.M., 2007. In-hive Pollen Transfer between Bees Enhances Cross-pollination of Plants, 9th International Pollination Symposium on Plant-Pollinator Relationships-diversity in actionWageningen, The Netherlands. pp. 53–58.
Patil, S.F., Lonkar, S.T., 1994. Determination of benzene, aniline and nitrobenzene in workplace air: a comparison of active and passive sampling. J. Chromatogr. A 688, 189–199.
Porrini, C., Sabatini, A.G., Girotti, S., Ghini, S., Medrzycki, P., Grillenzoni, F., Bortolotti, L., Gattavecchia, E., Celli, G., 2003. Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination. Apiacta 38, 63–70.
Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., Touffet-Briens, F., 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie 36, 71–83.
Sormunen, A.J., Tuikka, A.I., Akkanen, J., Leppanen, M.T., Kukkonen, J.V., 2010. Predicting the bioavailability of sediment-associated spiked compounds by using the polyoxymethylene passive sampling and tenax extraction methods in sediments from three river basins in Europe. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 59, 80–90.
van der Steen, J.J.M., Cornelissen, B., Donders, J., Blacquière, T., van Dooremalen, C., 2015. How honey bees of successive age classes are distributed over a one storey, ten frames hive. J. Apic. Res. 51, 174–178.
Steen, J.J.M.V.d., Bergsma-Vlami, M., Wenneker, M., 2017. The perfect match: simultaneous strawberry pollination and bio-sampling of the plant pathogenic bacterium Erwinia pyrifoliae by honey bees Apis mellifera. Sustainable Agriculture Research 7.
Stefan Bogdanov, A.I., Kilchenmann, Verena, 1998. Residues in wax and honey after Apilife VAR® treatment. Apidologie 29, 513–524.
Ucles, S., Lozano, A., Sosa, A., Parrilla Vazquez, P., Valverde, A., Fernandez-Alba, A.R., 2017. Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. Talanta 174, 72–81.
You, J., Harwood, A.D., Li, H., Lydy, M.J., 2011. Chemical techniques for assessing bioavailability of sediment-associated contaminants: SPME versus Tenax extraction. J. Environ. Monit. 13, 792–800.

CAPÍTULO 4

DINAMARCA

CAPÍTULO 4. APLICACIÓN DE LA APISTRIP PARA UNA MONITORIZACIÓN AMBIENTAL EN DINAMARCA

Evaluación de la utilidad de las APIStrips en una monitorización a gran escala

Tras la optimización de las APIStrips, se prepararon y enviaron en torno a 2000 de estos muestreados a científicos ciudadanos (apicultores) coordinados por miembros del consorcio del proyecto INSIGNIA en un total de nueve países europeos: Austria, Bélgica, Dinamarca, Francia, Grecia, Irlanda Italia, Letonia y Reino Unido. En cada país se dispusieron nueve apiarios, con dos colmenas en cada uno de ellos, en las cuales se realizaron 10 muestreos con una frecuencia quincenal.

Los resultados obtenidos en las 180 APIStrips enviadas a Dinamarca (cuyos muestreos fueron dirigidos por el coordinador nacional danés, Flemming Vejsnæs) fueron empleados para ilustrar su utilidad en el muestreo pasivo de contaminantes. En estos muestreadores se detectaron 75 residuos diferentes, siendo el boscalid y el azoxystrobin los más frecuentemente detectados. La localización geográfica de los apiarios demostró ser determinante en cuanto al número de detecciones y a la diversidad de los residuos detectados, lo cual determina los potenciales efectos tóxicos en las colmenas. En este estudio se desarrolló asimismo un modelo de estimación de la toxicidad potencial que tiene en cuenta tanto la concentración como la LD_{50} de los contaminantes detectados, encontrándose grandes diferencias entre los diferentes apiarios. Además de la localización de las colmenas, la fecha en que se realizaron los sucesivos muestreos también influyó en las detecciones de plaguicidas: en los meses de primavera se identificaron más sustancias, coincidiendo con un mayor número de abejas adultas en las colmenas, la mayor intensidad de las aplicaciones de plaguicidas en los campos agrícolas y una temperatura óptima para el pecoreo. Sin embargo, si se consideran los plaguicidas individuales, cada compuesto mostró unas tendencias de detección diferentes a lo largo de los meses de muestreo.

Los resultados hallados en APIStrips fueron comparados con muestras de cera y miel de las mismas colmenas. Cuatro de los 19 plaguicidas detectados en cera no se identificaron en APIStrips: en todos los casos, estos compuestos se hallaron en cera a niveles muy bajos que indican que su origen podría no ser medioambiental, sino residual de la cera reciclada. En cuanto a la miel, su escasa disponibilidad impidió realizar los muestreos activos con la misma frecuencia que los basados en APIStrips; en esta matriz, además, sólo se identificaron un tercio de los residuos que habían sido detectados en las APIStrips correspondientes.

La información obtenida en los análisis del proyecto INSIGNIA valió al consorcio un nuevo contrato con la Comisión Europea para ampliar las monitorizaciones ambientales a los 27 países de la Unión Europea: el proyecto INSIGNIA-EU, que terminará en 2024 tras el análisis de en torno a 10 000 APIStrips.

Publicación 3

Environmental monitoring study of pesticide contamination in Denmark through honey bee colonies using APIStrip-based sampling

María Murcia-Morales, Francisco José Díaz-Galiano, Flemming Vejsnæs, Ole Kilpinen, Jozef J.M. Van der Steen, Amadeo R. Fernández-Alba

Environmental Pollution 290 (2021)

DOI: 10.1016/j.envpol.2021.117888

Environmental Pollution 290 (2021) 117888

Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Environmental monitoring study of pesticide contamination in Denmark through honey bee colonies using APIStrip-based sampling☆

María Murcia-Morales [a], Francisco José Díaz-Galiano [a], Flemming Vejsnæs [b], Ole Kilpinen [b], Jozef J.M. Van der Steen [c], Amadeo R. Fernández-Alba [a,*]

[a] Chemistry and Physics Department, University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), 04120, Almería, Spain
[b] Danish Beekeepers Association, Fulbyvej 15, 4180, Sorø, Denmark
[c] Alveus AB Consultancy, Kerkstraat 96, 5061 EL Oisterwijk, The Netherlands

ARTICLE INFO

Keywords:
Pesticides
APIStrip
Honey bees
Environment
Denmark
Monitoring

ABSTRACT

Due to their extensive use in both agricultural and non-agricultural applications, pesticides are a major source of environmental contamination. Honey bee colonies are proven sentinels of these and other contaminants, as they come into contact with them during their foraging activities. However, active sampling strategies involve a negative impact on these organisms and, in most cases, the need of analyzing multiple heterogeneous matrices. Conversely, the APIStrip-based passive sampling is innocuous for the bees and allows for long-term monitorings using the same colony. The versatility of the sorbent Tenax, included in the APIStrip composition, ensures that comprehensive information regarding the contaminants inside the beehive will be obtained in one single matrix. In the present study, 180 APIStrips were placed in nine apiaries distributed in Denmark throughout a six-month sampling period (10 subsequent samplings, April to September 2020). Seventy-five pesticide residues were detected (out of a 428-pesticide scope), boscalid and azoxystrobin being the most frequently detected compounds. There were significant variations in the findings of the sampling sites in terms of number of detections, pesticide diversity and average concentration. A relative indicator of the potential risk of pesticide exposure for the honey bees was calculated for each sampling site. The evolution of pesticide detections over the sampling periods, as well as the individual tendencies of selected pesticides, is herein described. The findings of this large-scale monitoring were compared to the ones obtained in a previous Danish, APIStrip-based pilot monitoring program in 2019. Samples of honey and wax were also analyzed and compared to the APIStrip findings.

1. Introduction

The use of pesticides has acknowledged benefits in conventional agricultural production and plays an important role in the improvement of the quality and productivity, as well as in the reduction of the crop losses (Aktar et al., 2009). However, the presence of pesticides in the environment may lead to major hazards to human and animal health and impact the ecosystems and, thus, strict controls must be imposed by governments and international authorities to ensure a sustainable, safe use. The Danish Government takes an active part in the control of the manufacture, commercialization and use of pesticides, which is reflected in the substantial decrease in the sales and application of plant protection products in the last years. Between 2011 and 2019, the sales of pesticide products decreased a 52% in Denmark, whereas their application decreased a 22% in the same period (Miljøstyrelsen, 2019). Moreover, in 2017, the Ministry of Environment and Food of Denmark published a detailed four-year action plan aimed at reducing the pesticides load and ensuring a sustainable use of these substances (Danish National Action Pl, 2017). However, the use of pesticides is still a reality and a monitoring of water samples performed in 2019 revealed the presence of more than 30 different pesticides and veterinary products in various locations in Denmark (Casado et al., 2019). Previous studies had already reported the presence of pesticides and contaminants in environmental samples from the country (Asman et al., 2005).

An alternative approach to the assessment of the environmental pollution involves the indirect sampling through honey bee colonies.

☆ This paper has been recommended for acceptance by Da Chen.

* Corresponding author. University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3) Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Ctra. Sacramento S/Nº, La Cañada de San Urbano, 04120, Almería, Spain.
E-mail address: amadeo@ual.es (A.R. Fernández-Alba).

https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117888
Received 25 May 2021; Received in revised form 16 July 2021; Accepted 30 July 2021
Available online 9 August 2021
0269-7491/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

These pollinators come into close contact with a wide range of contaminants during their foraging activities and, consequently, these compounds enter the beehives and can circulate and accumulate in apicultural matrices (Rortais et al., 2005; Lozano et al., 2019). This approach has been successfully applied to monitor the presence in the environment of pesticides (Lozano et al., 2019; Kammoun et al., 2019; Murcia Morales et al., 2020a,b), PAHs (Cochard et al., 2021), lead (Lambert et al., 2012) and other metals (van der Steen et al., 2012) or microplastics (Edo et al., 2021), among others. Despite the usefulness of honey bee colonies as sentinels for the presence of contaminants in the environment, this approach typically involves the active sampling of apicultural matrices such as wax, honey, beebread or even honey bees. This results in a) the existence of multiple matrices with different physicochemical properties and, therefore, an irregular distribution of contaminants accumulated (Lozano et al., 2019); b) a limitation in the number of subsequent sampling that can be performed on a single beehive, determined by their availability; c) ethical concerns related to the use of living organisms or their resources for research. All these issues are avoided in the APIStrip-based sampling, a methodology recently developed by our research group as a part of the INSIGNIA project (SANTE/2018/E4/SI2.788418-SI2.788452) (Murcia Morales et al., 2020a,b). The APIStrips are passive samplers based on the sorbent Tenax TA, whose versatility allows for the detection of a wide range of substances. Tenax has been typically employed for the sorption of contaminants in air or sediment samples (Patil and Lonkar, 1994; Lydy et al., 2015), and its solubility in chlorinated solvents such as dichloromethane increases its possible applications (Alfeeli et al., 2010). In this context, APIStrips (Adsorb-Pesticide-Inhive Strip) consist of a thin polystyrene layer covered with a uniform Tenax film that are easily placed inside beehives and that bind contaminants circulating within the colony (transported by the bees). These samplers have shown to provide comprehensive information of the contaminants inside beehives –i.e. the environmental contamination-in one single, representative matrix (Murcia Morales et al., 2020a,b). They have been successfully applied in a pilot monitoring study of pesticides in Denmark and other European countries (in the INSIGNIA framework) and also to the determination of dissipation and cross-contamination of miticides in apiculture (Murcia-Morales et al., 2021). The sampling methodology is quick and easy, and avoids the need of taking apicultural samples, thus minimizing the human impact on the colonies and making it possible to perform multiple subsequent samplings to a single beehive.

The present work is aimed at applying APIStrip-based sampling in a large-scale monitoring study in Denmark, to assess the use of pesticides and their presence in the environment. Ten-biweekly sampling rounds took place between April and September 2020 in 18 beehives (nine selected sampling sites, with two honey bee colonies per apiary). To the best of our knowledge, this is the first large-scale study aimed at monitoring the presence of pesticides in the environment through honey bees in Denmark.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

All high-purity pesticide standards were obtained from LGC (Teddington, United Kingdom), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) or Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and were stored at −30 °C. Individual pesticide stock solutions (1000–2000 mg/L) were prepared in acetonitrile and stored in amber screw-capped glass vials in the dark at −20 °C. Individual standard solutions, used for optimization, along with standard-mix solutions, used for calibration, were prepared from the stock standards.

Optima LC-MS grade water was obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). LC-MS grade methanol and ethyl acetate for pesticide residue analysis were purchased from Fluka Analytical (Steinheim, Germany). Ultra-gradient HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Location and management of the apiaries

Nine test apiaries were located in representative areas of Denmark regarding types of landscape and agricultural use (Fig. 1) (Levin, 2019). Denmark is a farming country with more than 60% of the landscape used for farming: the soil in the east is regarded as very rich for farming and in the western part it is sandier and, therefore, plant production is more frequent in the eastern part whereas cattle and milk production is more common in the western part (Levin, 2019). Pig farming is dominant over the country. In the southern part of the islands seed production, especially white clover, is dominant as well as fruit production.

Styrofoam boxes where employed in the colonies, with wax from either closed wax clubs or green wax pools (where there is general agreement on not using pesticides of any type in the colonies). Only organic apicultural practices approved for organic beekeeping were used: for varroa treatment, oxalic acid and formic acid were the only treatments applied. Additionally, thymol (also allowed in organic apiculture) was employed by one of the apiculturists. All of these substances have been found to be a natural part of honey. All colonies where wintered on one box with ten frames. During the season, the colonies where run as classical beekeeping for honey production and swarm prevention; no swarming was reported. All colonies had hybrid bees of the type Buckfast.

All wax within the colonies brood box is replaced at least every second year. The colonies were fed with 18–22 kg of sugar for wintering, and feed was removed in the spring just before the nectar flow started. The season 2020 ended out as a medium to good beekeeping season.

All the Citizen Scientists (CS) were handpicked and regarded as rigorous and skilled beekeepers (Gratzer and Brodschneider, 2021). All of them had previously taken part in a former pollen and propolis project, so they were well educated in collecting samples. Prior meetings, online meetings and personal visits by a study coordinator ensured the compliance with the sampling protocols.

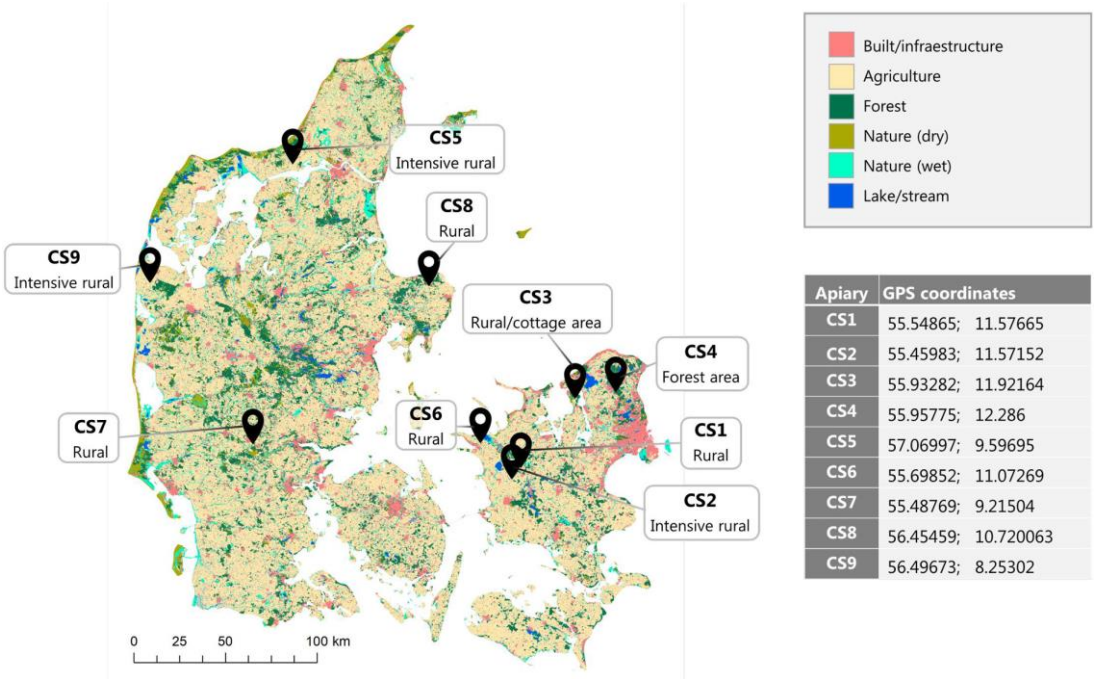
2.3. APIStrip preparation and sampling

The preparation of the APIStrip sampling devices is fully described in a previous study (Murcia Morales et al., 2020a,b). Both sides of a thin polystyrene plastic layer (5 × 10 × 0.2 cm) were covered with 6 mL of a Tenax solution in dichloromethane at high concentration (125 mg/mL). After the evaporation of the solvent under a gentle nitrogen current, the upper section of the strip is drilled to form a small hole. The resulting APIStrip contains 0.75 g of Tenax (0.375 g per side) in a uniform film covering the sampler surface. A thread or wire is then introduced inside the hole to facilitate the introduction of the APIStrips inside the beehive, where they remain for fourteen days (sampling period).

Ten consecutive bi-weekly sampling rounds took place in 2019 and in 2020 in different apiaries in Denmark. The first APIStrips were placed in mid April (April 19th, both in 2019 and 2020) and the first sampling round took place in the beginning of May (May 3rd, 2020 and May 5th, 2019). On each subsequent sampling round, the previous APIStrip was removed from the colony and a new one was inserted for another two weeks. This way, the last sampling round took place in the beginning of September (Sep 6th, 2020 and Sep 8th, 2019).

2.4. Sampling of honey and wax

Two honey samplings took place during the 2020 season: the first one was during APIStrip sampling round 3 (when the rapeseed flow stopped), on May 31st, and the second one, at the end of the sampling season (APIStrip sampling rounds 6 to 9, depending on the availability of honey and before the last honey harvest). Only one of the two colonies from the beekeepers was involved in each honey sampling: colony 1 in the first sampling, colony 2 in the second one. Samples were taken from



Apiary	GPS coordinates
CS1	55.54865; 11.57665
CS2	55.45983; 11.57152
CS3	55.93282; 11.92164
CS4	55.95775; 12.286
CS5	57.06997; 9.59695
CS6	55.69852; 11.07269
CS7	55.48769; 9.21504
CS8	56.45459; 10.720063
CS9	56.49673; 8.25302

Fig. 1. Land use of Denmark and location of the nine sampling sites (CS1 to CS9), with their corresponding coordinates.

fresh honey frames, which the beekeeper could see filled with honey recently. Afterwards, the frames were scraped, so that the honey would flow into the sampling jar.

Additionally, at the end of the sampling season (September 2020), beekeepers cut at a minimum of 10 g of wax out of the frames, which had been in the colony for all the season.

2.5. APIStrip extraction procedure

The desorption procedure of the pesticides from the Tenax film in the APIStrip surface was performed as described in a previous study (Murcia Morales et al., 2020a,b): first, the APIStrips were cut in small pieces and placed inside 50-mL PTFE centrifuge tubes. Then, 10 mL of acetonitrile were added and the samples were automatically shaken at 1250 rpm (Geno/Grinder, 2010; SPEX) for 3.5 min and centrifuged at 4000 rpm (3113 g) for 5 min. This extraction procedure entails a 10-fold dilution (1 APIStrip per 10 mL acetonitrile), which was undone during the preparation of the injection vials.

Procedural internal standards were employed to control the extraction performance: dichlorvos-D6, malathion-D10, carbendazim-D3 and triphenyl phosphate (TPP). The recovery of dichlorvos-D6, malathion-D10 and carbendazim-D3 was checked by LC-MS/MS and the recovery of malathion-D10 and triphenyl phosphate was tested by GC-MS/MS.

For the preparation of the injection vials, 500 μL of the sample extracts were evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 50 μL acetonitrile and 200 μL ultrapure water (LC-MS/MS) or 50 μL ethyl acetate (GC-MS/MS). In both cases, the vial preparation entails a 10-fold concentration (the addition of water to the LC vials does not affect the quantitation). Injection internal standards (dimethoate-D6 for LC, lindane-D6 for GC) were employed to check the variations in the injection volume.

Calibration curves were prepared as follows: a blank APIStrip extract (500 μL) was evaporated and reconstituted with an organic solvent (50 μL ethyl acetate for GC-MS/MS, 50 μL acetonitrile for LC-MS/MS) containing a mixture of pesticides at 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 or 200 μg/L. For the LC vials, 200 μL of ultrapure water were added.

2.6. Honey and wax extraction procedure

The extraction of honey and wax samples was performed following the QuEChERS extraction method with a thermostatted automatic shake, as described in previous studies (Lozano et al., 2019). A 10 g portion of homogenized sample was weighed in a 50-mL PTFE centrifuge tube and 10 mL of acetonitrile were added. The samples were shaken in an automatic axial extractor (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain) for 4 min. Then, 4 g MgSO4, 1 g NaCl, 1 g trisodium citrate dihydrate and 0.5 g disodium hydrogencitrate sesquihydrate were added and the samples were shaken in the automatic axial extractor for 5 min using the holder temperature at 40 °C. The extracts were then centrifuged (4500 rpm, 3923 g) for 5 min. A 5 mL volume of the supernatant was transferred to a 15-mL PTFE centrifuge tube containing 750 mg of $MgSO_4$ and 125 mg of PSA. The samples were shaken in a vortex for 30 s and centrifuged again (3500 rpm, 2374 g) for 5 min. Finally, the extracts were transferred to amber vials and they were acidified with 10 μL of formic acid 5% per mL of extract. Procedural internal standards (dichlorvos-D6, malathion-D10, carbendazim-D3 and TPP) were used as surrogate standards to control the extraction performance.

During the preparation of the sample vials, different procedures were followed according to the analytical technique. For GC-MS/MS, 50 μL of the honey or wax extracts were evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 50 μL of ethyl acetate. For the LC-MS/MS injection vials, 100 μL of the extract were diluted with 400 μL of water. Dimethoate-D6 and lindane-D6 were used as injection internal standards in all vials for LC and GC, respectively. Matrix-matched calibration curves were preparing by evaporation of a blank honey or wax extract (50 μL for GC-MS/MS, 100 μL for LC-MS/MS) and reconstitution with the same volume of an organic solvent (ethyl acetate for GC-MS/MS, acetonitrile for LC-MS/MS) containing a mixture of pesticides at 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 or 200 μg/L. Finally, 400 μL of ultrapure water were added to the LC-MS/MS injection vials.

2.7. Optimization of compounds

For the optimization of the MS parameters, the 428 pesticide residues included in the study were monitored in full-scan mode in the 50–550 *m/z* range. The first step was the selection of the precursor/s ion/s for each analyte and the retention time, injecting individual solutions for each pesticide at 1 mg/kg in full-scan mode. The ion with the highest intensity and *m/z* relationship was selected as the precursor ion. Precursor ion fragmentation was performed by collision-induced dissociation with nitrogen, from which the best fragment ions were chosen. The most intense transition was selected as the quantifier transition (SRM1), while the second most intense was chosen as the qualifier transition (SRM2). The adequate CE for each transition was assayed in the 3–40 eV range. Retention times, transitions and CEs for each analyzed compound were detailed in a previous study (Ucles et al., 2017).

2.8. GC-QqQ-MS/MS analysis

The analyses by gas chromatography were performed in an Agilent Intuvo 9000 GC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an Agilent 7693 autosampler and an Agilent 7010 B GC-MS/MS triple quadrupole. Data acquisition and processing was developed by Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis software version 10.0. Samples were injected using a multimode injector inlet in splitless mode, through an Agilent ultra-inert inlet liner with glass wool frit. The injection volume was 1 μL. The injector temperature was kept at 80 °C during the solvent evaporation stage (0.1 min) and then ramped up to 300 °C at 600 °C/min for 5 min and up to 250 °C at 100 °C/min. Two planar columns (Agilent), HP-5MS UI 15 m long × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film thickness were used.

The oven temperature program was as follows: 60 °C for 0.5 min, up to 170 °C at 80 °C/min and finally up to 310 °C at 20 °C/min. The total run time was 12.4 min with 2.1 additional min for backflushing at 310 °C. The instrument worked at a constant flow (1.28 mL/min column 1, 1.48 mL/min column 2). The system worked in dynamic MRM, acquiring the transitions in a ±0.2 min window from the retention time of each analyte. Helium (99.999% purity) was used as the carrier and quenching gas, and nitrogen (99.999% purity) as the collision gas. The collision and quenching gas flows were 1.5 mL/min and 2.25 mL/min, respectively. Both the transfer line and the ion source -operated in electron ionization-were maintained at 280 °C. The quadrupole analyzer temperature was fixed at 150 °C. The solvent delay was 2.6 min.

2.9. LC-QqQ-MS/MS analysis

An Agilent UPLC 1290 Series coupled to an Agilent 6490 Triple Quad LC/MS was used for this study. Data acquisition and processing was developed by Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantitative Analysis software version 10.0, using dynamic MRM software features with a retention time window of 0.8 min. The injection volume was 5 μL, and the chromatographic separation was carried out with a Zorbax Eclipse Plus C8 column (Agilent), 2.1 mm × 100 mm × 1.8 μm. The system employed 0.1% formic acid in milliQ water (mobile phase A), and 0.1% formic acid and 5% water in acetonitrile (mobile phase B) with the following gradient: 20% of B for 2 min, a linear gradient up to 100% of B in 13 min and finally an isocratic mode at 100% of B for 2 min. Subsequently, an equilibration step coming back to 20% of B (2.5 min) was performed. The system was provided with a JetStream electrospray ion source, employing nitrogen as the nebulizer gas. This ion source was configured as follows: 120 °C for the drying gas temperature, 13 L/min for the drying gas flow rate, 45 psi for the nebulizer pressure, 375 °C for the sheath gas temperature and 10 L/min for the sheath gas flow rate. The MS used nitrogen as the collision gas (99.999% purity), 380 V for the fragmentor and 3000 V for the capillary voltage, both in positive and negative mode.

3. Results and discussion

3.1. Environmental monitoring 2020

3.1.1. General assessment

The monitoring performed in Denmark in 2020 involved the participation of nine apiculturists (Citizen Scientists, CS) distributed throughout the country. Each participant provided two colonies of the same apiary for the passive, APIStrip-based sampling. A total of ten bi-weekly sampling rounds took place (April to September), thus resulting in 180 APIStrips employed and analyzed. Table 1 summarizes the pesticide findings in these samples, sorted by frequency of detection. The average concentration of these pesticides is also shown (in ng/APIStrip), together with their legislative status by the European Commission (EC), in terms of approval for their use in agriculture in the member states. When available, the expiration date of the approval in the non-authorized pesticides was as well included.

Seventy-five different residues were identified in the APIStrips, with 548 total detections (average 3 pesticide residues detected per APIStrip, up to 19 different residues detected in a single APIStrip). Half of these pesticides (50.6%) had only sporadic detections, with just one or two detections throughout the sampling period. Boscalid and azoxystrobin were the most frequently detected compounds, present in 23–28% samples. In the last years, boscalid has been officially reported in a wide variety of crops produced in Denmark, including strawberries, kales, beans, cereal grains, carrots, pears or spinach among many others (O, Boscalid (221) - Eva; Pesticidrester, 2019). This active substance was among the ten best-selling pesticides in Denmark during 2019, with more than 43000 kg sold (Miljøstyrelsen, 2019), which explains the large number of detections in APIStrip samples. Similarly, azoxystrobin was as well detected in a large number of samples from the official monitoring for pesticides in food in 2019, including fruits, vegetables and cereals produced by the Danish agriculture (Pesticidrester, 2019). Also, a previous study reported the presence of azoxystrobin, boscalid, propiconazole, carbendazim, diuron or propyzamide, among others, in water samples from the Danish environment (Casado et al., 2019). For their part, carbendazim, demeton-S-methylsulfoxide, diazinon or omethoate have been considered to be among the 20 pesticides that contribute most to the Hazard Index for the cumulative dietary exposure to Danish adult population (Jensen et al., 2015); these pesticides were detected in up to 18 APIStrips at an average concentration lower than 1.5 ng/APIStrip.

The very high average concentration (more than 1000 ng/APIStrip) of thymol can be explained due to its use as a veterinary treatment for varroa infestations: apiculturist 2 employed thymol strips throughout the sampling period. Something similar happened with two benzalkonium chlorides (BAC8 and BAC10): these compounds, typically employed as preservatives and antimicrobial agents, are included in the formulation of daily products and hydroalcoholic solutions, and they were found at high concentrations in up to 11% of the APIStrips analyzed (*data not shown*). Their presence might be explained on the basis of contaminations of the APIStrip surface with the beekeepers' hands, after the topic application of hydroalcoholic solutions as a prevention for SARS-CoV-2 during the coronavirus pandemic. These findings were not included in the environmental assessment.

As can be observed in Table 1, the majority of pesticides detected in 2020 had a fungicidal or insecticidal activity (32 and 21 residues, respectively). Some of them, such as the frequently detected imidacloprid, demeton-S-methylsulfoxide or chlorpyrifos, possess a high toxicity to honey bees, with an oral LD_{50} lower than 1 μg/bee (regulatory and evaluat). These findings confirm the direct exposure of honey bees to harmful pesticide residues that affect the colony health, as previously described by other studies (Johnson et al., 2010; Sanchez-Bayo et al., 2016). Most of the residues with a high toxicity to honey bees were insecticides; however, some of the detected fungicides also possess a low oral LD_{50}, such as azoxystrobin (25 μg/bee), dithianon (25 μg/bee) or

Table 1
Pesticide residues detected in APIStrip samples during 2020.

Pesticide name	Main use	Nunber of detections									Average conc. (ng/APIStrip)[a]	Authorised by the EC (expiration approval) (European Commission ())
		Total	Sampling site (CS)									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Boscalid	Fungicide	50	14	6	2	5		3	3	9	8	1.1	Yes
Azoxystrobin	Fungicide	41		3	2			8	16	12		6.6	Yes
Tebuconazole	Fungicide	28		3		2		6	2	6	9	1.7	Yes
Imidacloprid	Insecticide	24	5	2	1	1	3			7	5	1.2	No (2020)
Propiconazole	Fungicide	23			1		4	6	2	10		0.9	No (2014)
Mandipropamid	Fungicide	19							7	12		3.0	Yes
Carbendazim	Fungicide, Metabolite	18								9	9	0.5	No (2014)
Fluopyram	Fungicide	18		8		2	4			1	3	1.1	Yes
Pyraclostrobin	Fungicide	16								4	12	1.6	Yes
Demeton-S-methylsulfoxide	Insecticide	13					7	6				1.1	No (2007)
Chlorpyrifos	Insecticide	12	3		3	3					3	14	No (2020)
DEET	Repellent	12	3		4	3		1			1	9.7	No[b]
Cymoxanil	Fungicide	11							6	5		0.9	Yes
Diazinon	Insecticide, Acaricide, Repellent	11	3		1	3			2	2		1.4	No (2007)
Permethrin	Insecticide	11			2	1	1	2		5		2.5	No (2000)
Prothioconazole-desthio	Metabolite	11					3	1	4	3		< LOQ	Yes
Thiacloprid	Insecticide	9					1	6	2			2.3	Yes
Deltamethrin	Insecticide	8					8					6.1	Yes
Chlorantraniliprole	Insecticide	7	1	1	2	3						1.1	Yes
Coumaphos	Acaricide	7								7		0.6	No[b]
Diuron	Herbicide	7						2	1	4		1.3	No (2018)
Fenuron	Herbicide	7						3	4			0.5	No
Metobromuron	Herbicide	7					2		5			1.4	Yes
Cypermethrin	Insecticide	6	2		1			1			2	179	Yes
Thymol	Acaricide, Fungicide	6		6								>1000	Yes
Ethiofencarb	Insecticide	5	2			3						22	No (2002)
Fipronil-sulfone	Metabolite	5	1	1		1				1	1	< LOQ	No[b]
HCB	Fungicide	5	2		3							1.9	No
Dithianon	Fungicide	4					2		2			2.8	Yes
Chlorpropham	Herbicide	3				3						0.5	No (2015)
Epoxiconazole	Fungicide	3								3		0.6	No (2020)
Indoxacarb	Insecticide	3					3					0.6	Yes
Metrafenone	Fungicide	3			1				1	1		0.5	Yes
Pymetrozine	Insecticide	3					1		1		1	3.4	No (2015)
Spirotetramat	Insecticide	3					1			2		0.8	Yes
Trichlorfon	Insecticide	3					3					0.6	No (2007)
Triflumuron	Insecticide	3			2					1		2.8	Yes
2,4′-DDE	Metabolite	2			2							< LOQ	No[b]
4,4′-DDD	Metabolite	2		1	1							< LOQ	No[b]
Chlorothalonil	Fungicide	2							1	1		< LOQ	No (2016)
Fenamidone	Fungicide	2			1					1		6.3	No (2018)
Fipronil	Insecticide	2					1				1	5.7	No (2017)
Fludioxonil	Fungicide	2	1			1						7.8	Yes
Fluxapyroxad	Fungicide	2			1					1		4.5	Yes
Omethoate	Insecticide, Acaricide	2								2		< LOQ	No
Oxasulfuron	Herbicide	2					2					0.5	No (2018)
Propamocarb	Fungicide	2							2			0.7	Yes
Prosulfocarb	Herbicide	2			1					1		0.8	Yes
Pyridalyl	Insecticide	2								2		1.9	Yes
Quinoxyfen	Fungicide	2					1		1			7.7	No (2014)
Tebufenozide	Insecticide	2					1	1				2.9	Yes
Teflubenzuron	Insecticide	2			1					1		0.6	No (2019)
Thiabendazole	Fungicide	2								1	1	1.8	Yes
4,4′-DDE	Metabolite	1			1							< LOQ	No[b]
4,4′-DDT	Insecticide	1									1	0.5	No (1972)
Acetamiprid	Insecticide	1							1			1.5	Yes
Alachlor	Herbicide	1								1		< LOQ	No (2006)
Ametoctradin	Fungicide	1									1	< LOQ	Yes
Chlorfenvinphos	Insecticide, Acaricide	1						1				1.2	No
Dichlofluanid	Fungicide	1	1									< LOQ	No (2002)
Difenoconazole	Fungicide	1				1						1.9	Yes
Flubendiamide	Insecticide	1			1							0.7	Yes
Flucythrinate	Insecticide, Acaricide	1	1									1.2	No (2002)
Fluquinconazole	Fungicide	1					1					< LOQ	Yes
Hexaconazole	Fungicide	1				1						< LOQ	No (2006)
Hexythiazox	Acaricide	1									1	< LOQ	Yes
Isopyrazam	Fungicide	1			1							0.5	Yes
Metolachlor	Herbicide	1	1									2.1	No (2002)

(*continued on next page*)

Table 1 (*continued*)

Pesticide name	Main use	Nunber of detections									Average conc. (ng/APIStrip)[a]	Authorised by the EC (expiration approval) (European Commission ())
		Total	Sampling site (CS)									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ofurace	Fungicide	1				1						3.3	No (2002)
Penthiopyrad	Fungicide	1			1							< LOQ	Yes
Propyzamide	Herbicide	1								1		< LOQ	Yes
Spiroxamine	Fungicide	1			1							3.2	Yes
Tetraconazole	Fungicide	1								1		< LOQ	Yes
Tricyclazole	Fungicide	1			1							0.6	No (2016)
Trifloxystrobin	Fungicide	1				1						1.2	Yes

[a] < LOQ represents that the pesticide was detected and identified at a concentration below the instrumental limit of quantification (0.5 ng/APIStrip).
[b] Never notified and authorised in the EU for its use in agriculture, as stated by the EC (European Commission ()).

chlorothalonil (40 μg/bee) (regulatory and evaluat). Pesticides with herbicide properties, such as diuron or fenuron, were also detected.

The average concentrations were in most cases lower than 5 ng/APIStrip, although these values are relative to the passive sampler and cannot yet be related to findings in other apicultural samples, nor to toxicity effects on the honey bee health. Nevertheless, they are comparable among them, and can be employed to assess which pesticides are present inside the beehives at a higher rate. For instance, it can be seen that cypermethrin showed the highest average concentration in its six detections in APIStrip samples (179 ng/APIStrip), followed by ethiofencarb and chlorpyrifos (22 and 13 ng/APIStrip, respectively).

Approximately half of the pesticides shown in Table 1 are currently approved by the EC for their use in agricultural crops. The detection of pesticides which are not currently approved is due, in most cases, to a) the persistence in the environment of some of these substances, b) a recent withdrawal for their approval, c) legal non-agricultural applications of these compounds (such as gardening or road shoulders), or d) and illegal agricultural use. DDT and its derivatives (DDE and DDD) constitute the most representative example of very persistent compounds that were banned long ago but that are still found: their half-life period has been estimated to last up to 6200 days (DT_{50} in soil) (regulatory and evaluat). Other pesticide residues exhibit a faster degradation in the environment but have been recently banned (such as imidacloprid, banned in 2020 and detected in 13% of samples). Examples of compounds with alternative uses include coumaphos -an acaricide typically employed in apiculture-, or fipronil -a veterinary treatment-, among others. Concretely, coumaphos was detected at low concentration levels in 7 APIStrips (4% samples), although it was not applied by the beekeepers that took part in the study. Its presence is probably due to the cross-contamination from surrounding apiaries or its migration from recycled beeswax, as reported in previous studies (Murcia-Morales et al., 2021).

3.1.2. Pesticide distribution over the sampling sites

A substantial variation in the findings of the nine sampling sites was detected (Fig. 2a and Table 1). Apiary 8, located in the northeast of the Central Denmark Region, was the place with the largest number of detections and pesticide diversity –i.e. 117 detections and 31 different pesticide residues. However, the average concentration of contaminants in this apiary was the smallest: 1.3 ng/APIStrip. By contrast, in apiary 9 (northwest of the Central Denmark Region), the average concentration of pesticides was 39.6 ng/APIStrips, partly due to the contribution of cypermethrin. APIStrips placed in apiary 3 showed also a high average concentration in the detections (15.6 ng/APIStrip), together with a significant pesticide diversity (25 different pesticide residues identified).

Out of the 428 pesticide residues included in the study, boscalid was found to be the one with the widest distribution, with detections in eight of the nine sampling sites. The only place where it was not detected was sampling site 5, located in the North Jutland Region. Imidacloprid and tebuconazole residues were as well present in a high number of sampling sites, with detections in seven and six sampling sites, respectively. Other

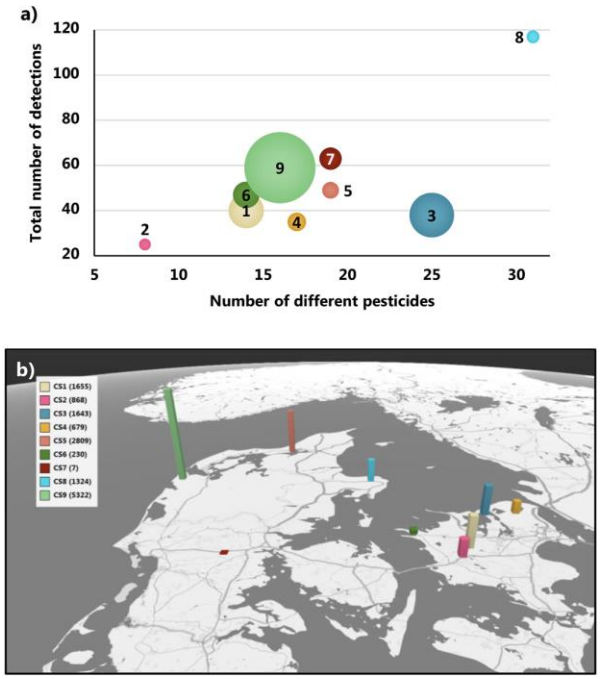


Fig. 2. a) Pesticide findings over the monitoring performed in 2020 in the nine sampling sites (CS1 to CS9, 20 APIStrips per sampling site); the size of the bubbles is proportional to the average concentration of the pesticides; b) APIStrip-Evaluated Toxicity for honey bees in each sampling site (the height of the bar illustrates the AET value).

seven pesticide residues were detected in more than half the sampling sites: DEET, azoxystrobin, permethrin, diazinon, propiconazole, fipronil-sulfone (metabolite of fipronil) and fluopyram, which were found in five sampling sites throughout the country. In some cases, a local application of a pesticide was seen, as in the case of chloranthraniliprole, which was identified in four sampling sites (1-2-3-4) located in a radius of approximately 25 km from each other. By contrast, 35 pesticide residues were detected uniquely in one sampling site.

Although the total pesticide load in the beehives is a useful indicator of the environmental contamination, it is not necessarily related to high toxicity levels for the honey bees themselves. Some pesticide residues possess a very low toxicity to honey bees, and their presence in beehives –even at high concentration levels– is unlikely to cause serious harm to the colony strength or health. However, even a small amount of an active substance with a high toxicity to honey bees (i.e. low LD_{50}) could severely affect the colony status. To assess the potential consequences of the findings in the APIStrips from each apiary, a combined risk indicator

parameter was calculated, the APIStrip-Evaluated Toxicity (AET), as the sum of the concentrations of each pesticide (in ng/APIStrip) divided by their corresponding oral LD_{50} (μg/bee) value:

$$AET = \frac{concentration_1}{LD_{50_1}} + \ldots + \frac{concentration_n}{LD_{50_n}}$$

A high AET value means, therefore, the presence of a highly toxic pesticide for honey bees and/or high concentration of pesticides in the beehive environment. This parameter was calculated for each one of the nine apiaries that took part in the samplings in 2020 (CS1 to CS9), as can be observed in Fig. 2b. CS9 was found to be the apiary with the highest AET (5322); this was, also, the apiary with the highest average concentration of pesticides, as shown in Fig. 2a. The main contributor to this large AET value was cypermethrin, an insecticide with oral LD_{50} of 0.17 μg/bee found at high concentrations in this apiary. However, whereas CS5 showed a low average concentration of pesticides, the AET in this apiary was found to be 2809 (the second highest). This is mainly due to the presence of deltamethrin, imidacloprid and fipronil, with LD_{50} values as low as 0.004 μg/bee. Although these pesticides were always detected at low concentration levels, their high toxicity resulted in an intense contribution to the AET. It is also remarkable that, despite the high number of different pesticide residues detected in CS7, any of them showed a significant toxicity to honey bees, which resulted in an extraordinarily low AET of 7.

The AET values should be considered as a relative worst-case scenario: due to the APIStrip capability to absorb pesticides and contaminants from a large number of bees, the actual exposure of an individual honey bee will probably be lower –i.e. not all bees will be directly exposed to all the pesticides captured by the APIStrips. However, the synergistic effects caused by the combination of different pesticides inside the beehive should also be considered, as demonstrated previously in other studies (Wade et al., 2019). As all of the colonies involved in the study showed a good strength and health state during the sampling period, it can be stated that the AET values presented here do not imply a direct risk to honey bee health.

3.1.3. *Pesticide distribution over the seasons*

Fig. 3 shows the distribution of the detections throughout the 10 sampling rounds, in terms of total detections (green, left bars) and diversity of the pesticide residues (orange, right bars). Each bar comprises the total findings in the 18 APIStrips (nine apiculturists with two beehives each) sampled per round. In terms of pesticide diversity, there was an average of 23 different residues detected in each sampling round, which represents a 14-day period. As can be observed, the number of

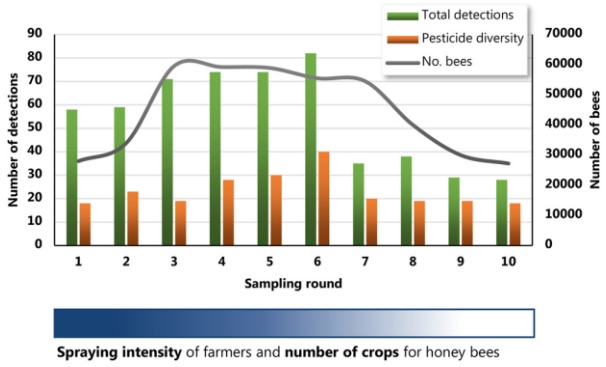


Fig. 3. Pesticide residue findings in 10 APIStrip-based sampling rounds over 2020 (April to September), and calculated number of bees in the colonies. Green bars (left) represent the total number of detections; orange bars (right) show the number of different pesticides identified. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

detections varied significantly between sampling rounds 1–6 (April 17th to July 10th) and 7–10 (July 24th to September 4th). In the first period, the average of detections in each sampling round was 70, whereas in the second, the average of findings dropped to 32. The diversity of pesticides exhibits a similar trend, with up to 40 different residues detected in sampling round 6 in contrast to the 20 or fewer different contaminants identified in sampling rounds 7 to 10. Fig. 6 also shows the average number of honey bees in 18 reference beehives, as estimated by the Danish coordinator and the citizen scientists. The number of bees (i.e. the colony strength) was calculated as the number of frames full of bees, assuming that a 810-cm^2 frame completely filled can contain up to 1000 honey bees (1.24 bees per cm^2), and standardizing the frame size of each individual colony. It can be observed that, in general terms, the maximum number of adult bees coincided with the highest pesticide detections. This supports the idea that honey bee activity is the main source of contamination in the beehives.

The large numbers of detections during sampling rounds 1 and 2, even with a reduced number of honey bees in the colonies, could be explained on the basis of their activity. It has been previously reported that the foraging activity of honey bees is closely related to climate, being the most intense during the spring months and at temperatures close to 20 °C (Danner et al., 2017; Joshi and Joshi, 2010). Moreover, during the spring months, the number of farming crops and the pesticide application is typically very high, so honey bees are expected to be more exposed to these contaminants in this season. Afterwards, during the summer (intermediate sampling rounds), both the number of honey bees and pesticide findings in APIStrips are maximum. Earlier studies have shown that the greatest foraging activity of bees in Denmark takes place during the first half of July, which also supports the high number of detections found in the APIStrips from sampling rounds 5 and 6 (Poulsen, 2015).

The significant decrease in the detections after sampling round 6 (mid July 2020) might be related to a) the drastic decline in the number of honey bees in the colonies or b) a reduction in the number of farming crops and, therefore, the pesticide application (as shown in Fig. 3). The number of flowering agricultural crops that are of importance for honey bees decreases gradually through the summer and, also, the spraying of plant protection products is less intense after that period. This might result in a significant decrease of the pesticide presence in the environment.

Fig. 4 illustrates three different tendencies that were identified in the pesticides with a high number of detections. Whereas most of them, such a azoxystrobin, tebuconazole or thiacloprid (Fig. 4a) were detected most frequently during the spring months (first sampling periods) and their incidence in the environment decreased over time, the opposite happened with others such as pyraclostrobin or imidacloprid (Fig. 4c). The higher detections of the latter pesticide in the apiaries might be, among other factors, related to the decrease in the number of living bees over the last sampling rounds. There were also pesticides whose maximum presence in the environment was detected during the summer months (intermediate sampling periods), as shown in Fig. 4b. These tendencies can also be explained on the basis on the agricultural crops growing near the apiaries: the periods when a pesticide residue is more frequently detected might correspond to the application of this active substance in agricultural lands.

3.2. *Monitoring 2019–2020*

Four of the apiculturists involved in the samplings that took place in 2020 had already participated in a preliminary monitoring the previous year, whose results were already presented (Murcia Morales et al., 2020a,b). As the experimental conditions and sampling periods were the same in both years, the findings can be assessed as a two-year monitoring of the environment in the island of Zealand (sampling sites 1, 2, 3 and 4). The number of different pesticides –i.e. the pesticide diversity– remained virtually constant, with 39 and 38 pesticide residues detected

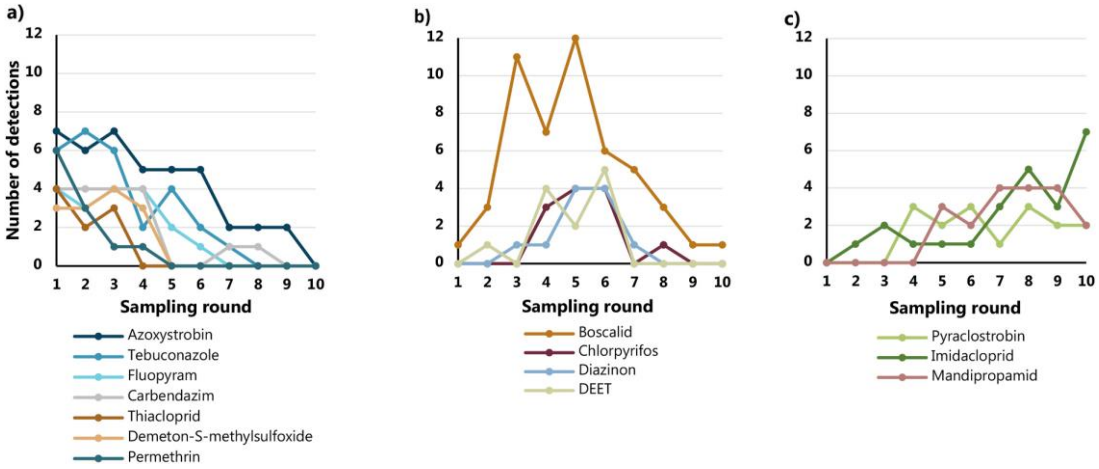


Fig. 4. Distribution over the seasons of selected pesticide residues detected over 2020. a) Pesticides with a high frequency of detection during the first sampling periods (spring); b) pesticides frequently detected on the intermediate sampling periods (beginning of summer); c) pesticides identified at a later stage of the samplings (end summer).

in 2019 and 2020, respectively. Fifteen pesticide residues (39% of the total detections) were identified in samples from both years, boscalid being always the most frequently detected residue. Fig. 5a depicts the 12 pesticide residues found in both 2019 and 2020 (sampling sites 1–4), in terms of the percentage of APIStrips where they were identified. It can be seen that, in general, the frequency of detection for these contaminants remained considerably constant throughout both years, the most notable exception being azoxystrobin. In this case, the compound was the second most frequent contaminant in 2019, but its incidence in APIStrips from 2020 was considerably lower. A reduction in its

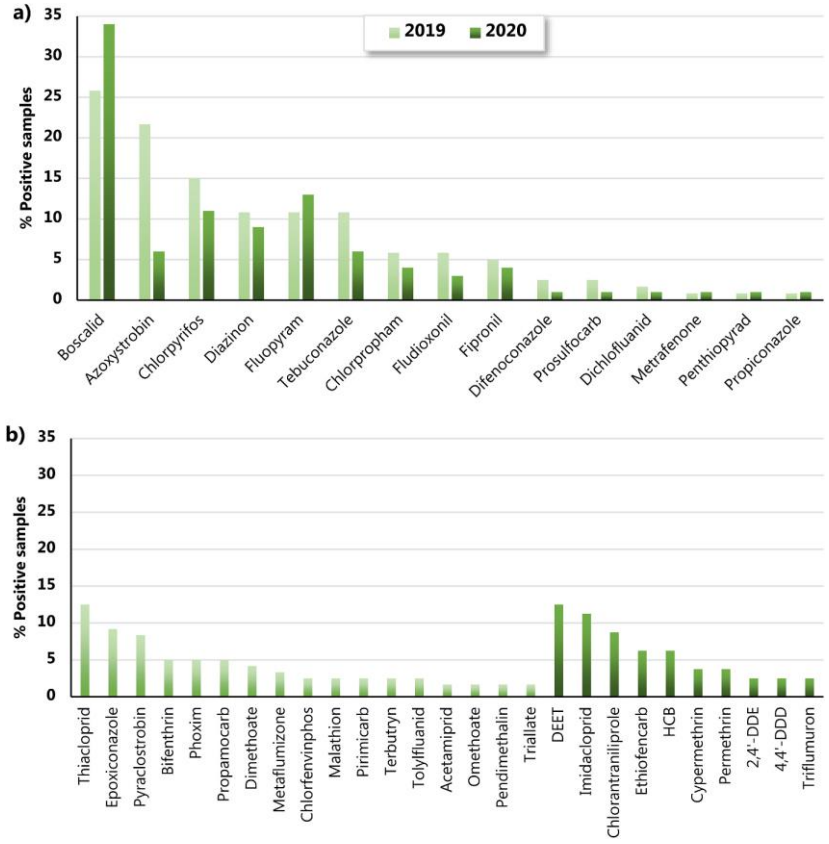


Fig. 5. Findings in the samplings performed in 2019 (pale green) and 2020 (dark green). a) Pesticides found throughout the two-year monitoring; b) pesticides detected only in one year. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

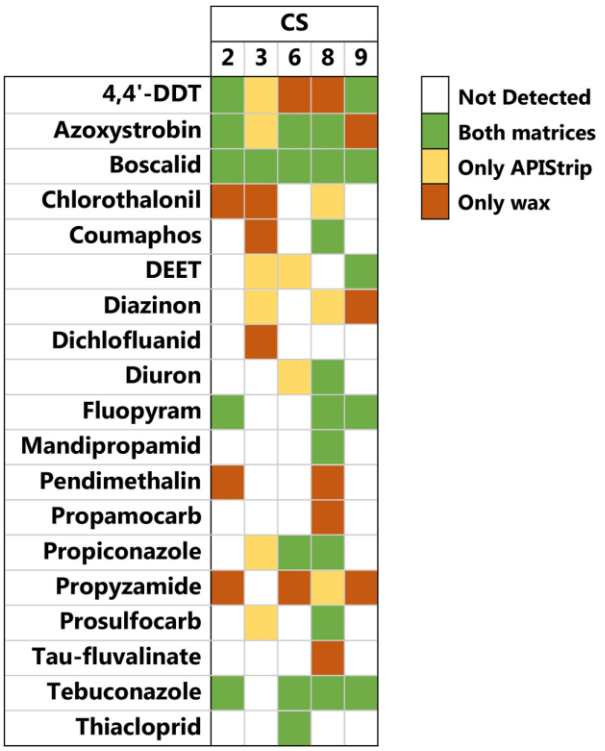


Fig. 6. Comparison between the pesticide residues detected in wax and APIStrip samples from CS2, CS3, CS6, CS8 and CS9.

agricultural application might have influenced this decrease: the sales of azoxystrobin in Denmark during 2018 (6140 kg) were significantly lower than in previous years (average 20043 kg sold annually in the period 2014–2017). This could be related to the weather conditions (the application of fungicides varies considerably depending on precipitation and temperature), or a tendency to substitute this fungicide (Miljøstyrelsen, 2019).

Conversely, Fig. 5b represents which pesticides were detected in only one of the sampling years (sampling sites 1–4). For simplicity reasons, the residues detected in only 1% of samples have not been included. It can be seen that none of the pesticides detected in only one year was present in more than 13% of samples, and the majority of them were detected in less than 5% of samples, which reveals a low incidence of these substances.

3.3. Wax and honey samples

Two wax samples (one per beehive) were taken from selected sites at the end of the sampling period in 2020: CS2, CS3, CS6, CS8 and CS9, resulting in 10 wax samples analyzed. Nineteen different pesticide residues were detected in these samples, with 40 total detections (Fig. 6). In the vast majority of cases, the concentrations levels ranged between 0.5 and 5 μg/kg, the exceptions being DEET and prosulfocarb (up to 36 μg/kg).

These results were qualitatively compared to the findings in APIStrip samples, as shown in Fig. 6: if a pesticide was detected in both the wax samples and the APIStrips from the same apiary, it appears in green colour. Conversely, brown colour depicts pesticides that were detected only in the wax samples (not in APIStrips), and yellow colour, a detection only in APIStrips. It can be seen that, in five compounds, there was a total equivalence in the detections: boscalid, fluopyram, mandipropamid, tebuconazole and thiacloprid, which were present in both matrices in all apiaries were they were found (only green colour). Others, such as DEET or propiconazole, were detected in APIStrips with a higher frequency than in wax (green and yellow colour). Conversely, out of the 19 pesticide residues detected in wax samples, four were not detected in APIStrip samples in these apiaries: dichlofluanid, pendimethalin, propamocarb and tau-fluvalinate. These compounds were detected in the wax samples at concentrations below 2 μg/kg. Their origin might not be environmental –they could be already present in the recycled wax foundation employed in these beehives. This is likely the case, especially, of tau-fluvalinate, which is a common miticide employed in apiculture with a very high persistence in wax (which would also explain why it did not migrate to the APIStrip) (Murcia-Morales et al., 2021).

In these five apiaries, the APIStrips detected a total of 51 different pesticide residues, 36 more than wax samples. These findings throughout the 6-month, APIStrip-based sampling should not be compared to one individual wax sampling, so they were not included in Fig. 6. However, such a long sampling period could not have been performed using the wax matrix: probably, the negative impact of 10 subsequent samplings on the colonies would have been too intense.

As regards the honey matrix, samples were taken from each apiary in two different occasions: one on the first half of the sampling period in 2020, and another on the second half. This resulted in 18 honey samples, in which only five different pesticide residues were detected: azoxystrobin (Maximum Residue Level –MRL– in honey 50 μg/kg), boscalid (MRL 150 μg/kg), fluopyram (MRL 50 μg/kg), tebuconazole (MRL 50 μg/kg) and thiacloprid (MRL 200 μg/kg) (regulatory and evaluat). Thiacloprid was the pesticide with the highest number of detections, being found in seven honey samples at concentrations levels up to 7.2 μg/kg. The remaining pesticides were detected in just one honey sample (except for azoxystrobin, with two detections) at concentrations below 1 μg/kg, resulting in 12 total detections for all compounds. The case of thiacloprid is of especial interest, as it is a neonicotinoid toxic to honey bees: it was found in honey from apiaries CS1, CS5, CS6 and CS8. For their part, APIStrips detected imidacloprid in CS5, CS6 and CS7. Thiacloprid is a polar compound (log P 1.26) which can easily accumulate in a hydrophilic matrix such as honey, which explains the large number of detections in these samples. In all cases, the maximum concentration detected of these pesticides was close to 100 times lower than their MRL in honey.

Conversely, in the 18 APIStrips that were taken simultaneously to the honey samples, 17 pesticide residues were detected (azoxystrobin, boscalid, carbendazim, cymoxanil, deltamethrin, fluopyram, imidacloprid, mandipropamid, metobromuron, oxasulfuron, permethrin, propamocarb, propiconazole, pyraclostrobin, quinoxyfen, spirotetramat and thrichlorfon). Therefore, the analysis of only honey samples would have reported less than one third of the possible detections with the use of APIStrips.

4. Conclusions

APIStrips have shown to be suitable for long-term, large-scale monitoring programs aimed at assessing the presence of contaminants in the environment. Their continuous use in beehives did not cause any observable harm in the honey bee colonies, while providing consistent and comprehensive information about the pesticides in surrounding areas. Boscalid was the most frequently detected compound in both 2019 and 2020, and also the one with the widest distribution throughout the country. During 2020, 75 different pesticide residues were detected, with significant variations in the nine apiaries used as sampling sites: the total number of detections ranged from 25 to 117, and the pesticide diversity (number of different pesticides found), from 8 to 31. The average concentration of pesticides was low, with few exceptions including cypermethrin. A relative indicator of the potential risk of these substances for the honey bee health was calculated, considering the LD_{50} and the concentration of each pesticide detected with the APIStrips;

however, further studies are needed to relate the indicator values to effects on the colony health. The pesticide load in the environment varied substantially in the different sampling rounds, both in terms of total detections (highest in mid July) and abundance of a certain pesticide. The results from both years were consistent to each other and to the sales of phytosanitary substances in Denmark. The analysis of wax and honey samples showed to be less representative and provide less information than the APIStrips for environmental monitorings.

Author statement

Maria Murcia-Morales: Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft, Visualization, Francisco José Díaz-Galiano: Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Review & Editing, Flemming Vejsnæs: Methodology, Investigation, Resources, Writing - Review & Editing, Supervision, Ole Kilpinen: Methodology, Investigation, Resources, Writing - Review & Editing, Jozef J. M., Van der Steen: Conceptualization, Resources, Writing - Review & Editing, Project administration, Funding acquisition, Amadeo R. Fernández-Alba: Conceptualization, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This study was part of the EC/DG SANTE project: Pilot project on environmental monitoring of pesticide use through honeybees" No SANTE/2018/E4/SI2.788418-SI2.788452, acronym: INSIGNIA. Francisco José Díaz-Galiano acknowledges the pre-doctoral Training University Lecturers (FPU) fellowship program (grant FPU18/05113) awarded by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities.

References

Aktar, M.W., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. Interdiscipl. Toxicol. 2, 1–12.
Alfeeli, B., Taylor, L.T., Agah, M., 2010. Evaluation of Tenax TA thin films as adsorbent material for micro preconcentration applications. Microchem. J. 95, 259–267.
Asman, W.A., Jorgensen, A., Bossi, R., Vejrup, K.V., Mogensen, B.B., Glasius, M., 2005. Wet deposition of pesticides and nitrophenols at two sites in Denmark: measurements and contributions from regional sources. Chemosphere 59, 1023–1031.
Casado, J., Brigden, K., Santillo, D., Johnston, P., 2019. Screening of pesticides and veterinary drugs in small streams in the European Union by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. Sci. Total Environ. 670, 1204–1225.
Cochard, P., Laurie, M., Veyrand, B., Le Bizec, B., Poirot, B., Marchand, P., 2021. PAH7 concentration reflects anthropization: a study using environmental biomonitoring with honeybees. Sci. Total Environ. 751, 141831.
Danish National Action Plan on Pesticides 2017 - 2021: Facts, Caution and Consideration, 2017. Ministry of Environment and Food of Denmark.
Danner, N., Keller, A., Hartel, S., Steffan-Dewenter, I., 2017. Honey bee foraging ecology: season but not landscape diversity shapes the amount and diversity of collected pollen. PloS One 12, e0183716.
Edo, C., Fernandez-Alba, A.R., Vejsnaes, F., van der Steen, J.J.M., Fernandez-Pinas, F., Rosal, R., 2021. Honeybees as active samplers for microplastics. Sci. Total Environ. 767, 144481.
European Commission (EC): Food Safety - Plants. EU Pesticides Database.
Gratzer, K., Brodschneider, R., 2021. How and why beekeepers participate in the INSIGNIA citizen science honey bee environmental monitoring project. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 28, 37995–38006.
Jensen, B.H., Petersen, A., Nielsen, E., Christensen, T., Poulsen, M.E., Andersen, J.H., 2015. Cumulative dietary exposure of the population of Denmark to pesticides. Food Chem. Toxicol. 83, 300–307.
Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. Apidologie 41, 312–331.
Joshi, N.C., Joshi, P.C., 2010. Foraging behaviour of Apis spp. on apple flowers in a subtropical environment. New York Science Journal 3, 71–76.
Kammoun, S., Mulhauser, B., Aebi, A., Mitchell, E.A.D., Glauser, G., 2019. Ultra-trace level determination of neonicotinoids in honey as a tool for assessing environmental contamination. Environ. Pollut. 247, 964–972.
Lambert, O., Piroux, M., Puyo, S., Thorin, C., Larhantec, M., Delbac, F., Pouliquen, H., 2012. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. Environ. Pollut. 170, 254–259.
Levin, G., 2019. Technical Documentation of the Method for Elaboration of a Land-Use and Landcover Map for Denmark Technical Report from DCE – Danish Centre for Environment and Energy. BASEMAP03. https://dce2.au.dk/pub/TR159.pdf.
Lozano, A., Hernando, M.D., Ucles, S., Hakme, E., Fernandez-Alba, A.R., 2019. Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. Food Chem. 274, 61–70.
Lydy, M.J., Harwood, A.D., Nutile, S.A., Landrum, P.F., 2015. Tenax extraction of sediments to estimate desorption and bioavailability of hydrophobic contaminants: a literature review. Integrated Environ. Assess. Manag. 11, 208–220.
Miljøstyrelsen, Bekæmpelsesmiddel-statistik, 2019. Behandlingshyppighed og pesticidbelastning baseret på salg og forbrug. Orientering fra Miljøsty- relsen nr, vol. 48, ISBN 978-87-7038-279-3, 2021.
Murcia Morales, M., Gomez Ramos, M.J., Parrilla Vazquez, P., Diaz Galiano, F.J., Garcia Valverde, M., Gamiz Lopez, V., Manuel Flores, J., Fernandez-Alba, A.R., 2020a. Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. Sci. Total Environ. 710, 136288.
Murcia-Morales, M., Van der Steen, J.J.M., Vejsnaes, F., Diaz-Galiano, F.J., Flores, J.M., Fernandez-Alba, A.R., 2020b. APIStrip, a new tool for environmental contaminant sampling through honeybee colonies. Sci. Total Environ. 729, 138948.
Murcia-Morales, M., Díaz-Galiano, F.J., Guitérrez-Tirado, I., Flores, J.M., Van der Steen, J.J.M., Fernández-Alba, A.R., 2021. Dissipation and cross-contamination of miticides in apiculture. Evaluation by APIStrip-based sampling. Chemosphere 280.
FAO, Boscalid (221) - Evaluation 06, Evaluation at FAO: Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (JMPR).
Patil, S.F., Lonkar, S.T., 1994. Determination of benzene, aniline and nitrobenzene in workplace air: a comparison of active and passive sampling. J. Chromatogr. A 688, 189–199.
Pesticidrester i fødevarer, 2019. Resultater fra den danske pesticidkontrol, Ministeriet for fødevarer, landbrug og fiskeri.
Poulsen, M.H., 2015. The frequency and foraging behaviour of honeybees and bumble bees on field beans in Denmark. J. Apicult. Res. 12, 75–80.
EU regulatory and evaluation data as published by EC, EFSA (RAR, DAR & Conclusion dossiers), EMA (e.g. EU Annex III PIC DGD).
Rortais, A., Arnold, G., Halm, M.-P., Touffet-Briens, F., 2005. Modes of honeybees exposure to systemic insecticides: estimated amounts of contaminated pollen and nectar consumed by different categories of bees. Apidologie 36, 71–83.
Sanchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N., 2016. Are bee diseases linked to pesticides? - a brief review. Environ. Int. 89–90, 7–11.
Ucles, S., Lozano, A., Sosa, A., Parrilla Vazquez, P., Valverde, A., Fernandez-Alba, A.R., 2017. Matrix interference evaluation employing GC and LC coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. Talanta 174, 72–81.
van der Steen, J.J., de Kraker, J., Grotenhuis, T., 2012. Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (Apis mellifera L.). Environ. Monit. Assess. 184, 4119–4126.
Wade, A., Lin, C.H., Kurkul, C., Regan, E.R., Johnson, R.M., 2019. Combined toxicity of insecticides and fungicides applied to California almond orchards to honey bee larvae and adults. Insects 10.

CAPÍTULO 5

MITICIDAS

CAPÍTULO 5. APLICACIÓN DE APISTRIPS EN LA EVALUACIÓN DE LA DISIPACIÓN Y CONTAMINACIÓN CRUZADA DE MITICIDAS EN COLMENAS DE ABEJA MELÍFERA

Determinación de la concentración y dispersión de tratamientos veterinarios en colmenas a través de muestreo pasivo

El uso de miticidas como el amitraz, el coumaphos o el tau-fluvalinate puede tener efectos a largo plazo sobre las colmenas de abejas, como se ha descrito en el Capítulo 1. En este último estudio, se emplearon 70 APIStrips en 14 colmenas de un mismo apiario, cada una de las cuales había sido tratada con uno de estos miticidas (o con ninguno, a modo de control). En cada colmena se realizaron cinco muestreos, correspondiendo el primero de ellos al periodo inmediatamente anterior a la aplicación del tratamiento (para obtener los valores de contaminación basal), el segundo coincidiendo con el tratamiento, y los tres últimos a modo de seguimiento en un periodo de hasta 156 días desde el inicio del estudio.

Los resultados permitieron confirmar la gran estabilidad y persistencia a lo largo del tiempo de los miticidas más apolares: tau-fluvalinate y coumaphos. En ambos casos, no se volvieron a alcanzar los niveles iniciales de contaminación ni siquiera cuatro meses después de la aplicación del tratamiento veterinario. También se observaron diferencias significativas en la concentración máxima y la velocidad de liberación de amitraz en dos formulaciones comerciales con diferentes especificaciones.

Por otro lado, el análisis de miticidas en APIStrips localizadas en colmenas de control, así como en otras colmenas próximas al lugar de aplicación, mostraron la contaminación cruzada de miticidas entre colonias del mismo apiario (hasta un 10 % de los niveles de miticidas hallados en las colmenas que habían sido tratadas). Los hallazgos de este experimento parecen indicar además que la principal causa de la contaminación cruzada no es un fenómeno ambiental como el viento, ya que las colmenas adyacentes a las que habían sido tratadas no fueron las que presentaron mayores niveles de contaminación cruzada. Por el contrario, podrían ser las propias abejas las que llevaran los contaminantes sobre su cuerpo a otras colmenas. Entender los mecanismos de contaminación cruzada entre colmenas próximas entre sí permitirá optimizar el diseño de los apiarios y proteger así a las abejas.

En este estudio se pudo confirmar además que el análisis de abejas en la monitorización de contaminantes resulta poco representativo: mientras que las APIStrips permitieron determinar tendencias claras en la disipación y contaminación cruzada de miticidas, los análisis de abejas en esas mismas colmenas reportaron resultados mucho más erráticos de los que resultaba difícil sacar conclusiones claras. La migración de miticidas a la miel, también evaluada, resultó ser mínima incluso para los compuestos más polares, los metabolitos del amitraz.

Publicación 4

Dissipation and cross-contamination of miticides in apiculture. Evaluation by APIStrip-based sampling

María Murcia-Morales, Francisco José Díaz-Galiano, Inmaculada Gutiérrez-Tirado, José Manuel Flores, Jozef J.M. Van der Steen, Amadeo R. Fernández-Alba

Chemosphere 280 (2021)

DOI: 10.1016/j.chemosphere.2021.130783

Chemosphere 280 (2021) 130783

Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Dissipation and cross-contamination of miticides in apiculture. Evaluation by APIStrip-based sampling

María Murcia-Morales [a], Francisco José Díaz-Galiano [a], Inmaculada Guitérrez-Tirado [b], José Manuel Flores [b], Jozef J.M. Van der Steen [c], Amadeo R. Fernández-Alba [a,*]

[a] Chemistry and Physics Department, University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), 04120, Almería, Spain
[b] Department of Zoology, University of Córdoba, Campus of Rabanales, 14071, Córdoba, Spain
[c] Alveus AB Consultancy, Oisterwijk, the Netherlands

ARTICLE INFO

Handling Editor: Klaus Kümmerer

Keywords:
Miticides
Apiculture
APIStrip
Dissipation
Cross-contamination
Beehives

ABSTRACT

The active substances coumaphos, tau-fluvalinate and amitraz are among the most commonly employed synthetic miticides to control varroa infestations in apiculture. These compounds can persist inside the beehive matrices and can be detected long time after their application. The present study describes the application of a new passive sampling methodology to assess the dissipation of these miticides as well as the cross-contamination in neighboring beehives. The APIStrips are a recently developed sampling device based on the sorbent Tenax, which shows a remarkable versatility for the sorption of molecules onto its surface. This avoids the need of actively sampling apicultural matrices such as living bees, wax or reserves (honey and pollen), therefore allowing to obtain representative information of the contamination in the beehive environment in one single matrix. The results show that the amitraz-based treatments have the fastest dissipation rate (half-life of 11–14 days), whereas tau-fluvalinate and coumaphos remain inside the beehive environment for longer time periods, with a half-life up to 39 days. In the present study, tau-fluvalinate originated an intense cross-contamination, as opposed to coumaphos and amitraz. This study also demonstrates the contribution of drifting forager bees in the pesticide cross-contamination phenomena. Moreover, the sampling of adult living bees has been compared to the APIStrip-based sampling, and the experimental results show that the latter is more effective and consistent than traditional active sampling strategies. The active substances included in this study do not migrate to the honey from the treated colonies in significant amounts.

1. Introduction

Western honey bee (*Apis mellifera* L.) is considered an essential species for the biodiversity, the natural ecosystems and the human diet due to its role as pollinator in both crops and wild (non-agricultural) plants worldwide (Klein et al., 2006, 2018; Potts et al., 2010; Calderone, 2012). Honey bees are exposed to a wide variety of hazards including contaminants -organic pollutants and pesticide residues-, loss of habitat, climate change and parasite infestations that lead to devastating losses of colonies (Goulson et al., 2015; Genersch, 2010; Flores et al., 2019). The mite *Varroa destructor* is one of the major threats to honey bees, as it has devastating effects on the bee colonies worldwide (Genersch, 2010; Rosenkranz et al., 2010; Le Conte et al., 2010; Smith et al., 2013). The control of this parasite is therefore a key task in apiculture, being the chemical approaches among the most common solutions employed. Active substances such as tau-fluvalinate, coumaphos and amitraz have a proven activity against *V. destructor* and there is a large number of commercial formulations available, but still, their application can also have a negative impact on the colony health in terms of increased mortality or sub-lethal effects for both adult bees and bee brood, as has been previously demonstrated and described (Johnson et al., 2013; Boncristiani et al., 2012; Berry et al., 2013; Wu et al., 2011; Sanchez-Bayo et al., 2016; Sanchez-Bayo and Goka, 2014). Johnson et al. calculated the dose of these substances estimated to cause 10% mortality in the honey bees, concluding that amitraz showed the highest toxicity (commercial formulation Apivar® LD_{10} 0.92 μg/bee), followed by tau-fluvalinate (Apistan® LD_{10} 3.08 μg/bee) and, lastly, coumaphos (Check-mite® LD_{10} 12.10 μg/bee) (Johnson et al., 2013). In another

* Corresponding author. University of Almeria, Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3), Department of Hydrogeology and Analytical Chemistry, Ctra. Sacramento S/Nº, La Cañada de San Urbano, 04120, Almería, Spain.
E-mail address: amadeo@ual.es (A.R. Fernández-Alba).

https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130783
Received 15 February 2021; Received in revised form 26 April 2021; Accepted 27 April 2021
Available online 3 May 2021
0045-6535/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

study, published by Gashout et al. in 2018, the LD_{50} values were set as 1.99 μg/bee (amitraz), 0.48 μg/bee (tau-fluvalinate) and 6.23 μg/bee (coumaphos) (Gashout et al., 2018). Due to the different experiment designs (field studies/laboratory, oral/contact dose, adult/brood …), the parameters that can be measured (LD_{10}, LD_{50}, sublethal effects …) and the possibility of synergistic effects among the pesticides, the assessment of the toxicity of these compounds to honey bees is a challenging task (Johnson et al., 2013; Wu et al., 2011; Gashout et al., 2018; Gregorc et al., 2018; Dai et al., 2018; Lim et al., 2020).

Therefore, considering the possible adverse effect derived from the use of miticides, a comprehensive study of the dissipation of these compounds in honey bee colonies is essential to ensure good apicultural practices. An extensive use of these products to fight *V. destructor* infestations may also lead to the appearance of resistance and, therefore, a lack of effectiveness of the treatments (Johnson et al., 2010). The cross-contamination of these compounds should also be considered as, in some cases, residues of a miticide that has not been applied to a certain colony can be detected (Lozano et al., 2019). Among the causes of these cross-contamination findings are the use of recycled beeswax, the air diffusion or the drifting of the bees to other colonies. It has been previously demonstrated that bees tend to drift to other colonies, and that this effect is influenced by the intensity and direction of the wind and the relative disposition of the beehives in the apiary (Free, 2009; Jay, 2015).

The analysis of veterinary treatments inside the beehives is usually performed through apicultural matrices including beeswax, bee brood, adult bees, reserves of pollen (beebread) and honey (Lozano et al., 2019; Murcia Morales et al., 2020; Calatayud-Vernich et al., 2018; Serra--Bonvehi and Orantes-Bermejo, 2010). However, the different physicochemical properties of these multiple matrices affect the extent to which the residues are accumulated, which could lead to under- and overestimations of the actual pesticide load in the beehive. For instance, it has been stated that the polar pesticide amitraz and its degradation products DMF and DMPF tend to migrate to honey, whereas tau-fluvalinate –with a lower polarity– is not usually detected in this hydrophilic matrix (Lozano et al., 2019). The opposite happens with lipophilic matrices such as beeswax, where non-polar compounds –tau-fluvalinate, coumaphos– are preferentially accumulated. This irregular distribution of contaminants in multiple apicultural matrices has been previously evaluated and discussed (Murcia Morales et al., 2020; Bogdanov et al., 2015). Therefore, the analysis of only one type of matrix does not provide representative information about the contamination circulating in the colony and, as the analysis of different matrices is necessary to obtain reliable data from a single beehive, the costs and time required are inevitably affected. Moreover, the use of apicultural matrices is limited by the availability of samples: the presence of beebread and honey varies according to the season and, in some cases, very limited amounts of sample can be withdrawn from the beehive. The active sampling also involves ethical concerns, as the colony resources (adult bees, bee brood and nourishment) are taken, which is harmful to its development and limits the number of sampling rounds that can be performed on each beehive (Murcia Morales et al., 2020).

Conversely, the use of passive sampling strategies minimizes the human interaction and the negative effects on the colonies. In this context, the APIStrip is a recently developed passive sampling device based on the sorbent Tenax TA, a porous polymer that binds organic molecules onto its surface (Murcia-Morales et al., 2020). This polymer has typically been employed for the active or passive sampling of environmental contaminants in air and sediment samples (Lydy et al., 2015; Patil and Lonkar, 1994; Heitmann et al., 2011), and its solubility in chlorinated solvents such as dichloromethane make it possible to use uniform and thin Tenax films that keep the adsorption capability of the solid particles, thus increasing the potential applications of this sorbent (Murcia-Morales et al., 2020; Alfeeli et al., 2010; Van Den Houwe et al., 2017). The versatility of Tenax allows the APIStrip to bind molecules with a wide range of physicochemical properties, therefore ensuring the representability of the sampling –i.e. one single matrix provides complete information about the contaminants inside the beehive. This avoids the abovementioned limitations of active sampling as, in the APIStrip-based sampling, 1) bees are not affected by the insertion of the sampler inside their colonies, 2) their resources are not withdrawn and longer monitorings can be performed, 3) the time and costs of the sampling and analysis are greatly reduced and, most importantly, 4) only one matrix provides with comprehensive and representative information of the contamination in the whole colony during the sampling period (usually 14 days) (Murcia-Morales et al., 2020). These newly developed passive samplers have already been employed in large-scale monitoring programs in the framework of the INSIGNIA pilot study (EC/DG SANTE: Pilot project on environmental monitoring of pesticide use through honeybees, No SANTE/2018/E4/SI2.788418-SI2.788452) (Murcia-Morales et al., 2020).

The present study evaluates the dissipation of three common miticides employed for varroa control (tau-fluvalinate, coumaphos and amitraz), as well as the cross-contamination to other non-treated beehives and the migration of these residues to honey and adult bees. The experimental design was based on passive sampling using APIStrips, which is easy to perform, harmless for the bees, and provides representative information about the contamination in the beehive environment.

2. Experimental

2.1. Beehive management and treatments

The experimental field studies in beehives were carried out between July and December 2019. Honey bee hives were sited in an experimental apiary at the University of Córdoba (Córdoba, Spain. 41° 44′30.519 N, 6° 16′41.3322″ W), and the honey bee colonies were housed in wooden Langstroth hives. The assay was conducted with fifteen colonies of the native honey bee (*A. m. iberiensis*, Engel), which were separated approximately 50 cm from each other and distributed in five groups. Each group was treated with a different treatment against varroa: Check-mite® (coumaphos), Apistan® (tau-fluvalinate), Apivar® (amitraz), Amicel® (amitraz) and an untreated control group (Fig. 1). The treatments were applied following, in each case, the specifications of the commercial product. In brief, all treatments were introduced in the beehives on July 26th, and they remained until September 4 th, when the strips of the treatments were removed. The date of treatment application was chosen within the period with the least amount of brood in the beehives in the area (Flores et al., 2019; Hernando et al., 2018), as recommended for the treatments against varroa (Rosenkranz et al., 2010). All the treatments remained continuously in the hives, except for the Amicel®, which was applied twice following the product's recommendations. For this treatment, a second dose was applied on August 12 th. This last treatment was applied on cellulose strips, and the bees themselves gnawed and removed it from the hives. One of the beehives treated with Check-mite® was lost due to a varroa infestation, so it was removed from the study.

2.2. Reagents and materials

All high-purity pesticide standards were obtained from LGC (Teddington, United Kingdom), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) or Riedel-de-Haën (Seelze, Germany) and were stored at −30 °C. Individual pesticide stock solutions (1000–2000 mg/L) were prepared in acetonitrile and were stored in amber screw-capped glass vials in the dark at −20 °C. Individual standard solutions, used for the optimization, along with standard-mix solutions, used for the calibration, were prepared from the stock standards.

Optima LC-MS grade water was obtained from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). LC-MS grade methanol and ethyl acetate for pesticide residue analysis were purchased from Fluka Analytical (Steinheim,

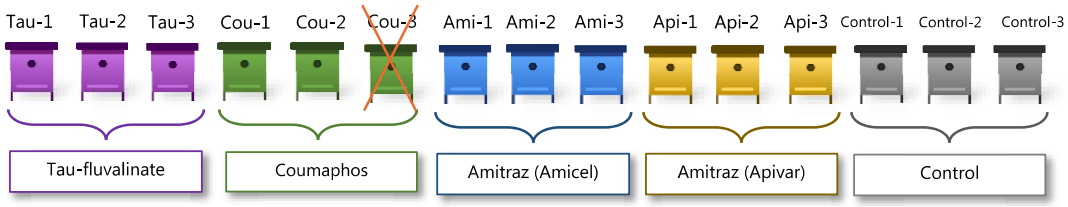


Fig. 1. Distribution of the beehives employed for the dissipation and cross-contamination studies. Beehive Cou-3 (treated with a commercial formulation of coumaphos) did not survive through varroa infestation and was removed from the study.

Germany). Ultra-gradient HPLC-grade acetonitrile was obtained from Merck. Ammonium formate, formic acid, anhydrous magnesium sulphate, sodium chloride, sodium hydrogenocitrate sesquihydrate and sodium citrate tribasic dihydrate were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). PSA sorbent was supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.3. APIStrip preparation and sampling

The preparation of the APIStrip sampling devices is fully described in a previous study (Murcia-Morales et al., 2020). Both sides of thin polystyrene plastic layer (5 × 10 × 0.2 cm) are covered with 6 mL of a Tenax solution in dichloromethane at high concentration (125 mg/mL). After the evaporation of the solvent under a gentle nitrogen current, the upper section of the strip is drilled to form a small hole. The resulting APIStrip contains 0.75 g of Tenax (0.375 g per side) in a uniform film covering the sampler surface. A thread or wire is then introduced inside the hole to facilitate the introduction of the APIStrips inside the beehive, where they remain for two weeks (sampling period).

To assess the dispersion of the treatments in the beehives, the APIStrips were placed in the middle of the brood area in five subsequent periods of two weeks, coinciding with critical moments for the treatment and post-treatment of the colonies (Fig. 2). Period 0 took place between July 10th and July 24th, just before treatments. This starting point allowed to know the residual concentration of circulating residues prior to the treatment application. Period 1 was from July 25th (coinciding with the application day of the treatments in the beehives) to August 8th. Period 2 was from September 4th to September 18th, just after removing the treatment strips. Periods 3 and 4 were from October 31st to November 14th and from November 28th to December 12th respectively, which corresponds to the post-treatment follow-up periods.

Additionally, samples of adult bees (approx. 100 g/colony) were taken on three occasions, coinciding with the removal of the APIStrips in the first three evaluation periods: July 25th, August 8th and September 18th. A bee brush was employed for the sampling of living bees from the colonies. One honey sample was also taken from selected beehives after period 3 (November 14th) to assess the contamination of this matrix with veterinary treatments. The honey was obtained from the active sampling of a wax comb portion (approximately 5 × 5 cm). Both honey and adult bee samples were stored at −20 °C until their extraction and analysis.

2.4. APIStrip extraction procedure

The desorption procedure of the pesticides from the Tenax film in the APIStrip surface was carried out as described in a previous study (Murcia-Morales et al., 2020): first, the APIStrips were cut in small pieces and placed inside 50-mL PTFE centrifuge tubes. Then, 10 mL of acetonitrile were added and the samples were automatically shaken at 1250 rpm (Geno/Grinder 2010, SPEX) for 3.5 min and centrifuged at 4000 rpm (3113 g) for 5 min. This extraction procedure entails a 10-fold dilution (1 APIStrip per 10 mL acetonitrile), which was undone during the preparation of the injection vials.

Procedural internal standards were employed to control the extraction performance: dichlorvos-D6, malathion-D10, carbendazim-D3 and triphenyl phosphate (TPP). The recovery of dichlorvos-D6, malathion-D10 and carbendazim-D3 was checked by LC-MS/MS and the recovery of malathion-D10 and triphenyl phosphate was tested by GC-MS/MS.

For the preparation of the injection vials, 500 µL of the sample extracts were evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 50 µL acetonitrile and 200 µL ultrapure water (LC-MS/MS) or 50 µL ethyl acetate (GC-MS/MS). In both cases, the vial preparation entails a 10-fold concentration (the addition of water to the LC vials does not affect the quantitation). Injection internal standards (dimethoate-D6 for LC, lindane-D6 for GC) were employed to check the variations in the injection volume. In the samples were a high concentration of analyte was expected, the concentration step was avoided and, in some cases, a dilution of the extracts was performed.

Calibration curves were prepared as follows: a blank APIStrip extract (500 µL) was evaporated and reconstituted with an organic solvent (50 µL ethyl acetate for GC-MS/MS, 50 µL acetonitrile for LC-MS/MS) containing a mixture of pesticides at 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 or 200 µg/L. For

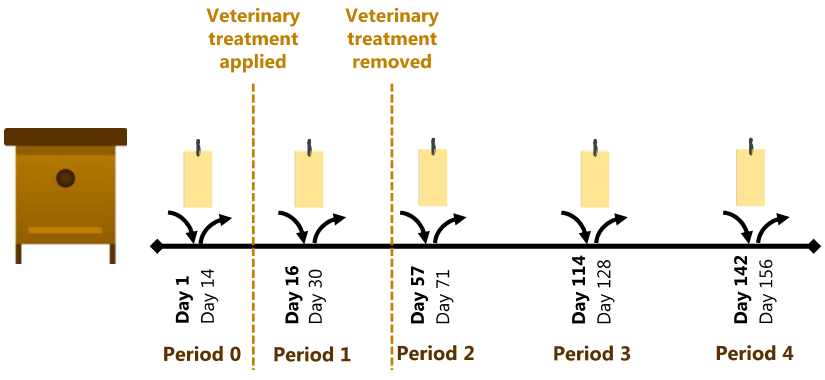


Fig. 2. Sampling and veterinary application schedule.

the LC vials, 200 μL of ultrapure water were added.

2.5. Honey extraction procedure

The extraction of the honey samples was performed following the QuEChERS extraction method with a thermostatted automatic shake, as described in previous studies (Lozano et al., 2019). A 10 g portion of homogenized sample was weighed in a 50-mL PTFE centrifuge tube and 10 mL of acetonitrile were added. The samples were shaken in an automatic axial extractor (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain) for 4 min. Then, 4 g MgSO4, 1 g NaCl, 1 g trisodium citrate dihydrate and 0.5 g disodium hydrogencitrate sesquihydrate were added and the samples were shaken in the automatic axial extractor for 5 min using the holder temperature at 40 °C. The extracts were then centrifuged (4500 rpm, 3923 g) for 5 min. A 5 mL volume of the supernatant was transferred to a 15-mL PTFE centrifuge tube containing 750 mg of $MgSO_4$ and 125 mg of PSA. The samples were shaken in a vortex for 30 s and centrifuged again (3500 rpm, 2374 g) for 5 min. Finally, the extracts were transferred to amber vials and they were acidified with 10 μL of formic acid 5% per mL of extract. Procedural internal standards (dichlorvos-D6, malathion-D10, carbendazim-D3 and TPP) were used as surrogate standards to control the extraction performance.

During the preparation of the sample vials, different procedures were followed according to the analytical technique. For GC-MS/MS, 50 μL of the honey extracts were evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted with 50 μL of ethyl acetate. For the LC-MS/MS injection vials, 100 μL of the extract were diluted with 400 μL of water. Dimethoate-D6 and lindane-D6 were used as injection internal standards in all vials for LC and GC, respectively. The matrix-matched calibration curves were preparing by evaporation of a blank honey extract (50 μL for GC-MS/MS, 100 μL for LC-MS/MS) and reconstitution with the same volume of an organic solvent (ethyl acetate for GC-MS/MS, acetonitrile for LC-MS/MS) containing a mixture of pesticides at 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 or 200 μg/L. Finally, 400 μL of ultrapure water were added to the LC-MS/MS vials.

2.6. Adult bees extraction procedure

For the extraction of honey bee samples, a modified QuEChERS method including ultrasound-assisted extraction (UAE) was employed (Murcia Morales et al., 2020). First, 2 g of each sample were weighed in a 50-mL PTFE centrifuge tube and 5 mL of ultrapure water were added. The samples were then shaken manually and let stand for 5 min. Subsequently, 5 mL of acetonitrile were added and the samples were sonicated with a Sonoplus HD 3100 sonicator (Bandelin, Germany) for 20 s using the following operational parameters: amplitude: 75%; pulse: 5 s; let stand: 2 s. After the sonication, the samples were shaken in an automatic axial extractor (AGYTAX®, Cirta Lab. S.L., Spain) for 15 min. Afterwards, 2 g MgSO4, 0.5 g NaCl, 0.5 g trisodium citrate dihydrate and 0.25 g sodium hydrogencitrate sesquihydrate were added and the samples were shaken again in the automatic axial extractor for 5 additional min. The samples were then centrifuged (3500 rpm) for 5 min. Afterwards, 2 mL of the extract were transferred to a 15-mL PTFE centrifuge tube containing 40 mg of Z-Sep and 125 mg PSA, vortexed and centrifuged (3500 rpm) for 5 min. The eluates were transferred to amber vials and acidified with 10 μL of 5% formic acid per mL of extract. This extraction procedure entails a 2.5-fold dilution that was undone during the preparation of the injection vials (performed as described previously for honey samples, with a concentration step).

2.7. GC-QqQ-MS/MS and LC-QqQ-MS/MS analysis

The analyses by gas chromatography were performed in an Agilent Intuvo 9000 GC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an Agilent 7693 autosampler and an Agilent 7010 GC-MS/MS triple quadrupole. For the LC-MS/MS analyses, an Agilent UPLC 1290 Series coupled to an Agilent Technologies 6490 Triple Quad LC/MS was used. The chromatographic, acquisition and processing parameters for the pesticide residue analysis in both GC-MS/MS and LC-MS/MS are described elsewhere (Murcia-Morales et al., 2020). Retention times, transitions and collision energy (CE) for the analyzed compounds are detailed in Table 1. In all analysis performed, the experimental Limit Of Quantification (LOQ) was set as 0.5 μg/kg (honey and bee samples) or 0.5 ng/APIStrip.

2.8. Statistical analysis

Degradation kinetics were evaluated using the statistical software IBM® SPSS® Statistics Version 25. Experimental data were fit using non-linear regression to the equation of first-order dissipation Using this software and equation model, the initial concentration (X_o) and the dissipation rate constant (*k*) were estimated for each pesticide dissipation curve. Model evaluation was performed until the successive residual sums of squares was $\leq 1.000 \cdot 10^{-8}$, and both parameters calculated with a 95% confidence interval (CI). The coefficient of determination r^2 was also determined during model evaluation.

3. Results and discussion

3.1. Dissipation studies

For the dissipation and the cross-contamination studies, 15 beehives were employed in five consecutive sampling rounds throughout a 142-day period. Three veterinary treatments were employed on period 1 in the beehives (see Fig. 1 in *Experimental* section): amitraz was applied to six colonies in two different commercial forms (Amicel® and Apivar®, colonies named as Ami-X and Api-X), and both tau-fluvalinate and coumaphos were applied to three colonies each (colonies Tau-X and Cou-X). The remaining three beehives were kept as control colonies (Control-X), with no veterinary treatments applied. One of the colonies treated with coumaphos did not survive the study due to a Varroa infestation, so its results are not presented here. In all APIStrip samples, these veterinary treatments were analyzed by GC-MS/MS (tau-fluvalinate and coumaphos) and LC-MS/MS (amitraz, expressed as the sum of DMF, DMPF and the parent compound).

Table 2 shows the concentrations of tau-fluvalinate, coumaphos and amitraz detected in the 70 APIStrips used in the study. The highlighted cells indicate which veterinary treatment was applied to each colony. In all cases, period 1 corresponds to the moment when the veterinary treatments were applied. It can be seen that, in most highlighted cells, the concentrations of each pesticide were the highest in this period and that, in subsequent samplings, the concentrations underwent a sequential decrease. The concentrations observed in period 0 were considered as the background levels inside the beehives, which could arise from the use of contaminated, recycled beeswax (Lozano et al., 2019). The concentrations shown in the table refer to the amount of pesticide detected in each APIStrip and, therefore, they are only comparable among other APIStrip-results, but not to other apicultural matrices.

Table 1
Acquisition parameters for the studied compounds.

Compound	Rt (min)	Transitions	CE (eV)	Technique
Coumaphos	9.73	362.0–334.0	5	GC-MS/MS
		362.0–109.0	15	
Tau-fluvalinate	10.92	250.0–200.0	20	GC-MS/MS
		250.0–55 .0	15	
DMF	7.87	150.0–107.0	20	LC-MS/MS
		150.0–132.0	10	
DMPF	4.75	163.0–122.0	15	LC-MS/MS
		163.0–106.9	20	
Amitraz	14.19	294.1–162.9	5	LC-MS/MS
		291.1–253.0	15	

Table 2
Concentration of miticides detected in APIStrip samples (in ng/APIStrip)[a].

	Period	Tau-fluvalinate					Coumaphos					Amitraz (sum)[b]				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
Colony	**Tau-1**	26	2336	851	96	186	14	19					85			
	Tau-2		1467	488	71	113							0			
	Tau-3		1823	739	128	102	3						355			
	Cou-1	12		41	17		38	1876	889	244	251		80		14	
	Cou-2	1		108		4		948	431	157	128	22	20	20		
	Am-1	2	3	28	4		12	16	7			20	32211	7714	9	6
	Am-2			81								28	71469	8701	68	16
	Am-3	6		36								37	47679	2300	23	4
	Ap-1			19					147			5	274	1026		9
	Ap-2			149				23	24				469	747	13	
	Ap-3		10	18				50	1				370	910	36	
	Control-1			43			26	60	41		4					
	Control-2	1							8			10	75	69	32	
	Control-3	9		66									170	59		

[a] Blank cells represent that the residue was not detected above the instrumental LOQ.
[b] Amitraz concentration expressed as the sum of DMF, DMPF and parent compound.

The dissipation of tau-fluvalinate over time in the beehives where this treatment was applied (Tau-1, Tau-2 and Tau-3) is illustrated in Fig. 3a. It can be observed that the maximum amounts of tau-fluvalinate were detected in period 1, corresponding to the application of the commercial form of tau-fluvalinate in the three beehives and reaching values of up to 2336 ng/APIStrip. Thirty-one days after the application (period 2), the concentration of tau-fluvalinate in the beehives decreased 59–77% with regard to the concentration in period 1. In all three colonies treated with tau-fluvalinate, the concentration of this compound did not decrease to the background levels even 123 days after the application of the veterinary treatment (period 4). The lipophilic nature of tau-fluvalinate (log K_{ow} 7.02) and its high stability in beeswax explain the high persistence of this residue inside the beehive –i.e. in the colony environment, as had already been described in a previous study (Murcia Morales et al., 2020).

Similar tendencies to those of tau-fluvalinate can be observed in Fig. 3b, which shows the coumaphos concentrations in the beehives where its commercial formulation was applied and that survived the varroa infestation (Cou-1 and Cou-2). Coumaphos is also a lipophilic compound (log K_{ow} 3.86) with affinity for beeswax and high persistence in this matrix (Lozano et al., 2019), which explains a) the long times required for the dissipation of the residue in the beehives and b) the fact that the final values were higher than the background levels. However, the maximum concentration detected in Cou-2 (948 ng/APIStrip) was significantly low; this lack of liberation of the active substance could explain the fact that one of the three colonies treated did not survive the

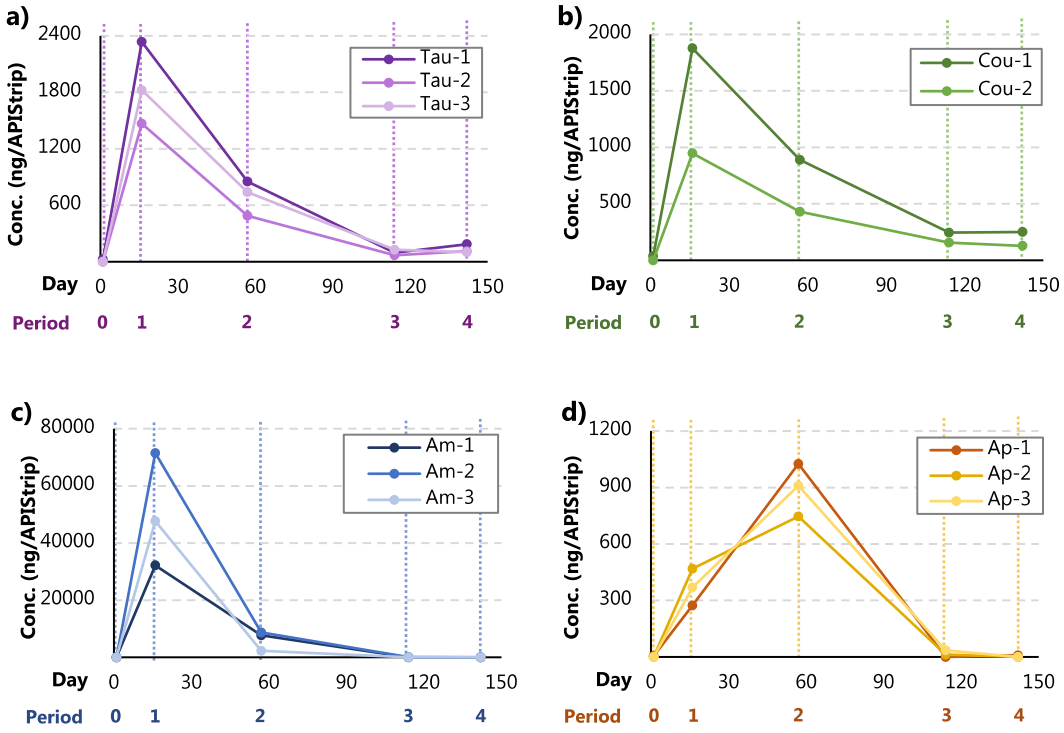


Fig. 3. Evaluation of the dissipation of **a)** tau-fluvalinate; **b)** coumaphos; **c)** amitraz (Amicel®); **d)** amitraz (Apivar®) in the beehives treated with their commercial formulations.

varroa infestation and could not be included in the present study. Another possible explanation for the loss of the colony Cou-3 is based on the resistance to coumaphos that has already been described in some Varroa infestations (Johnson et al., 2010).

Lastly, two different commercial formulations of amitraz were employed: Amicel® (Fig. 3c) and Apivar® (Fig. 3d). From the comparison of their corresponding graphs, it can be concluded that there are significant differences in the modes of action of these two commercial products. Whereas Amicel® exhibited a fast liberation of the active substance at early stages of the treatment (highest concentrations of amitraz on period 2), Apivar® showed a slower liberation and the maximum amounts were reached later. This difference might be due to the support of the treatment and the action of the bees: in Amicel®, the support are cellulose strips which are gnawed by bees, favoring the speed of distribution of the treatment; however, in Apivar®, the support are plastic strips, which are not gnawed by bees and the distribution of treatment is therefore slower. The intensity of the treatments was also different: in the colonies treated with Amicel®, concentrations up to 71469 ng/APIStrip were detected and, in those treated with Apivar®, the maximum concentration detected was 1026 ng/APIStrip. In the commercial specifications, Apivar® is described as a slow, controlled release veterinary treatment, which shows consistency with the experimental concentration values. However, in both cases, the dissipation of the active substance occurred at a higher rate than with the other treatments (tau-fluvalinate and coumaphos): on period 3, the concentration in the six beehives treated with any of the commercial formulations of amitraz decreased virtually to the background levels and, by period 4, the amitraz residues were negligible. These results are consistent with those obtained in a previous study, where the dissipation of amitraz from beehive matrices was shown to occur at a fast rate (Murcia Morales et al., 2020).

The persistence of these pesticide residues was also assessed by statistical analysis through calculation of their corresponding dissipation curves. The average concentrations obtained for each group of treated beehives (Tau, Cou, Ami and Api) in each period where adjusted to a non-linear first-order reaction kinetics with formula

$$X = X_0 \cdot e^{-kt}$$

where X is the pesticide concentration detected at t days after the application in ng/APIStrip, X_0 is the concentration at time $t = 0$ and k is the dissipation rate constant. Table 3 shows the parameters obtained for the four veterinary treatments applied, which were plotted versus time to obtain the dissipation curves (Fig. 4). In the case of Apivar®, which showed a slow release of the active substance amitraz, the results from day 16 were not included in the statistical analyses to ensure an appropriate adjustment, which in turn resulted in higher uncertainty (measured as the confidence intervals at 95% significance). The obtained coefficients of determination (r^2) confirm that the dissipation of tau-fluvalinate, coumaphos and amitraz seem to adjust to a first-order reaction under the experimental conditions studied. However, due to the limited number of data points employed for the statistical analysis, this conclusion is not enough supported and the adjustment to a first-order reaction should only be considered as possible, but not certain. Coumaphos has the lowest dissipation rate constant followed by tau-fluvalinate, which is reflected in their dissipation curves. Conversely, both commercial forms of amitraz show significantly higher values of k which are, moreover, very similar to each other (Amicel® 0.051 days^{-1}, Apivar® 0.063 days^{-1}): these two treatments show virtually the same dissipation curve. In both cases, the dissipation kinetics of amitraz was studied jointly for the parent compound and the metabolites DMF and DMPF, using the concentration data shown in Table 2. The half-life periods ($t_{½}$) were also calculated, being 39 days for coumaphos, 28 for tau-fluvalinate, 11 for the commercial formulation Amicel® and 14 for Apivar®. The fact that both Amicel® and Apivar® provide very similar statistical parameters and dissipation curves is coherent with both having the same active substance: amitraz.

Table 3
Statistical parameters derived from the dissipation studies.

Treatment	$X_o \pm CI$[a] (ng/APIStrip)	$k \pm CI$[a] (days^{-1})	r^2	$t_{½}$ (days)
Tau-fluvalinate	1878 ± 259	0.025 ± 0.008	0.996	28
Coumaphos	1409 ± 179	0.018 ± 0.005	0.996	39
Amitraz (*Amicel®*)	50456 ± 955	0.051 ± 0.004	1.000	14
Amitraz (*Apivar®*)[b]	11647 ± 1962	0.063 ± 0.041	1.000	11

[a] Confidence intervals at a level of significance 95%.
[b] Dissipation studies not including data from day 16.

3.2. Cross-contamination of miticides

The analysis of apicultural matrices reflects the presence of certain active substances in beehives where no treatment had been applied, which has typically been attributed to the use of contaminated, recycled beeswax (Lozano et al., 2019). However, the cross-contamination derived from veterinary treatments applied in colonies nearby could likewise result in the presence of not-applied pesticide residues.

Fig. 5 shows the beehives in which tau-fluvalinate was not applied but that were located in the same apiary. In these cases, there was a remarkable increase in the detected concentration of tau-fluvalinate in period 2, indicating an intense cross-contamination of this pesticide residue to other non-treated colonies. The beehives with the highest concentrations (Ap-2, Cou-2, Am-2 and Control-3) were not located the closest to the treated colonies, thus indicating that the main cross-contamination mechanism cannot be attributed to atmospheric events -i.e. air diffusion-. Had it been the main cause, beehives Cou-1 and Cou-2 would have shown the maximum concentration of tau-fluvalinate, as these were adjacent to the treated beehives (*see* Fig. 1 *in the Experimental section*). These cross-contamination events are due to the drifting of the forager bees carrying pesticide particles on their bodies and entering different beehives. The drifting of honey bees is a well-known phenomenon that depends on a number of factors including the strength and location of the colonies or the climate conditions (Pfeiffer and Crailsheim, 1998; Neumann et al., 2000).

It is noteworthy that, in the beehives that were not treated with tau-fluvalinate, the background levels were reached again in period 3 (day 114), contrarily to what happened in the treated beehives. The cause is probably that the cross-contamination does not affect very intensely the surrounding beehives, as can be concluded from the highest concentrations of tau-fluvalinate (up to 2336 ng/APIStrip in the treated beehives, 149 ng/APIStrip in the non-treated beehives). The ratio of cross-contamination among colonies from the same apiary is estimated to reach values up to 10% regarding the amount of residue in the treated beehive.

In the case of coumaphos, as can be seen in Table 2, the cross-contamination was not as intense as it was for tau-fluvalinate, the only exception being beehive Ap-1, with a high cross-contamination in period 2 (147 ng/APIStrip). This beehive was not placed close to the treated Cou-1 nor Cou-2; therefore confirming that the mechanism of the cross-contamination is closely related to bee drifting. There was also a slight increase in the coumaphos concentration in other five colonies from the apiary, with cross-contamination levels up to 6% with regard to the treated colonies.

The cross-contamination originated by amitraz-based veterinary products reaches higher values than the ones caused by coumaphos. Also, in this case, the cross-contamination phenomena are not related to the proximity to the treated colonies: the beehive with the highest levels (Tau-3, with 355 ng/APIStrip of amitraz during period 1) was not placed close to the Am and Ap colonies. In all the beehives not treated with amitraz, the initial levels of this compound and its degradation products

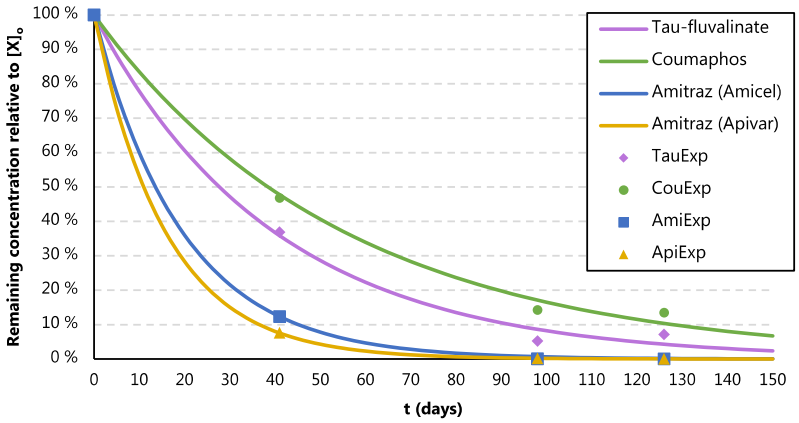


Fig. 4. Relative dissipation curves for the veterinary treatments applied to the colonies. The geometric figures show the actual values obtained in the field studies, whereas the lines represent the predicted values derived from the statistical analysis.

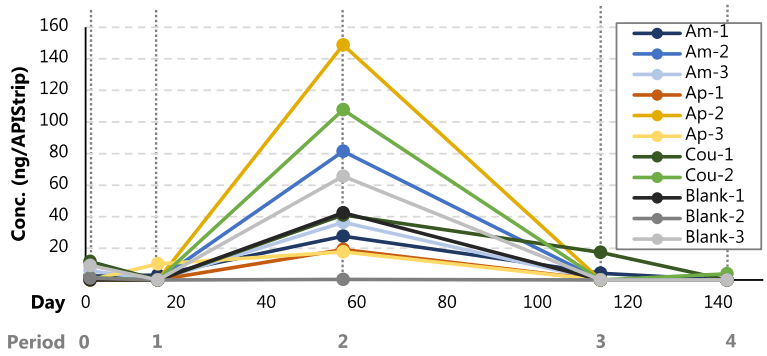


Fig. 5. Evaluation of the cross-contamination of tau-fluvalinate in the beehives where this treatment was not applied.

DMF and DMPF are quickly reached back.

3.3. Use of adult bees for monitoring

The beehives employed for the present study contained colonies of approximately 20000–25000 adult bees. During a typical sampling, usually less than 100 bees are taken and, out of them, only 20–30 are needed for a QuEChERS sample treatment method (2 g of sample per extraction, average weight of an adult bee 0.1 g). Therefore, the analysis of adult bees will hardly be representative of the whole colony: if only 0.1% of the bee population is considered, the results might not describe accurately the environment inside the beehive. Furthermore, the results of the adult bee samples only reflect the distribution of circulating residues at the time the sample was taken, while the APIStrips show a continuous accumulation of treatments over a two-week period.

In this particular study, the analysis of adult bees only revealed a) the

Table 4
Concentration of miticides detected in adult bee samples (μg/kg)[a].

	Tau-fluvalinate				Coumaphos			Amitraz		
	Period	0	1	2	0	1	2	0	1	2
Colony	**Tau-1**	3	60	13	13	38			1	
	Tau-2		90	22	10	31	5	7		
	Tau-3		119	10		27		1	2	1
	Cou-1	2				247	93			4
	Cou-2	3	4		11	124	36	6		
	Am-1	2	6		9	26	8		124	2
	Am-2		2			12	2		51	8
	Am-3		2						64	23
	Ap-1		2		11				15	2
	Ap-2	2	4		10				23	2
	Ap-3		3			12			30	
	Control-1		2		8	39	10			1
	Control-2	3	4		16	11		1		
	Control-3	3	2					3	7	

[a] Blank cells represent that the residue was not detected above the instrumental LOQ.

use of veterinary treatments in the corresponding beehives and b) a cross-contamination of coumaphos to other beehives (Table 4). As can be seen, for both tau-fluvalinate and amitraz, the only significant variations from the background levels occur in the beehives where each veterinary treatment was applied (highlighted cells); the beehives where these treatments were not applied do not show an increase in the concentrations detected i.e. the cross contamination observed with this matrix is negligible. Conversely, a slight cross-contamination originated by coumaphos can be observed in period 2 in some of the non-treated beehives.

The nature and amount of the active substances detected in adult bees depends of a number of factors such as the type of bee sampled -e.g. drones, foraging workers or nursing workers-, the strength and health state of the bees. This, added to the limited number of bees collected for the analyses, explains the deviations from the APIStrip results. Therefore, adult bees are not the most convenient matrix to perform monitoring studies, as the results are not representative nor consistent. Moreover, the use of living insects for research purposes entails some ethical concerns and should be replaced when possible (Fischer et al., 2019), something easily achievable with the use of APIStrip-based sampling.

As regards the safety of the use of tau-fluvalinate, coumaphos and amitraz for the treatment of varroa infestations in honey bee colonies, none of the bee samples analyzed showed values of miticides which were close to their respective LD_{50}. The maximum amount of miticides found was 247 μg/kg coumaphos in bees from Cou-2, being the LD50 of this compound 121000 μg/kg. Even if sub-lethal effects can still occur, the miticides treatments included in the study do not possess a direct risk for the life of adult bees.

3.4. Contamination of honey with veterinary treatments

One of the main concerns of many beekeepers is the quality of the honey their bees produce and the possible contaminations derived from the use of veterinary treatments to protect the colonies. The Maximum Residue Level (MRL) of the studied substances in honey samples is 50 μg/kg, 100 μg/kg and 200 μg/kg for tau-fluvalinate, coumaphos and amitraz, respectively. As can be seen in Table 5, in period 3, the detected amounts of these pesticides in honey are much lower than their corresponding MRLs, thus indicating only a slight migration and accumulation of these residues in honey. The pesticide with the highest concentration in honey samples was amitraz, whose metabolites DMF and DMPF are the most polar of the set with log K_{ow} 2.23 and 2.92 respectively. On the contrary, the highly non-polar tau-fluvalinate (log K_{ow} 7.02) was only found in one sample at trace levels, thus confirming that the polarity of the active substance is one of the main factors determining the migration to the polar honey matrix (Lozano et al., 2019).

4. Conclusions

APIStrip-based sampling has shown to be a useful tool to evaluate the dissipation of contaminants inside honey bee colonies and the cross-contamination of these substances to surrounding non-treated beehives. The active substances coumaphos and tau-fluvalinate can accumulate inside the beehive environment for long time periods, whereas the dissipation of amitraz occurs at a faster rate. Tau-fluvalinate originates the most intense cross-contamination phenomena, reaching beehives from the same apiary that are not located near the treated ones. The main cross-contamination mechanism is not the air diffusion but, instead, the transmission is mainly originated by the drifting of forager bees to other colonies, carrying the contaminants on their bodies. A comprehensive monitoring of these miticides inside the beehives is crucial to ensure good apicultural practices that avoid the possible alterations in the colony strength and health. The use of living bees for long-term monitoring studies does not provide reliable information –the results obtained are not concluding and do not show the dissipation nor cross-contamination tendencies- and it also entails ethical concerns. Conversely, the APIStrip-based passive sampling strategy avoids these issues and simplifies the experimental field studies. The honey samples analyzed show that these miticides do not migrate to a high extent to this matrix and the values obtained from this study are far below their corresponding MRLs.

Table 5
Concentration of miticides detected in honey samples (μg/kg)[a].

Sample	Tau-fluvalinate	Coumaphos	Amitraz
Pre-treatment (period 0)			
Control-1		1	7
Control-2		3	3
Post-treatment (period 3)			
Tau-1		3	2
Tau-2	1	5	10
Cou-1		20	12
Am-1		3	12
Am-2		2	10
Ap-1		26	55
Ap-2		6	7

[a] Blank cells represent that the residue was not detected above the instrumental LOQ.

Credit author statement

María Murcia-Morales: Methodology – Investigation – Writing - Visualization, Francisco José Díaz-Galiano: Methodology - Formal analysis, Inmaculada Guitérrez-Tirado: Methodology – Investigation, José Manuel Flores: Conceptualization - Resources, Jozef J. M. Van der Steen: Resources – Project administration - Funding acquisition, Amadeo R. Fernández-Alba: Conceptualization – Writing – Supervision - Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank the European Union Regional Development Fund FEDER 2014–2020, the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) of Spain, and the Project Ref. RTA2017-00058-C04 for their financial support. The authors also thank the INSIGNIA project (EC/DG SANTE: Pilot project on environmental monitoring of pesticide use through honeybees, No SANTE/2018/E4/SI2.788418-SI2.788452) for their technical support and the ideas provided for the improvement of this study.

References

Alfeeli, B., Taylor, L.T., Agah, M., 2010. Evaluation of Tenax TA thin films as adsorbent material for micro preconcentration applications. Microchem. J. 95, 259–267.
Berry, J.A., Hood, W.M., Pietravalle, S., Delaplane, K.S., 2013. Field-level sublethal effects of approved bee hive chemicals on Honey Bees (Apis mellifera L). PloS One 8, e76536.
Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Imdorf, A., 2015. Acaricide residues in some bee products. J. Apicult. Res. 37, 57–67.
Boncristiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J.D., Pettis, J., vanEngelsdorp, D., 2012. Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees Apis mellifera. J. Insect Physiol. 58, 613–620.
Calatayud-Vernich, P., Calatayud, F., Simo, E., Pico, Y., 2018. Pesticide residues in honey bees, pollen and beeswax: assessing beehive exposure. Environ. Pollut. 241, 106–114.
Calderone, N.W., 2012. Insect pollinated crops, insect pollinators and US agriculture: trend analysis of aggregate data for the period 1992-2009. PloS One 7, e37235.

Dai, P., Jack, C.J., Mortensen, A.N., Bustamante, T.A., Ellis, J.D., 2018. Chronic toxicity of amitraz, coumaphos and fluvalinate to Apis mellifera L. larvae reared in vitro. Sci. Rep. 8, 5635.
Fischer, B., Larson, B.M.H., Didham, R., Gilbert, F., 2019. Collecting insects to conserve them: a call for ethical caution. Insect Conserv. Divers. 12, 173–182.
Flores, J.M., Gil-Lebrero, S., Gamiz, V., Rodriguez, M.I., Ortiz, M.A., Quiles, F.J., 2019. Effect of the climate change on honey bee colonies in a temperate Mediterranean zone assessed through remote hive weight monitoring system in conjunction with exhaustive colonies assessment. Sci. Total Environ. 653, 1111–1119.
Free, J.B., 2009. The drifting of honey-bees. J. Agric. Sci. 51, 294–306.
Gashout, H.A., Goodwin, P.H., Guzman-Novoa, E., 2018. Lethality of synthetic and natural acaricides to worker honey bees (Apis mellifera) and their impact on the expression of health and detoxification-related genes. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 25, 34730–34739.
Generscch, E., 2010. Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 87–97.
Goulson, D., Nicholls, E., Botias, C., Rotheray, E.L., 2015. Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. Science 347, 1255957.
Gregorc, A., Alburaki, M., Sampson, B., Knight, P.R., Adamczyk, J., 2018. Toxicity of selected Acaricides to honey bees (Apis mellifera) and varroa (varroa destructor anderson and trueman) and their use in controlling varroa within honey bee colonies. Insects 9.
Heitmann, K., Wichmann, H., Bahadir, M., Gunschera, J., Schulz, N., Salthammer, T., 2011. Chemical composition of burnt smell caused by accidental fires: environmental contaminants. Chemosphere 82, 237–243.
Hernando, M.D., Gamiz, V., Gil-Lebrero, S., Rodriguez, I., Garcia-Valcarcel, A.I., Cutillas, V., Fernandez-Alba, A.R., Flores, J.M., 2018. Viability of honeybee colonies exposed to sunflowers grown from seeds treated with the neonicotinoids thiamethoxam and clothianidin. Chemosphere 202, 609–617.
Jay, S.C., 2015. Drifting of honeybees in commercial apiaries 1. Effect of various environmental factors. J. Apicult. Res. 4, 167–175.
Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M., 2010. Pesticides and honey bee toxicity – USA. Apidologie 41, 312–331.
Johnson, R.M., Dahlgren, L., Siegfried, B.D., Ellis, M.D., 2013. Acaricide, fungicide and drug interactions in honey bees (Apis mellifera). PloS One 8, e54092.
Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T., 2006. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. Proc. Biol. Sci. 274, 303–313.
Klein, A.M., Boreux, V., Fornoff, F., Mupepele, A.C., Pufal, G., 2018. Relevance of wild and managed bees for human well-being. Curr. Opin. Insect Sci. 26, 82–88.
Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W., 2010. Varroamites and honey bee health: canVarroaexplain part of the colony losses? Apidologie 41, 353–363.
Lim, S., Yunusbaev, U., Ilyasov, R., Lee, H.S., Kwon, H.W., 2020. Abdominal contact of fluvalinate induces olfactory deficit in Apis mellifera. Pestic. Biochem. Physiol. 164, 221–227.
Lozano, A., Hernando, M.D., Ucles, S., Hakme, E., Fernandez-Alba, A.R., 2019. Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. Food Chem. 274, 61–70.
Lydy, M.J., Harwood, A.D., Nutile, S.A., Landrum, P.F., 2015. Tenax extraction of sediments to estimate desorption and bioavailability of hydrophobic contaminants: a literature review. Integrated Environ. Assess. Manag. 11, 208–220.
Murcia Morales, M., Gomez Ramos, M.J., Parrilla Vazquez, P., Diaz Galiano, F.J., Garcia Valverde, M., Gamiz Lopez, V., Manuel Flores, J., Fernandez-Alba, A.R., 2020a. Distribution of chemical residues in the beehive compartments and their transfer to the honeybee brood. Sci. Total Environ. 710, 136288.
Murcia-Morales, M., Van der Steen, J.J.M., Vejsnaes, F., Diaz-Galiano, F.J., Flores, J.M., Fernandez-Alba, A.R., 2020b. APIStrip, a new tool for environmental contaminant sampling through honeybee colonies. Sci. Total Environ. 729, 138948.
Neumann, P., Moritz, R.F.A., Mautz, D., 2000. Colony evaluation is not affected by drifting of drone and worker honeybees (Apis mellifera L.) at a performance testing apiary. Apidologie 31, 67–79.
Patil, S.F., Lonkar, S.T., 1994. Determination of benzene, aniline and nitrobenzene in workplace air: a comparison of active and passive sampling. J. Chromatogr. A 688, 189–199.
Pfeiffer, K.J., Crailsheim, K., 1998. Drifting of honeybees. Insectes Sociaux 45, 151–167.
Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E., 2010. Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol. Evol. 25, 345–353.
Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B., 2010. Biology and control of Varroa destructor. J. Invertebr. Pathol. 103 (Suppl. 1), S96–S119.
Sanchez-Bayo, F., Goka, K., 2014. Pesticide residues and bees–a risk assessment. PloS One 9, e94482.
Sanchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., Desneux, N., 2016. Are bee diseases linked to pesticides? - a brief review. Environ. Int. 89–90, 7–11.
Serra-Bonvehi, J., Orantes-Bermejo, J., 2010. Acaricides and their residues in Spanish commercial beeswax. Pest Manag. Sci. 66, 1230–1235.
Smith, K.M., Loh, E.H., Rostal, M.K., Zambrana-Torrelio, C.M., Mendiola, L., Daszak, P., 2013. Pathogens, pests, and economics: drivers of honey bee colony declines and losses. EcoHealth 10, 434–445.
Van Den Houwe, K., Evrard, C., Van Loco, J., Lynen, F., Van Hoeck, E., 2017. Use of Tenax(R) films to demonstrate the migration of chemical contaminants from cardboard into dry food. Food Addit. Contam. Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 34, 1261–1269.
Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S., 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (Apis mellifera) development and longevity. PloS One 6, e14720.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado una metodología analítica para estudiar el estado del arte del muestreo de matrices apícolas en el marco de monitorizaciones ambientales, así como para desarrollar una nueva estrategia basada en muestreo pasivo que reduzca el impacto humano en las colonias. En base a los resultados obtenidos en los estudios experimentales llevados a cabo, destacan las siguientes conclusiones:

- Los residuos de plaguicidas y tratamientos veterinarios migran a diferentes compartimentos dentro de la colmena atendiendo a sus propiedades fisicoquímicas. Estas sustancias pueden incluso alcanzar a las abejas en estado larvario, ya sea por contacto directo con la cera o a través de la dieta.

- La toma continuada de muestras apícolas impacta seriamente en la viabilidad de la colonia y dificulta la realización de monitorizaciones prolongadas en una misma colmena. Estas monitorizaciones están asimismo sujetas a la disponibilidad de matrices en el momento del muestreo, así como a una falta de homogeneidad en los resultados.

- Se ha desarrollado un muestreador pasivo de contaminantes ambientales, la APIStrip, basada en el adsorbente Tenax® y que proporciona una imagen representativa de los plaguicidas y miticidas acumulados en el interior de la colmena. Este dispositivo evita la necesidad de tomar muestras apícolas, facilitando los muestreos y minimizando las alteraciones producidas en la colonia a la vez que mejora y amplifica los resultados.

- Los contaminantes adsorbidos sobre la APIStrip pueden ser fácilmente extraídos mediante agitación en presencia de disolventes orgánicos y posteriormente analizados mediante espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas.

- La aplicación de 180 APIStrips en un muestreo a gran escala en nueve apiarios distribuidos en Dinamarca reveló la presencia de 75 residuos de plaguicidas diferentes. Se hallaron importantes diferencias en función de la localización geográfica, pero algunas sustancias fueron detectadas con frecuencia en un gran número de apiarios. Esto revela una presencia muy extendida en el medioambiente y, con ello, la existencia de lagunas en la legislación para el uso sostenible de plaguicidas en la Unión Europea.

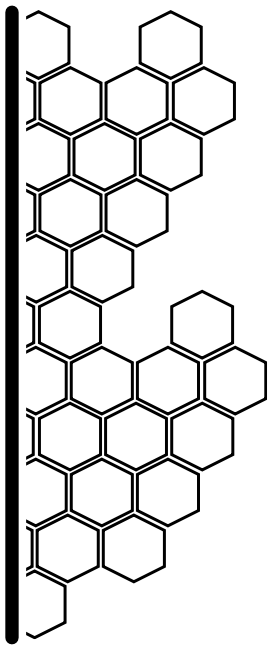
- Las APIStrips han permitido además estudiar la disipación de miticidas empleados en apicultura, determinándose el impacto de la formulación utilizada y el efecto de la polaridad en la persistencia de los mismos dentro de la colmena. Se han detectado además fenómenos de contaminación cruzada de estas sustancias hacia colmenas en las que no se habían aplicado tratamientos veterinarios. No se ha encontrado una relación entre la proximidad de las colmenas y la intensidad de la contaminación cruzada, lo que indica que el principal mecanismo de este fenómeno podría estar más relacionado con las propias abejas que con factores ambientales.

CONCLUSIONS

In this Doctoral Thesis, an analytical methodology has been applied to study the state-of-the-art of sampling bee matrices in the framework of environmental monitoring, as well as to develop a new strategy based on passive sampling that reduces the human impact on the colonies. Based on the results obtained in the experimental studies, the following conclusions can be drawn:

- Residues of pesticides and veterinary treatments migrate to different compartments within the beehive according to their physicochemical properties. These substances can even reach bees in the larval stage, either by direct contact with the wax or through the diet.
- Continuous samplings have a serious impact on the viability of the colony and make it difficult to perform prolonged monitoring studies in the same hive. Such studies are also subjected to the availability of matrices at the time of sampling, as well as to a lack of homogeneity in the results.
- A passive sampler of environmental contaminants, the APIStrip, has been developed based on the Tenax® adsorbent. It provides a representative image of the pesticides and miticides accumulated inside the hive, while avoiding the need to take bee samples, facilitating the sampling, minimizing the alterations produced in the colony and improving and amplifying the results.
- Contaminants captured in the APIStrip can be easily extracted by agitation in the presence of organic solvents and subsequently analyzed by mass spectrometry coupled to chromatographic techniques.
- The application of 180 APIStrips in a large-scale sampling in nine apiaries distributed throughout Denmark revealed the presence of 75 different pesticide residues in the environment. Significant differences were found according to geographical location, but some substances were frequently detected in a large number of apiaries. This reveals a widespread presence in the environment and, thus, the existence of gaps in the legislation for the sustainable use of pesticides in the European Union.
- The APIStrips have also made it possible to study the dissipation of miticides used in beekeeping, by determining the impact of the formulation used and the effect of polarity on their persistence in the hive. In addition, cross-contamination of these substances to hives where veterinary treatments had not been applied was detected and evaluated. No relationship was found between the proximity of the hives and the intensity of cross-contamination, which indicates that the driving force behind this phenomenon could be more related to the bees themselves than to environmental factors.

ANEXOS



ANEXO 1. LISTADO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

- ADI Ingesta diaria admisible
- ADN Ácido desoxirribonucleico
- APIStrip *Adsorb Pesticides In-hive Strip*
- ARfD Dosis de referencia aguda
- CCD *Colony Collapse Disorder*
- CE Comisión Europea
- CI Ionización química
- DDT Dicloro difenil tricloroetano
- DMF 2,4-dimetilformamidina
- DMPF *N*-(2,4-dimetilfenil)-*N'*-metilformamidina
- dSPE Extracción dispersiva en fase sólida
- ECD Detector de captura de electrones
- EE. UU. Estados Unidos
- EFSA *European Food Safety Authority*
- EI Impacto electrónico
- EMR *Enhanced matrix removal*
- ESI Ionización por *electrospray*
- GC Cromatografía de gases
- HILIC Cromatografía de interacción hidrofílica
- HRMS Espectrometría de masas de alta resolución
- IUPAC *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- LC Cromatografía de líquidos
- LD50 Dosis letal media
- LMR Límite máximo de residuos
- MERCOSUR Mercado Común del Sur
- MRM *Multiple reaction monitoring*
- MS Espectrometría de masas
- MS/MS Espectrometría de masas en tándem
- NIST *National Institute of Standards and Technology*
- NPD Detector de nitrógeno-fósforo
- OMS Organización Mundial de la Salud
- PAH Hidrocarburo policíclico aromático
- PCB Bifenilo policlorado
- PM Materia particulada
- PSA Amina primaria secundaria
- QqQ Triple cuadrupolo
- QuEChERS *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*
- RP-HLPC Cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase reversa
- SFC Cromatografía de fluidos supercríticos
- SMR *Single reaction monitoring*
- ToF Tiempo de vuelo
- UE Unión Europea
- VOC Compuesto orgánico volátil

ANEXO 2. PLAGUICIDAS MENCIONADOS EN LA TESIS

Aunque la presente Tesis está redactada en español, el nombre de los plaguicidas se ha mantenido en inglés por ser el idioma más empleado para referirse a ellos en el lenguaje de uso común en este campo científico. Asimismo, no se ha empleado la cursiva en sus nombres para facilitar la legibilidad del documento. En su lugar, en el presente Anexo se incluye el nombre en ambos idiomas de todos los residuos de plaguicidas que aparecen mencionados en la Tesis, junto con su número CAS y su actividad.

Nombre (inglés)	Nombre (español)	Número CAS	Actividad
Acetamiprid	Acetamiprid	135410-20-7	Insecticida
Aclonifen	Aclonifen	74070-46-5	Herbicida
Acrinathrin	Acrinatrina	101007-06-1	Insecticida, acaricida
Alachlor	Alacloro	15972-60-8	Herbicida
Amitraz	Amitraz	33089-61-1	Insecticida, acaricida
Atrazine	Atrazina	1912-24-9	Herbicida
Azoxystrobin	Azoxistrobina	131860-33-8	Fungicida
Benomyl	Benomilo	17804-35-2	Fungicida, acaricida
Bifenazate	Bifenazato	149877-41-8	Insecicida, acaricida
Bifenox	Bifenox	42576-02-3	Herbicida
Bifenthrin	Bifentrin	82657-04-3	Insecticida, acaricida
Boscalid	Boscalida	188425-85-6	Fungicida
Bromopropylate	Bromopropilato	18181-80-1	Acaricida
Cadusafos	Cadusafos	95465-99-9	Insecticida, nematicida
Captan	Captan	133-06-2	Fungicida, bactericida
Carbaryl	Carbarilo	63-25-2	Insecticida, regulador de crecimiento de plantas
Carbendazim	Carbendazima	10605-21-7	Fungicida, metabolito
Carbofuran	Carbofurano	1563-66-2	Insecticida, nematicida, acaricida, metabolito
Chlorfenvinphos	Clorfenvinfos	470-90-6	Insecticida, acaricida
Chlorothalonil	Clorotalonil	1897-45-6	Fungicida
Chlorpyrifos	Clorpirifós	2921-88-2	Insecticida
Chlorpyrifos-methyl	Metil clorpirifós	5598-13-0	Insecticida, acaricida
Clothianidin	Clotianidina	210880-92-5	Insecticida, metabolito
Coumaphos	Cumafós	56-72-4	Insecticida, acaricida, antihelmíntico
Cyhalothrin	Cihalotrina	68085-85-8	Insecticida, acaricida
Cypermethrin	Cipermetrina	52315-07-8	Insecticida, acaricida
Cyproconazole	Ciproconazol	94361-06-5	Fungicida

Nombre (inglés)	Nombre (español)	Número CAS	Actividad *Cont.*
Cyprodinil	Ciprodinil	121552-61-2	Fungicida
DDT	DDT	50-29-3	Insecticida, acaricida
DEET	DEET	134-62-3	Repelente
Deltamethrin	Deltametrina	52918-63-5	Insecticida, metabolito
Diazinon	Diazinón	333-41-5	Insecticida, acaricida, repelente
Dichlorvos	Diclorvos	62-73-7	Insecticida, acaricida, metabolito
Difenoconazole	Difenoconazol	119446-68-3	Fungicida
Dimethoate	Dimetoato	60-51-5	Insecticida, acaricida, metabolito
Dimethomorph	Dimetomorf	110488-70-5	Fungicida
Dimoxystrobin	Dimoxistrobina	149961-52-4	Fungicida
DMA	DMA	95-68-1	Metabolito
DMF	DMF	68-12-2	Metabolito
DMPF	DMPF	33089-74-6	Metabolito
Fenoxycarb	Fenoxicarb	79127-80-3	Insecticida
Fenpyroximate	Fenpiroximato	134098-61-6	Insecticida, acaricida
Fipronil	Fipronil	120068-37-3	Insecticida
Fludioxonil	Fludioxonil	131341-86-1	Fungicida
Flumethrin	Flumetrina	69770-45-2	Insecticida, acaricida
Folpet	Folpet	133-07-3	Fungicida
Glyphosate	Glifosato	1071-83-6	Herbicida
Heptachlor	Heptacloro	76-44-8	Insecticida
Hexythiazox	Hexitiazox	78587-05-0	Insecticida, acaricida
Imidacloprid	Imidacloprid	138261-41-3	Insecticida
Indoxacarb	Indoxacarb	173584-44-6	Insecticida
Iprodione	Iprodiona	36734-19-7	Fungicida
Isoxaflutole	Isoxaflutol	141112-29-0	Herbicida
Lambda-cyhalo-thrin	Lambda cihalotrina	91465-08-6	Insecticida
Lindane	Lindano	58-89-9	Insecticida, acaricida, rodenticida
Malaoxon	Malaoxón	1634-78-2	Metabolito
Malathion	Malatión	121-75-5	Insecticida, acaricida
Metalaxyl	Metalaxil	57837-19-1	Fungicida
Metolachlor	Metolacloro	51218-45-2	Herbicida
Myclobutanil	Miclobutanil	88671-89-0	Fungicida
Oxytetracycline	Oxitetraciclina	79-57-2	Bactericida
Parathion	Paratión	56-38-2	Insecticida, acaricida
Parathion-methyl	Metil paratión	298-00-0	Insecticida
Penconazole	Penconazol	66246-88-6	Fungicida
Pendimethalin	Pendimetalina	40487-42-1	Herbicida
Permethrin	Permetrina	52645-53-1	Insecticida

Nombre (inglés)	Nombre (español)	Número CAS	Actividad *Cont.*
Phorate	Forato	298-02-2	Insecticida, acaricida, nematicida
Phosmet	Fosmet	732-11-6	Insecticida, acaricida
Phthalimide	Ftalimida	85-41-6	Metabolito
Piperonyl butoxide	Butóxido de piperonilo	51-03-6	Compuesto sinérgico
Propamocarb	Propamocarb	24579-73-5	Fungicida
Propargite	Propargita	2312-35-8	Insecticida, acaricida
Propiconazole	Propiconazol	60207-90-1	Fungicida
Pyraclostrobin	Piraclostrobina	175013-18-0	Fungicida
Pyridaben	Piridaben	96489-71-3	Insecticida, acaricida
Pyrimethanil	Pirimetanil	53112-28-0	Fungicida
Pyriproxyfen	Piriproxifen	95737-68-1	Insecticida
Quinoxyfen	Quinoxifen	124495-18-7	Fungicida
Spiroxamine	Espiroxamina	118134-30-8	Fungicida
Sulfoxaflor	Sulfoxaflor	946578-00-3	Insecticida
Tau-fluvalinate	Tau-fluvalinato	102851-06-9	Insecticida, acaricida
Tebuconazole	Tebuconazol	107534-96-3	Fungicida, regulador de crecimiento de plantas
Terbufos	Terbufos	13071-79-9	Insecticida, nematicida
Terbuthylazine	Terbutilazina	5915-41-3	Herbicida, microbiocida
Tetrahydrophthalimide	Tetrahidroftalimida	85-40-5	Metabolito
Thiacloprid	Tiacloprid	111988-49-9	Insecticida, molusquicida
Thiamethoxam	Tiametoxam	153719-23-4	Insecticida
Thiophanate-methyl	Metil tiofanato	23564-05-8	Fungicida
Thymol	Timol	89-83-8	Insecticida, acaricida, fungicida, antiséptico
Trifloxystrobin	Trifloxistrobina	141517-21-7	Fungicida

ANEXO 3. FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Evolución entre 1990 y 2020 del uso de plaguicidas a nivel global, europeo y español. **Página 17**

Figura 2. Tiempos de retención en función de la polaridad y la volatilidad en un método de cromatografía de líquidos (219 analitos) y de gases (228 analitos), respectivamente **Página 22**

Figura 3. Estructura, clasificación y propiedades de cinco plaguicidas incluidos en un método multirresiduo de cromatografía de gases (*izquierda*) o de líquidos (*derecha*) **Página 24**

Figura 4. a) Fragmentación del plaguicida boscalid para dar las transiciones 343.0 – 307.1 (LC-MS/MS, fuente ESI) y 140.0 – 112.0 (GC-MS/MS, fuente EI); b) Cromatogramas mostrando la identificación de boscalid en LC-MS/MS (*superior*) y GC-MS/MS (*inferior*) mediante dos transiciones cuya ratio se encuentra en un rango determinado (*líneas discontinuas*) **Página 27**

Figura 5. *Izquierda*: fotografía de un grano de polen de la especie *Tragopogon porrifolius L.* (comúnmente polinizada por abejas melíferas), adquirida mediante microscopía electrónica de barrido de alta resolución de emisión de campo; cedida por Marina del Álamo Montes (Centro de Colecciones de la Universidad de Almería). *Derecha*: flor de *Tragopogon porrifolius L.* **Página 31**

Figura 6. Distribución de las matrices analizadas en los 50 estudios incluidos en la Tabla 1 **Página 34**

Figura 7. Estructura del plaguicida amitraz y de sus principales productos de transformación **Página 39**

Figura 8. Porcentaje de muestras positivas (*izquierda*) y niveles de concentración promedio (*derecha*) en cada matriz de los principales plaguicidas detectados **Página 41**

Figura 9. Número de artículos que reportan cada compuesto como el más frecuentemente detectado. *Amitraz expresado como la suma del precursor, DMF y DMPF **Página 45**

Figura 10. Principales países de los que España importa *(violeta)* y a los que exporta *(verde)* miel **Página 48**

Figura 11. Distribución de 932 sustancias activas en función de su toxicidad según la clasificación de la OMS **Página 48**

Figura 12. Partículas de Tenax a escala macroscópica y microscópica (imágenes microscópicas adquiridas mediante Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución de Emisión de Campo) junto a su fórmula química **Página 53**

TABLAS

Tabla 1. Características principales de 50 programas de monitorización de plaguicidas en colmenas de abejas **Página 32**

Tabla 2. Principales plaguicidas detectados en monitorizaciones realizadas durante el periodo 2011-2022 **Página 40**

Tabla 3. LMR en miel de los plaguicidas detectados con mayor frecuencia a lo largo de los últimos años (mg/kg) **Página 47**