

## FARMACODINAMIA DEL ACIDO OXALICO EN LA COLONIA DE ABEJAS MELIFERAS

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,  
Univesità di Bologna, tel.: +39 051 353103; e-mail: istnapic@inapicoltura.org y ghini@biofarm.unibo.it

<sup>3</sup>Istituto Nazionale di Apicoltura, Bologna, Italia, istnapic@inapicoltura.org

### Resumen

La farmacodinamia del ácido oxálico (OA) administrado en gotas se estudió por métodos radioquímicos. Un jarabe de azúcar, con contenido de OA marcado con C14, fue goteado en una colonia, en la dosis y según la técnica comúnmente utilizadas en la práctica apícola. En los primeros cuatro días, la contaminación de las abejas adultas llegó a 118 microg/g, pero bajó a menos de 1/10 y, respectivamente, 1/60 a una y respectivamente dos semanas post-tratamiento. Durante los meses siguientes se registró una nueva reducción. Niveles sensiblemente más bajos se midieron en la cría de 8-9 días que, de modo similar, sólo estuvo contaminada temporalmente. Las radiografías evidenciaron la presencia de OA en los órganos abdominales internos de abejas adultas.

En la miel recién cosechada, el aumento de OA fue de 0,6 mg/kg e incluso menos. Esto no representa sino una pequeña fracción del contenido natural en OA de la miel. El marcador radioactivo fue encontrado también en la cera proveniente de panales recién construidos, pero no es nada claro si esto se debía a la contaminación directa, implicando una reacción química entre el OA libre y la cera, o a la presencia de los metabolitos elaborados por las abejas del OA absorbido.

En un segundo experimento, realizado siguiendo los mismos métodos de aplicación, se consideraron otras matrices también. El marcador radioactivo estuvo presente tanto en la hemolinfa de la abeja adulta como en las muestras de CO<sub>2</sub> tomadas de la colonia. Lo que parece confirmar la hipótesis de la metabolización del OA por las abejas.

**Palabras clave:** Varroa / residuos / ácido oxálico / distribución

### Introducción

El goteo de jarabe de azúcar adicionado de ácido oxálico en las colonias de abejas (NANETTI y STRADI, 1997) es un método extendido de combate de la varroosis en muchos países europeos. Se llevaron a cabo muchos experimentos para comprobar la efectividad y tolerabilidad de este método, en multitud de condiciones técnicas y ambientales, llegándose muchas veces a instituir estructuras metodológicas locales (NANETTI, 2002).

Sin embargo, nuestros conocimientos acerca del ingrediente activo están lejos de ser completos. Ante todo, se sabe muy poco sobre la actividad del ácido oxálico en el interior de las colonias de abejas y sobre las abejas individualmente. El entendimiento de este fenómeno, además del interés puramente académico, es crucial para descifrar los efectos desfavorables del tratamiento y para perfeccionar los métodos de aplicación. Los escasos datos disponibles en relación con los residuos que se dejan en la miel indican, las más de las veces, un riesgo reducido para la idoneidad de la miel tras los tratamientos por ácido oxálico (MUTINELLI et al., 1997; DEL NOZAL, M.J. et al., 2000; BERNARDINI, M. y GARDI, T., 2001; BOGDANOV et al., 2002; NANETTI, A. et al., 2002). Sin embargo, las técnicas analíticas adoptadas habitualmente no pueden distinguir entre la contaminación por ácido oxálico y el naturalmente presente en la miel, que depende en buena medida del origen botánico de ésta (MUTINELLI et al., 1997; NANETTI, A. et al., 2002).

El presente trabajo es una contribución al enriquecimiento de estos conocimientos. La superación del problema representado por la presencia natural de esta substancia en distintas matrices de la colonia de abejas y la distribución del ácido oxálico se estudiaron por la administración de soluciones tituladas por C<sub>14</sub> y otros análisis radioquímicos.

### Material y métodos

El experimento comportó dos replicaciones, realizadas durante la temporada estival de los años 1999 y 2002, en el entorno de la ciudad de Bolonia, Italia, durante la época de mielada. De las colonias, se utilizó una, alojada a través de todo el año en una colmena DB. En ambas colonias las abejas ocupaban todos los diez panales disponibles, de los cuales 6-7 con cría.

Los días 19 de julio de 1999 y, respectivamente, 28 de julio de 2002, las colonias se trataron con ácido oxálico, según el método anteriormente citado, del goteo. Los tratamientos consistieron, respectivamente, en 50 y 41 ml de solución hídrica, con un contenido de 4,2 % de ácido oxálico y 60 % de azúcar alimenticio (peso/volumen), administrada con ayuda de una jeringuilla. Las soluciones se adicionaron previamente de ácido oxálico C<sub>14</sub> (Sigma N. 31, 391 - 2), en cantidades equivalentes a 12,1 MBq y, respectivamente, 7,4 MBq.

En ambas replicaciones, se recogieron muestras pretratamiento de las matrices que se indican más adelante. Al principio, las muestras post-tratamiento se recogieron una (1999) o dos veces al día (T AM y 8 PM, en 2002), pero posteriormente se recogieron a intervalos más dilatados.

En 1999, se consideraron las siguientes matrices:

- abejas adultas, de los panales laterales;
- cría, de 8-9 días de edad;
- miel sin opercular;
- cera, de las paredes de celdas recién construidas (se utilizó una hoja de cera).

En 2002, se sacaron muestras de:

- abejas adultas, de los panales laterales;
- CO<sub>2</sub> del aire del interior de la colonia;
- cera, de panales recién construidos;
- miel fresca, almacenada en panales nuevos.

Muestras de hemolinfa torácica se tomaron de las abejas recogidas en el verano de 2002, con ayuda de pipetas capilares Pasteur (FLURI et al., 1981), en tubos Eppendorf. Las alas anteriores de cada abeja se cortaron y se sujetaron a cubreobjetos del microscopio, la cara exterior boca arriba, dejando a las de la derecha como estaban y lavando abundantemente a las de la izquierda con agua destilada.

Los intestinos de otras abejas se sacaron, tirando cuidadosamente para fuera el aparato vulnerante (el agujón) con unas pinzas. Ulteriormente, se montaron sobre cubreobjetos y se mantuvieron hasta el momento de su utilización a cerca de 40° C, para conseguir un secado lento. Al efecto de la reducción de la densidad de la preparación, los buches de miel de las abejas se vaciaron presionando ligeramente.

Para que la reina dispusiera de más espacio para la ovoposición, el 5<sup>to</sup> día experimental de 2002 se retiró un panal de miel lateral y se le reemplazó por uno vacío. Con anterioridad al tratamiento, sólo la parte superior del panal reemplazado había sido llenada de miel. Después se le fue completando hacia el centro, donde había quedado una zona de celdas de miel sin opercular, hasta el momento de su retirada.

Para sacar muestras de CO<sub>2</sub> de la colonia, en el interior de la colmena se montó un tubo de plástico, con la extremidad exterior provista de un tapón y la otra en medio del nido de cría. Se tomaron precauciones al efecto de evitar la entrada accidental de las abejas y las gotas de jarabe en el tubo. Cuatro litros de aire aspirados a través del tapón exterior se dejaron chapotear lentamente en otro tubo que contenía 5 ml de hidróxido de hiamina 10-X (1 M en metanol; catálogo Packard no. 6003005).

Todas las muestras, con excepción de las alas, los intestinos y los panales de miel, se congelaron (en torno a los -25° C), hasta el momento del análisis.

Se hicieron auto-radiografías de las alas lavadas o sin lavar, de los intestinos secos y los panales de miel retirados el 5<sup>to</sup> día. La exposición duró 33 y respectivamente 23 días, para las primeras tres matrices y, respectivamente, panales. Para una mayor adhesión a la película, se colocó el panal sobre uno de sus lados. Se evitó el escurrimiento de la miel efectuando la auto-radiografía a cerca de -25° C. Se envolvieron las muestras en una lámina de polietileno (cerca de 10 m), para evitar el contacto directo con la emulsión fotosensible. Se emplearon películas Kodak Biomax MR1; se procesaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

#### *Medición de la radioactividad (instrumentos y preparación de las muestras)*

Todas las mediciones de la radioactividad se efectuaron por escintilación líquida (LSC), en un contador Quantulus 1220 (LKB, Suecia). Se utilizaron frascos de polietileno de 20 ml, recubiertos de una capa de teflón y una mezcla de escintilación Ultima Gold (Packard Canberra, EE.UU.).

Cinco abejas liofilizadas se pesaron con precisión, se trituraron y se suspendieron en un volumen conocido de ácido oxálico frío. La suspensión se sometió a ondas sonoras por 10 min, se calentó a 70-80° C y se centrifugó. Un mililitro del sobrenadante se agregó a 18 mL de mezcla escintilante, en un frasco de 20 mL.

Una alícuota de miel, de cerca de 0,2 g, se peso con precisión, directamente en un frasco de escintilación, se diluyó en agua (cerca de 1 mL), y se le agregaron 18 mL de mezcla de escintilación.

Cerca de 0,1g (medidos con precisión) de cera se disolvieron en 25 mL de ciclohexano y se sometieron a un tratamiento por ondas sonoras. Un mililitro de la solución se agregó a 18 mL de mezcla de escintilación, en un frasco de 20 mL.

Una muestra medida con precisión de cría de 8-9 días de edad se suspendió en 5 mL de ácido oxálico frío, se le hizo pasar por ondas sonoras durante 10 min. y se calentó a 60° C durante 10 min. y se centrifugó. Se agregaron tres gotas de ácido tricloracético, para aclarar la solución. Después de un segundo centrifugado, 1 mL del sobrenadante se agregó a 18 mL de mezcla de escintilación, en un frasco de 20 mL.

Una muestra pesada de polen se suspendió en 5 mL de ácido oxálico frío, se le hizo pasar por ondas sonoras durante 10 min., se calentó a 80° C durante otros 10 min. y se centrifugó. Se filtró el sobrenadante a través de un microfiltro de 0,1 µm. Un mililitro de la solución resultante se agregó a 18 mL de mezcla de escintilación, en un frasco de 20 mL.

Una cantidad de 1 ml de hidróxido de hiamina 10-X, recogido de la trampa de CO<sub>2</sub> descrita más arriba, se agregó a 18 mL de mezcla de escintilación, en un frasco de 20 mL.

La hemolinfa se pesó con precisión y se transfirió completamente, a cantidades sucesivas de mezcla de escintilación, y se llevó a un volumen total de 3 mL, en un frasco que contenía 16 mL de mezcla de escintilación.

### *Cromatografía TLC de la cera*

Una muestra de cera, recogida en el momento máximo de radioactividad, se disolvió en ciclohexano y se analizó mediante TLC (silicagel, Merck). Tras la elución con acetato de etilo, se determinó la distribución de la radioactividad con ayuda de un radioescáner (escaner lineal TLC, Berthold, Alemania).

## **Resultados y discusiones**

### *Abejas adultas y cría*

La figura 1 muestra que una notable contaminación de las abejas adultas se detectó a las 24 horas del tratamiento de 1999. Un día más tarde, el pico alcanzó un máximo de 118 µg/g, pero otras reducciones notables se produjeron los días 7 y 11, cuando se identificaron contenidos de 10,8 y respectivamente 2,0 µg/g. Si se toma como referente el peso medio de una abeja, cerca de 100 mg, la contaminación por ácido oxálico se situó en torno a los 12 µg y respectivamente 0,2 µg. En los próximos meses hubo más reducciones progresivas.

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

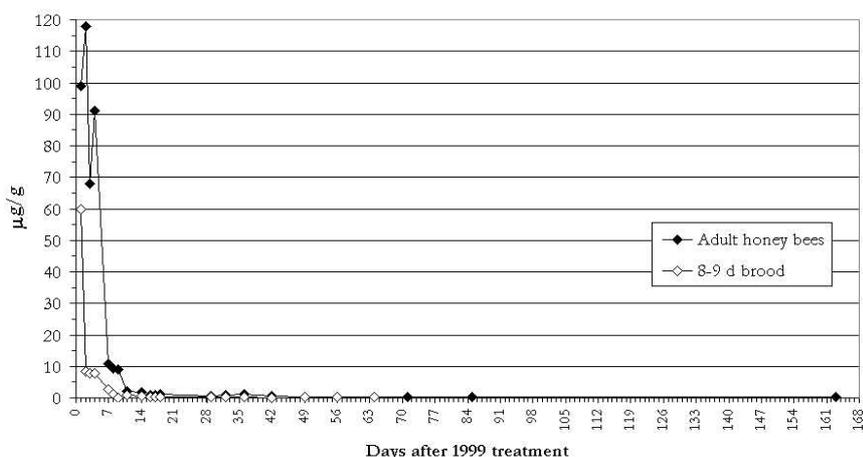


Figura 1 - Contaminación por ácido oxálico en abejas adultas y cría de 8-9 días  
 —◆— abejas adultas; -◇- cría de 8-9 días; días post-tratamiento en 1999

Una contaminación más escasa se evidenció en las larvas mayores, sin opercular, ascendiendo el valor máximo a 60 µg/g. Igual que en las abejas adultas, el pico se registró a las 24 horas del tratamiento.

No obstante, la reducción empezó mucho antes, si se le compara con las abejas y, ulteriormente, se estabilizó a niveles más bajos.

En la segunda réplica, la presencia del ácido oxálico C<sub>14</sub> se pudo demostrar en la hemolinfa de las abejas melíferas. El valor más alto (10 ng/mg) se registró a las 12 horas post-tratamiento, pero ulteriormente se produjo un descenso brusco, llegándose a una concentración de 1,1 ng/mg, en la hora 84. La radioactividad se atenuó casi por completo a más o menos un mes después del tratamiento (Figura 2).

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

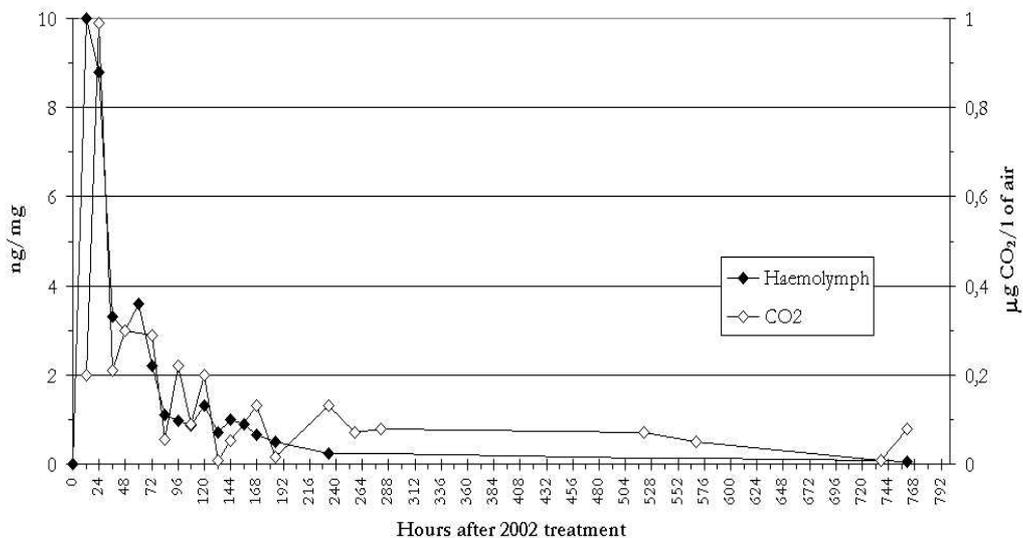


Figura 2 - La contaminación por ácido oxálico en la hemolinfa de las abejas (izquierda) y el CO<sub>2</sub> (derecha) µgCO<sub>2</sub>/litro de aire; -♦- Hemolinfa; -◇- CO<sub>2</sub>; Horas, después del tratamiento de 2002

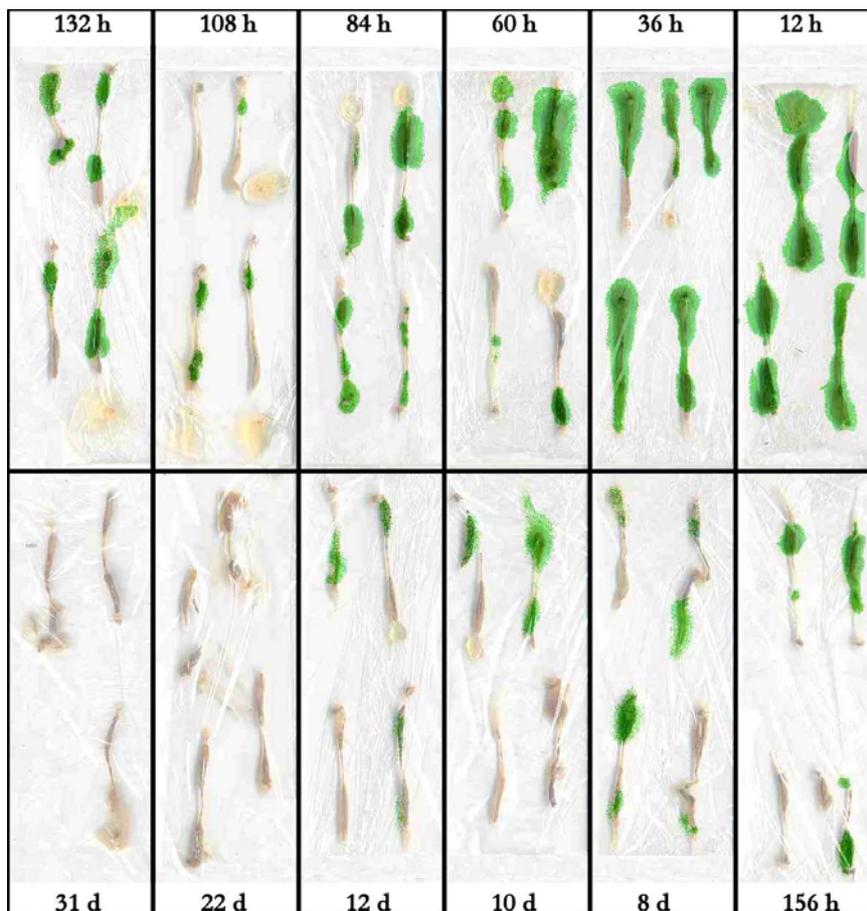


Figura 3 - La radioactividad en los intestinos de las abejas melíferas (zonas coloreadas)

Pequeñas diferencias, si las hubo, se evidenciaron en las autorradiografías de las alas sin lavar, igual que en las alas donde el ácido oxálico fue apartado por un lavado concienzudo. Ambas categorías dejaron sobre la película huellas claras de las propias venaciones. Esto parece indicar una escasa contaminación exterior de las abejas y corresponde a la detección de la contaminación por ácido oxálico de la hemolinfa que rellena las venaciones de las alas.

La hipótesis de la metabolización del ácido oxálico por las abejas está apoyada por la detección de  $CO_2$  radioactivo en el aire examinado en el interior de la colonia (Fig. 2), cuyo pico de concentración llevó un retraso con respecto al registrado en la hemolinfa.

Se produjo un descenso brusco, seguido de un ciclo diario, con picos positivos en el aire sometido al muestreo por la tarde y reducidos temprano en la mañana. Aunque no se pueda ofrecer una explicación exenta de ambigüedades a este fenómeno, el nivel diferente de la actividad de la colonia durante las horas de luz diurnas y nocturnas pudo haber tenido cierta influencia.

La figura 3 presenta la distribución de la radioactividad a lo largo de los intestinos de las abejas. A las 12 horas post-tratamiento, todos los trayectos intestinales, entre el buche de miel y el recto, evidenciaron la presencia del marcador, pero ulteriormente la presencia del marcador radioactivo sólo se detectó ocasionalmente en el interior de los buches de miel. En general, con el tiempo la contaminación se fue reduciendo; los intestinos extraídos los días 22 y 31 no estaban contaminados por cantidades detectables.

### Cera y panales

La figura 4 presenta la radioactividad detectada en las muestras de cera de 1999. El pico lleva un día de retraso con respecto a las abejas adultas y la cría. A pesar del carácter hidrófilo del ácido oxálico, se detectó la presencia del marcador radioactivo ( $C_{14}$ ), también a largo plazo. Juzgando por los análisis cromatográficos TLC sobre algunas de estas muestras, parece que la fracción radioactiva de la cera puede constar de más de un único compuesto. Lo que podría significar que, después del tratamiento, no sólo los cristales de ácido oxálico pudieron haber llegado a los panales, sino también que el ácido reacciona con la cera y/o que los metabolitos del ácido oxálico pueden seguir el camino que lleva a la síntesis de un determinado compuesto de la cera en las abejas que segregan cera.

Figure 4.  $\beta$ -activity in new wax collected from pre-existing combs.

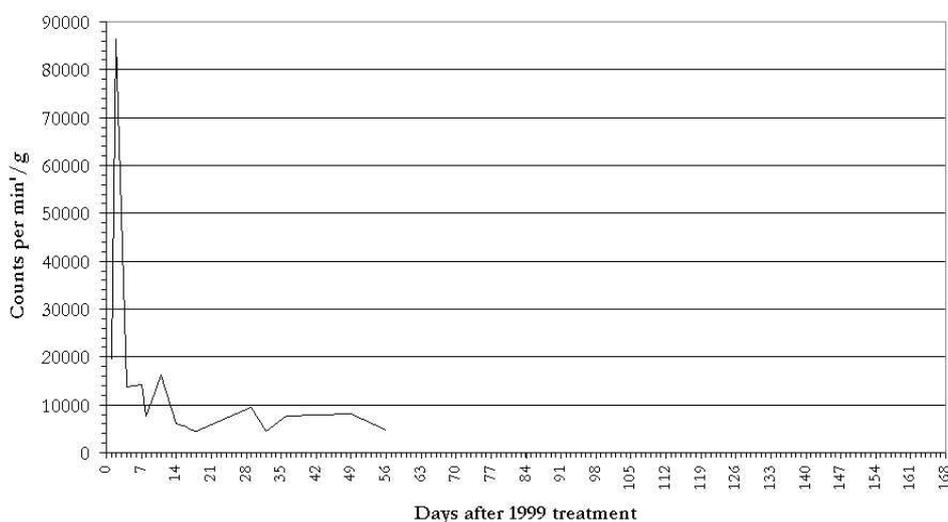


Figura 4 - La  $\beta$ -actividad de la cera nueva, recogida de los panales preexistentes  
Recuento por min./g; Días post-tratamiento (1999)

De modo constante, la radioactividad de 2002 fue detectada en las muestras de cera fresca, siempre a largo plazo. En la fig. 5, todas las señales registradas están convertidas en concentraciones del ácido oxálico, pero también en este caso puede haber cantidades desconocidas de compuestos resultantes de las reacciones químicas y/o de metabolización, que pueden determinar una valoración más o menos

incorrecta de la contaminación. La hipótesis de que las abejas efectuarían la metabolización del ácido oxálico corresponde a la existencia, al mismo tiempo, de los picos registrados en la cera y el CO<sub>2</sub>.

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

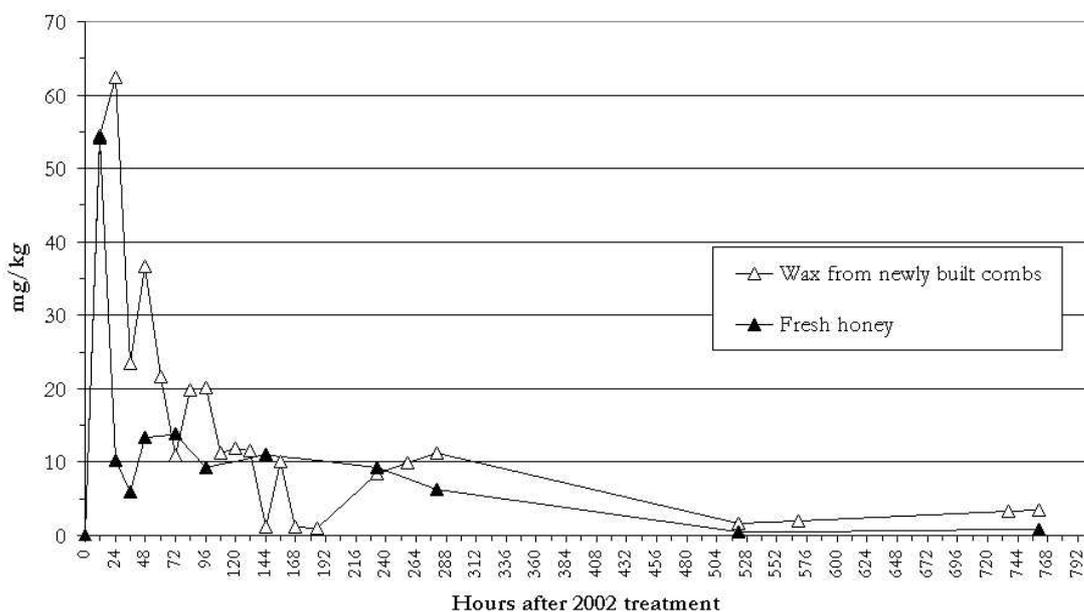


Figura 5 - La contaminación por ácido oxálico de la cera (véase el texto) y la miel  
 -△- Cera de los panales recién construidos ; -▲- Miel fresca; Horas post-tratamiento (2002)

La autorradiografía efectuada sobre el panal de miel (Fig. 6) muestra que el marcador radioactivo se difundió por la superficie del panal (un panal no contaminado no dejó ninguna huella sobre la película). La zona oscura de arriba está cerca del punto de administración. En las celdas de miel sin opercular, la contaminación pareció más elevada en los bordes de la celda que en la propia miel.

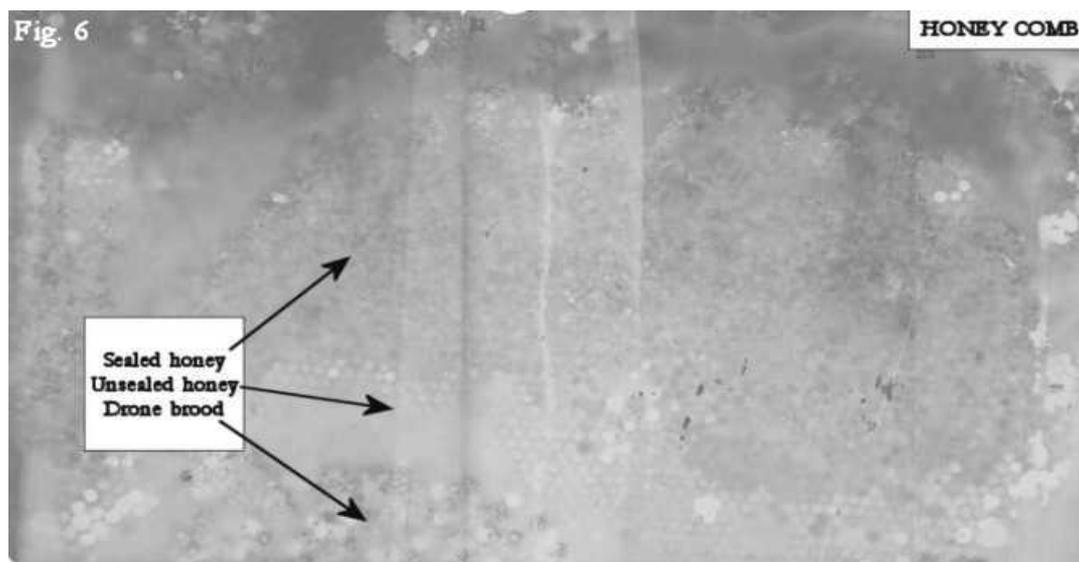


Figura 6 - Autorradiografía de un panal de miel. Los puntos aislados, más oscuros, son productos artificiales  
 PANAL DE MIEL; Miel operculada; Miel sin opercular; Cría de zánganos

### *Los residuos de la miel*

Después del tratamiento de 1999, el contenido de ácido oxálico de la miel sin opercular, extraída de las alzas, fue creciendo hasta alcanzar el valor de 0,59 mg/kg en el día 4. A partir del día 8, la contaminación fue inferior a 0,1 mg/kg. Las muestras tomadas de las provisiones de miel durante el siguiente otoño aún contenían 0,07-0,1 mg/kg. Estos valores son reducidos, si se los compara con el contenido natural en ácido oxálico de la miel, que se sitúa entre 3 y 760 mg/kg, según el tipo botánico (NANETTI et al., 2002) y están dentro del rango natural de variabilidad. Lo anterior indica un riesgo reducido de contaminación importante de la miel destinada a la extracción.

En 2002, la miel fue recogida de los panales construidos por las abejas entre dos tomas sucesivas de muestras, reduciendo la posible influencia de la dilución con miel no contaminada preexistente. Lo que confiere a los datos relevantes un plus de representatividad en cuanto a la transferencia real de las abejas a la miel. En tal caso, un nivel máximo de 54,2 mg/kg se registró a las 12 horas post-tratamiento (Fig. 5), pero le siguió un descenso brusco, que proporcionó valores entre 6 y 13,8 mg/kg, durante los primeros 1-12 días post-tratamiento. Los registros ulteriores se situaron por debajo de 1 mg/kg.

### **Agradecimientos**

Los autores desean dejar constancia de su agradecimiento a la Prof. Maria Adelaide Vecchi, de la Universidad de Bolonia, y al Prof. Adriano Podestà, de la Universidad de Pisa, por las fructuosas conversaciones y sus valiosas sugerencias.

### **BIBLIOGRAFIA**

- 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