

## FARMACODINAMICA ACIDULUI OXALIC ÎN COLONIA DE ALBINE MELIFERE

A. NANETTI<sup>3</sup>, P. BARTOLOMEI<sup>1</sup>, Stefania BELLATO<sup>2</sup>, Maria De SALVIO<sup>2</sup>, E. GATTAVECCHIA<sup>2</sup>, R. GHINI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> E.N.E.A. – U.F.I.S. sede di Montecuccolino, Bologna, ITALIA, E-mail: istnapic@inapicoltura.org

<sup>2</sup> U.C.I. Scienze Chimiche Radiochimiche e Metallurgiche, Facoltà di Farmacia, Università di Bologna, ITALIA  
Tel.: +39 051 353103, E-mail: istnapic@inapicoltura.org

<sup>3</sup> Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna, ITALIA, E-mail: istnapic@inapicoltura.org and ghini@biocfarm.unibo.it

### Rezumat

Farmacodinamica acidului oxalic (AO) administrat prin picurare a fost examinată cu ajutorul metodelor radiochimice. Un sirop de zahăr, conținând AO marcat cu <sup>14</sup>C, a fost picurat într-o colonie, potrivit dozei și tehnicii utilizate în general în practica apicolă. În primele patru zile, contaminarea albinelor adulte a atins 118 μg, dar a scăzut la mai puțin de 1/10 respectiv 1/60 la una respectiv două săptămâni după tratament. Pe parcursul lunilor următoare a fost înregistrată o nouă scădere. Niveluri considerabil mai joase au fost măsurate la puietul în vârstă de 8-9 zile, care, în mod asemănător, a fost contaminat numai temporar. Radiografiile au scos în evidență prezența AO în organele abdominale interne ale albinelor adulte.

În mierea proaspăt recoltată, creșterea OA a fost de 0,6 mg/kg sau mai puțin. Aceasta reprezintă numai o fracție mică din conținutul natural de AO al mierii. Markerul radioactiv a fost găsit și în ceara adunată din fagurii recent clădiți, dar nu este clar dacă se datora unei contaminări directe datorită reacțiilor chimice între AO liber și ceară, sau datorită prezenței metaboliților produși de albine din AO absorbit.

Într-un al doilea experiment cu aceeași metodă de administrare, au fost luate în considerare și alte matrice. Markerul radioactiv a fost prezent atât în hemolimfa albinei adulte cât și în mostrele de CO<sub>2</sub> prelevate din colonie. Acest fapt pare să confirme ipoteza metabolizării AO de către albine.

**Cuvinte cheie:** Varroa / reziduuri / acid oxalic / distribuție

### Introducere

Picurarea unei soluții de zahăr, la care s-a adăugat acid oxalic, în coloniile de albine (NANETTI și STRADI, 1997) este o metodă de combatere a varroozei răspândită în multe țări europene. Au fost efectuate numeroase experimente pentru verificarea eficienței și tolerabilității acestei metode în condiții tehnice și de mediu diferite, adeseori ducând la metodologii locale (NANETTI, 2002).

Totuși, cunoștințele noastre despre substanța activă sunt departe de a fi complete, mai ales, în ceea ce privește efectul acidului oxalic în interiorul coloniilor de albine și asupra albinelor individuale. Și tocmai înțelegerea acestui fenomen, pe lângă interesul pur academic, este crucial pentru înțelegerea efectelor negative ale tratamentului și pentru îmbunătățirea metodelor de aplicare. Puținele date disponibile privind reziduurile din miere indică, de obicei, un risc redus în ce privește autenticitatea mierii după tratament cu acid oxalic (MUTINELLI et al., 1997; DEL NOZAL, et al., 2000; BERNARDINI, și GARDI, 2001; BOGDANOV et al., 2002; NANETTI, et al., 2002). Tehnicile de analiză adoptate de obicei nu pot să deosebească între contaminarea cu acid oxalic de cel care există în mod natural în miere, fapt care depinde, în mare măsură de originea botanică a mierii (MUTINELLI et al., 1997; NANETTI et al., 2002).

Lucrarea de față constituie o contribuție la aceste cunoștințe. Pentru depășirea problemei pe care o reprezintă prezența naturală a acestei substanțe în diferite matrice ale coloniei de albine, s-a studiat distribuția acidului oxalic prin administrarea de soluții titrate cu C<sub>14</sub> și prin alte analize radiochimice.

### Material și metode

Experimentul a constatat din două replicări, efectuate în sezonul de vară din anii 1999 și 2002, în apropierea orașului Bologna (Italia) în timpul recoltării de miere. A fost utilizată pe an câte o colonie adăpostită într-un stup DB. În ambele colonii, albinele ocupau toți cei zece faguri disponibili, dintre care 6-7 conțineau puiet.

În 19 iulie 1999 respectiv 28 iulie 2002, coloniile au fost tratate cu acid oxalic conform metodei menționate mai sus, a picurării. Au fost utilizate 50 respectiv 41 ml de soluție apoasă, care conținea 4,2% acid oxalic și 60% zahăr (greutate/volum), administrat cu ajutorul unei seringi. La soluții s-a adăugat, în prealabil, acid oxalic cu C<sub>14</sub> (Sigma N.31, 391-2), în cantități corespunzând cu 12,1 MBq și 7,4 MBq.

În cazul ambelor replicare, au fost prelevate mostre pre-tratament din matricele de mai jos. Mostrele post-tratament au fost, inițial, prelevate o dată (1999) sau de două ori pe zi (7 AM și 8 PM în 2002), dar, mai târziu, ele au fost prelevate la intervale mai îndelungate.

În 1999 au fost luate în considerare următoarele matrice:

- albine melifere adulte de pe fagurii laterali;
- puiet în vârstă de 8-9 zile;

- miere necăpăcită;
- ceară, din pereții celulelor nou clădite (s-a folosit un fagure artificial).

În 2002, au fost prelevate mostre de:

- albine melifere adulte de pe fagurii laterali;
- CO<sub>2</sub> din aerul din interiorul coloniei;
- ceară din fagurii nou clădiți;
- miere proaspătă, depozitată în faguri noi.

Cu ajutorul pipetelor capilare Pasteur (FLURI et al., 1981) au fost prelevate în tuburi Eppendorf mostre de hemolimfă toracică de la albine colectate în vara lui 2002. Aripile anterioare ale fiecărei albine au fost tăiate și fixate pe portlamele, cu fața exterioară în sus, lăsându-le pe cele din dreapta așa cum erau și spălându-le pe cele din stânga cu apă distilată din abundență.

Intestinele altor albine au fost extrase, extrăgând acul cu grijă cu ajutorul unei pensete. Ulterior, acestea au fost montate pe portlamele și depozitate până la utilizare la cca. 40°C, pentru a obține o uscare înceată.

Pentru ca matca să aibă mai mult spațiu pentru pontă, în 2002 în ziua a 5-a a experimentului un fagure de miere lateral a fost înlăturat și înlocuit cu unul gol. Înaintea tratamentului, numai partea superioară a fagurelui înlocuit fusese umplută cu miere. După aceea, el a fost completat treptat, până către centru, unde, în momentul înlăturării mai rămăsese o zonă de celule de miere necăpăcite.

Pentru colectarea de mostre de CO<sub>2</sub> din colonie, s-a montat un tub de plastic, al cărui capăt extern era astupat cu un dop, iar celălalt capăt se afla în mijlocul cuibului de puieț. Au fost luate măsuri de precauție pentru a evita intrarea accidentală a albinelor și a picăturilor de soluție în tub. Patru litri de aer extrași prin dopul exterior au fost lăsați să barboteze lent într-un alt tub care conținea 5 ml de hidroxid de hiamină 10-X (1 M în metanol; catalog Packard nr. 6003005).

Toate mostrele cu excepția aripilor, intestinelor și a fagurilor de miere au fost congelate (la cca. -25°C), până în momentul analizei.

Au fost făcute auto-radiografii ale aripilor spălate și nespălate, ale intestinelor uscate și fagurilor de miere înlăturați în ziua a 5-a. Expunerea a durat 33 respectiv 23 de zile pentru primele trei matrice respectiv faguri. Pentru a intensifica aderența la film, fagurele a fost culcat pe una din laturile sale. Scurgerea de miere a fost evitată prin efectuarea auto-radiografiei la cca. -25°C. Mostrele au fost învelite cu o peliculă de politen (cca. 10 μm), pentru a se evita contactul direct cu emulsia fotosensibilă. Au fost utilizate filme Kodak Biomax MR1, care au fost prelucrate potrivit indicațiilor producătorului.

#### *Măsurarea radioactivității (instrumente și pregătirea mostrelor)*

Toate măsurătorile radioactivității au fost efectuate prin scintilație lichidă (LSC) într-un contor Quantulus 1220 (LKB, Suedia). S-au utilizat fiole de polietilenă de 20 ml, acoperite de teflon. S-a folosit un amestec de scintilație Ultima Gold (Packard Canberra, SUA).

Cinci albine liofilizate au fost exact cântărite, măcinate și suspendate într-un anumit volum de acid oxalic rece. Suspensia a fost supusă undelor sonore timp de 10 min., încălzită la 70-80°C și centrifugată. Un mililitru de supernatant a fost adăugat la 18 ml de amestec scintilant, care se afla într-o fiolă de 20 ml.

O alicotă de miere, (cca. 0,2 g), a fost măsurată exact, într-o fiolă de scintilație, fiind apoi diluată cu apă (cca. 1 ml) și adăugată la 18 ml amestec de scintilație.

Cca. 0,1 g (măsurat exact) de ceară a fost dizolvat în 25 ml ciclohexan și supus unui tratament cu unde sonore. Un mililitru din soluție a fost adăugat la 18 ml amestec de scintilație într-o fiolă de 20 ml.

O mostră exact măsurată de puieț în vârstă de 8-9 zile a fost suspendată în 5 ml acid oxalic rece, tratată cu unde sonore timp de 10 min., încălzită timp de 10 min. la 60°C și centrifugată. Trei picături de acid tricloracetic au fost adăugate pentru limpezirea soluției. După o a doua centrifugare, 1 ml de supernatant a fost adăugat la 18 ml amestec de scintilație într-o fiolă de 20 ml.

O mostră cântărită de polen a fost suspendată în 5 ml acid oxalic rece, tratată cu unde sonore timp de 10 min., încălzită timp de alte 10 min. la 80°C și centrifugată. Supernatantul a fost filtrat printr-un microfiltru de 0,1 μm. Un mililitru din soluția rezultată a fost adăugat la 18 ml amestec de scintilație într-o fiolă de 20 ml.

O cantitate de 1 ml hidroxid de hiamină 10-X, colectată din capcana de CO<sub>2</sub> mai sus descrisă, a fost adăugată la 18 ml amestec de scintilație într-o fiolă de 20 ml.

Hemolimfa a fost cântărită exact și transferată complet, în cantități succesive de amestec de scintilație până la atingerea unui volum total de 3 ml. Transferul s-a efectuat într-o fiolă de 20 ml, care conținea 16 ml de amestec de scintilație.

## Cromatografie TLC a cerii

O mostră de ceară, colectată în momentul maxim al radioactivității, a fost dizolvată în ciclohexan și analizată prin TLC (silicagel, Merck). După eluare cu acetat de etil, a fost stabilită distribuția radioactivității cu ajutorul unui radioscaner (scanner linear TLC, Berthold, Germania).

## Rezultate și discuții

### Albine melifere adulte și puietul

Figura 1 ilustrează că în 24 de ore după tratamentul din 1999 a fost detectată o contaminare remarcabilă a albinelor adulte. O zi mai târziu, vârful a atins un maxim de 118  $\mu\text{g/g}$ , în schimb în zilele a 7-a și a 11-a, au avut loc scăderi remarcabile când au fost identificate conținuturi de 10,8 respectiv 2,0  $\mu\text{g/g}$ . Dacă greutatea medie a unei albine (cca. 100 mg) este luată ca termen de referință, contaminarea cu acid oxalic s-a situat în jur de 12  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  respectiv 0,2  $\mu\text{g}$ . Alte scăderi treptate au intervenit în cursul lunilor următoare.

Figure 1. Contaminating oxalic acid in adult honey bees and in 8-9 day old brood.

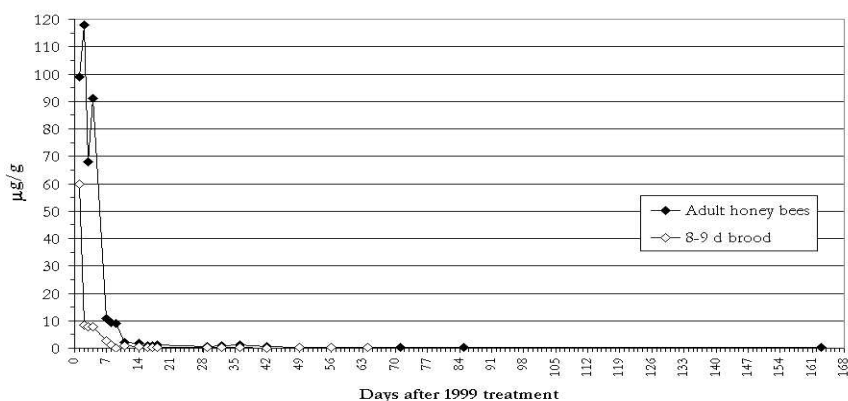


Figura 1 - Contaminarea cu acid oxalic la albinele adulte și puietul de 8-9 zile

-◆- albine adulte; -◇- puiet de 8-9 zile

O contaminare mai redusă a fost constatată la larvele mai în vârstă necăpăcite, valoarea maximă fiind de 60  $\mu\text{g/g}$ . Ca și la albinele adulte, vârful a fost înregistrat la 24 de ore după tratament. Totuși, scăderea a început mult mai devreme, dacă o comparăm cu cea a albinelor, stabilizându-se la niveluri mai joase.

În cel de-al doilea replicat a putut fi demonstrată prezența acidului oxalic  $\text{C}_{14}$  în hemolimfa albinelor melifere. Valoarea cea mai ridicată (10 ng/mg) a fost înregistrată la 12 ore după tratament, însă, ulterior a intervenit o scădere bruscă de până la o concentrație de 1,1 ng/mg în cea de-a 84-a oră. Radioactivitatea a dispărut aproape complet la aproximativ o lună după tratament (Figura 2).

Mici diferențe, dacă au existat, au fost evidențiate în auto-radiografiile aripilor nespălate și ale aripilor din care acidul oxalic a fost înlăturat printr-o spălare riguroasă. Ambele categorii au lăsat pe film urme clare ale nervaturilor lor. Acest fapt indică o contaminare exterioară scăzută a albinelor și o contaminare cu acid oxalic a hemolimfei care umple nervaturile aripilor.

Ipoteza metabolizării acidului oxalic de către albine este susținută de detectarea de  $\text{CO}_2$  radioactiv în aerul prelevat din interiorul coloniei (Fig. 2), al cărui vârf de concentrație a fost mai întârziat în comparație cu cel înregistrat pentru hemolimfă. A avut loc o scădere bruscă, de ciclicitate zilnică, cu vârfuri pozitive la aerul prelevat seara și reduse la cel de dimineață devreme. Deși nu există nici o explicație certă pentru acest fenomen, s-ar putea ca nivelul diferit de activitate a coloniei ziua și noaptea să fi avut vreo influență.

Figure 2. Contaminating oxalic acid in honey bee haemolymph (left) and in CO<sub>2</sub> (right).

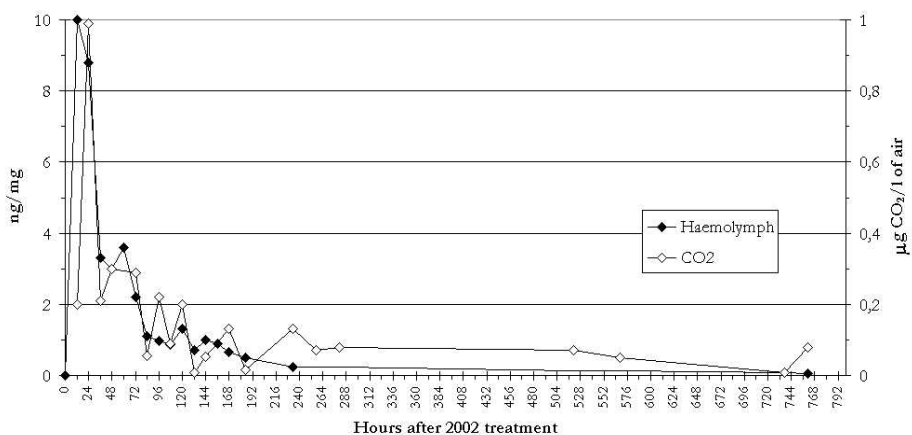


Figura 2 - Contaminarea cu acid oxalic în hemolimfa albinelor (stânga) și în CO<sub>2</sub> (dreapta)  
 -◆- hemolimfă; -◇- CO<sub>2</sub>

Figura 3 reprezintă distribuția radioactivității de-a lungul intestinelor albinelor. La 12 ore după tratament tot tractul, între gusa de miere și rect, a evidențiat prezența marcatorului, dar ulterior prezența marcatorului radioactiv a fost depistată doar ocazional în interiorul gusei de miere. În general, contaminarea s-a redus în timp; intestinalele prelevate în zilele a 22-a și a 31-a nu erau contaminate cu cantități detectabile.

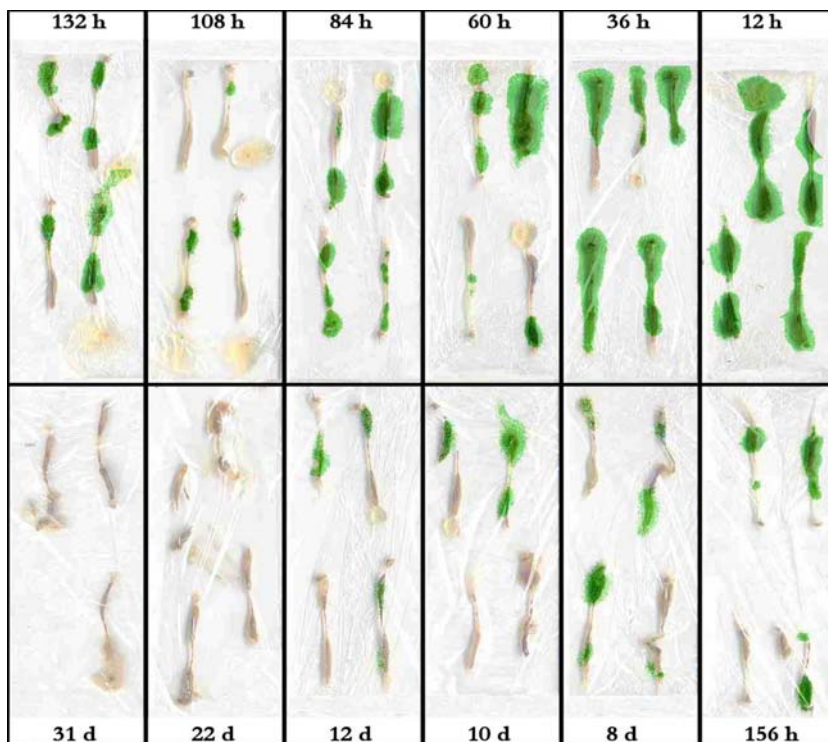
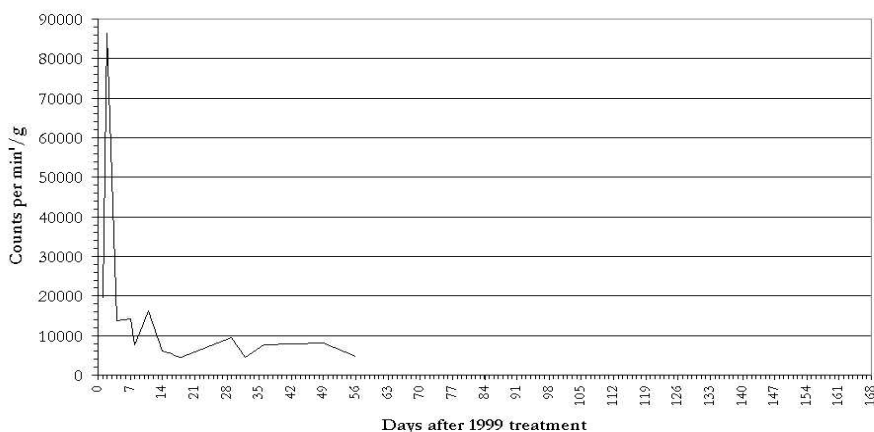


Figura 3 - Radioactivitatea în intestinalele albinelor melifere (zonele colorate)

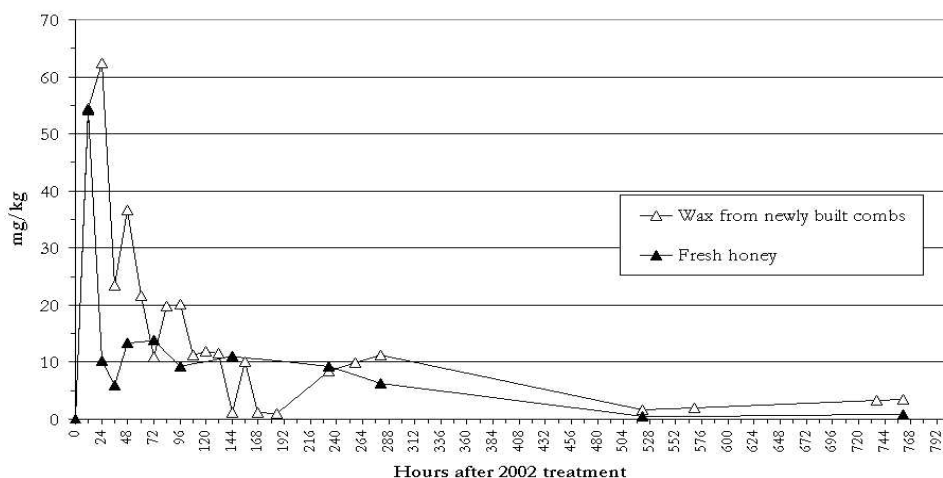
## Ceara și fagurii

Figura 4 reprezintă radioactivitatea  $\mu$  detectată în mostrele de ceară din 1999. În comparație cu albinele adulte și cu puietul vârful este întârziat cu o zi. În pofida proprietății hidrofile a acidului oxalic, prezența marcatorului radioactiv ( $C_{14}$ ) a fost detectată pe termen lung. Din analizele cromatografice TLC efectuate pentru unele din aceste mostre, reiese că fracția radioactivă a cerii ar putea fi formată din mai mult decât un singur compus. De aici ar putea rezulta că după tratament nu numai cristalele de acid oxalic ar putea ajunge pe faguri, ci și că acidul ar putea reacționa cu ceara și/sau că metaboliții acidului oxalic pot urma calea care duce la sinteza unui anumit compus al cerii în albinele care secretă ceară.

Figure 4.  $\beta$ -activity in new wax collected from pre-existing combs.Figura 4 - Activitatea  $\beta$  din ceara nouă, colectată din fagurii deja existenți.

În mod logic, radioactivitatea din 2002 a fost detectată tot pe termen lung în mostrele de ceară proaspătă. În Fig. 5, toate semnalele înregistrate sunt convertite în concentrații ale acidului oxalic, dar și în acest caz, ar putea fi prezente cantități necunoscute de compuși proveniți din reacțiile chimice și/sau metabolizare, ceea ce poate duce la o apreciere mai mult sau mai puțin corectă a contaminării. Ipoteza după care albinele ar efectua metabolizarea acidului oxalic se bazează pe existența concomitentă a vârfurilor înregistrate la ceară și la  $CO_2$ .

Figure 5. Contaminating oxalic acid in wax (see text) and honey.

Figura 5 - Contaminarea cu acid oxalic a cerii (vezi textul) și a mierii  
- $\Delta$ - ceară din fagurii nou clădiți; - $\blacktriangle$ - miere proaspătă

Autoradiografia efectuată cu fagurele de miere (Fig. 6) arată că marcatorul radioactiv s-a împrăștiat pe suprafața fagurelui (un fagure necontaminat nu lasă nici o urmă pe film). Zona închisă la culoare din partea de sus, se găsește în apropierea locului de administrare. În celulele de miere necăpăcite contaminarea pare mai ridicată pe marginile celulei decât în mierea însăși.

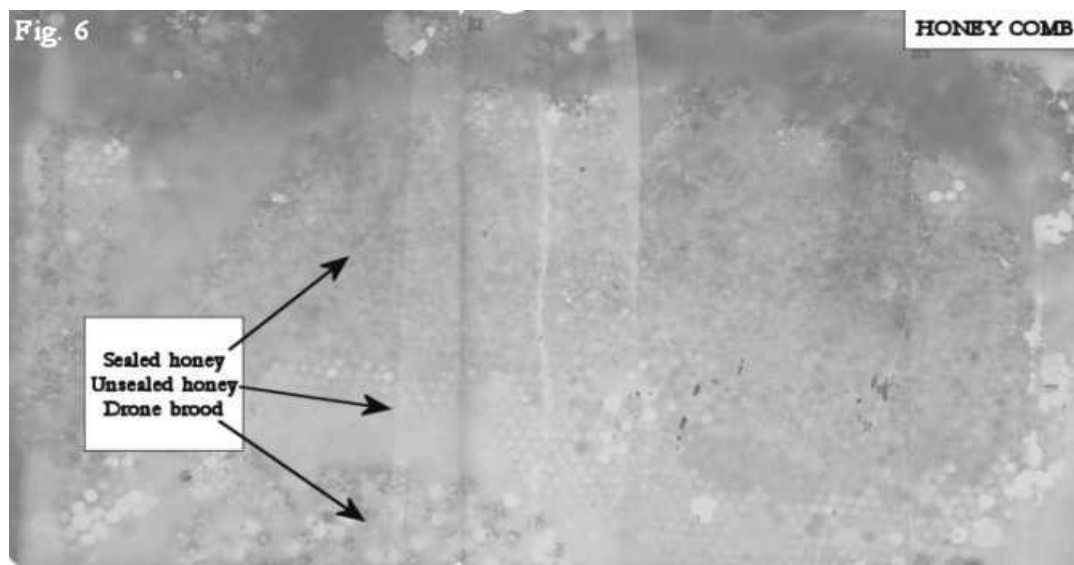


Figura 6 - Autoradiografia unui fagure de miere. Cele câteva puncte închise la culoare provin de la unelte. Săgețile indică miere căpăcită, miere necăpăcită, puiet de trântor

### Reziduurile din miere

După tratamentul din 1999, conținutul de acid oxalic al mierii necăpăcite, colectată din corpurile de miere, a crescut până la 0,59 mg/kg, valoare atinsă în ziua a 4-a. Începând cu ziua a 8-a, contaminarea a fost sub 0,1 mg/kg. Mostrele prelevate din rezervele de miere în timpul toamnei următoare continuau să conțină 0,07-0,1 mg/kg. Aceste valori sunt reduse în comparație cu conținutul natural de acid oxalic al mierii, care se înscrie între 3 și 760 mg/kg în funcție de originea botanică (NANETTI et al., 2002) și se încadrează în gama naturală de variabilitate. Cele de mai sus indică un risc redus de contaminare al mierii destinate extragerii.

În 2002 mierea a fost colectată din fagurii clădiți de albine în perioada dintre două prelevări succesive de mostre, ceea ce a redus o posibilă influență a unei mierii necontaminate deja existente. Astfel datele relevante devin reprezentative pentru transferul real de la albine la miere. În acest caz, nivelul maxim de 54,2 mg/kg a fost înregistrat la 12 ore după tratament (Fig. 5), dar a urmat o scădere abruptă în primele 1-12 zile după tratament, ducând la valori variind între 6 și 13,8 mg/kg. Înregistrările ulterioare s-au situat sub 1 mg/kg.

### Mulțumiri

Autorii țin să-și manifeste recunoștința față de Prof. Maria Adelaide VECCHI, de la Universitatea din Bologna, și Prof. Adriano PODESTÀ, de la Universitatea din Pisa, pentru discuțiile rodnice și sugestiile lor valoroase.

### BIBLIOGRAFIE

- Bernardini M., Gardi T. (2001), Impatto degli interventi sanitari per il controllo dell'acaro varroasulla qualità del miele e della cera. *Apitalia* 28(7-8): 21-24
- Bogdanov S., Charrière J.D., Imdorf A., Kilchenmann V., Fluri P. (2002), Determination of residues in honey after repeated field trials with formic and oxalic acid. *Apidologie* 33(4): 399-409

- Del Nozal M.J., Bernal J.L., Diego J.C., Gómez L.A., Ruiz J.M., Highes M. (2000), Determination of oxalate, sulphate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *J. of Chromatography* 881: 629-638
- Fluri P., Sabatini A.G., Vecchi M.A., Wille H. (1981), Blood juvenile hormone, protein and vitellogenin titres in laying and non-laying queen honeybees. *J. Apic. Res.* 20(4): 221-225
- Mutinelli F., Baggio A., Capolongo F., Piro R., Biasion L. (1997), L'acido ossalico nella lotta alla varroasi. *L'ape nostra amica* (4): 4-7
- Nanetti A. (2002), Oxalic acid treatments for varroa control (review). Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002
- Nanetti A., Ghini S., Gattavecchia E., Bartolomei P., Marcazzan G.L., Massi S. (2002), Pharmacodynamics of oxalic acid and treatment residues in honey. Symposium "Prevention of residues in honey", Celle (Germany), October 10-11, 2002. Poster session
- Nanetti A., Stradi G. (1997), Oxalsäure-Zuckerlösung zur Varroabekämpfung. *Allg. Dtsch. Imkerztg* 31 (11): 9-11