



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2014 00392

(22) Data de depozit: 27.05.2014

(41) Data publicării cererii:
30.06.2015 BOPI nr. 6/2015

(71) Solicitant:
• TESO SPEC S.R.L., STR. MUNCII NR. 53,
PARTER, FUNDULEA, CL, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR. 5,
BL. D 7, SC. E, ET. 2, AP. 45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• VLĂDULESCU LUCIAN CONSTANTIN,
STR. SFÂNTUL ELEFTERIE NR. 31,
BUCUREȘTI, B, RO;
• VELEA SANDA, STR. ZAMBILELOR NR. 6,
BL. 60, ET. 2, AP. 5, SECTOR 2, BUCUREȘTI,
B, RO;
• CRISTEA TIBERIU, STR. KUMELGATAN
NR. 184, HELSINBORG, DE, DE

(54) SUPPLEMENT NUTRACEUTIC PENTRU FAMILIILE DE ALBINE
ȘI PROCEDEU DE ADMINISTRARE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un supliment nutraceutic pentru familiile de albine, și la o metodă de aplicare a acestuia. Suplimentul conform invenției este constituit, în părți în greutate, din 0,395...0,41 părți acid p-cumaric, 0,395...0,45 părți acid cafeic, 4,15...4,3 părți maltol, 4,25...4,4 părți fructo-oligozaharide cu până la 10 resturi de hexoze în moleculă, 0,97...1 părți stearat de magneziu, 33,9...35 părți bicarbonat de sodiu, 15,5...16 părți acid citric, 11,6...12 părți acid tartric, 23,3...24 părți amestec dextroză-maltoză, și apă - până la 100 părți.

Metoda conform invenției constă în dizolvarea a 1 g supliment formulat ca tabletă în 100 ml apă, urmată de diluarea cu sirop de zahăr sau sirop de glucoză-fructoză din porumb, într-un raport de 1:1, pentru stro-pirea stupului, sau într-un raport de 1:9, pentru hrana albinelor, aplicate simultan în cadrul tratamentelor de toamnă înainte iernării, sau în perioadele de început al culesului.

Revendicări: 2



SUPLIMENT NUTRACEUTIC PENTRU FAMILIILE DE ALBINE ȘI PROCEDEU DE ADMINISTRARE

Prezenta invenție se referă la un supliment nutraceutic pentru albine, destinat creșterii toleranței acestora la stresurile biotice și abiotice, prin activarea sistemelor de apărare, imune / împotriva stresurilor biotice, produse de patogeni și paraziți, și de detoxifiere / împotriva stresurilor abiotice, produse de poluanții chimici.

Sunt cunoscute o serie de compoziții destinate stimulării sistemelor de apărare din albine, folosite și pentru suplimentarea hranei de substituție. Hrana de substituție, larg utilizată pentru furajarea albinelor, pe bază de zahăr invertit și/sau sirop de fructoză-glucoză, nu conține o serie de compuși cu rol în susținerea albinelor în lupta împotriva paraziților, patogenilor și poluanților xenobiotici. Mai mult, siropurile pe bază de zahăr invertit sau dextroză izomerizată / amestec de glucoză și fructoză, conțin hidroximetilfurfural, compus care, peste anumite limite, are efecte negative asupra albinelor (Zirbes *et al.*, 2013, J. Agric. Food Chem., 61, 11865-11870).

Albinele melifere sunt cei mai importanți polenizatori utilizați în sistemele de management antropic al culturilor agricole. Importanța lor economică majoră nu este dată de produsele stupului (miere, polen, propolis, extracte de larve de trântor, etc.), ci de rolul lor în polenizare. Circa 75% din culturile agricole depind de polenizarea de către insecte, valoarea economică a insectelor polenizatoare fiind estimată la 153 miliarde euro (Gallai *et al.*, 2009, Ecol Econ 68: 810–821). Politicile agricole aplicate în diferitele zone ale lumii, cum este de exemplu cea de susținere a culturilor pentru biocombustibili în Uniunea Europeană, cresc semnificativ necesarul de albine melifere polenizatoare (Breeze *et al.*, 2014, PloS One, 9, e82996). Sindromul de colaps al coloniilor, în care interacția dintre factorii de stres biotici și abiotici are un rol major (Staveley *et al.* 2014, Hum. Ecol. Risk Asses. Inter. J., 20, 566-591) determină pierderi economice semnificative și generează îngrijorare în ceea ce privește viitorul producțiilor culturilor agricole polenizate de albine. Susținerea mecanismelor naturale de apărare a albinelor împotriva factorilor de stres biotici, inclusiv a parazitului devastator *Varroa destructor* și a virusurilor pe care acesta le transmite, și abiotici, și în special a insecticidelor sistemice, reprezintă una din principalele modalități de intervenție în vederea limitării factorilor care afectează populațiile de albine melifere.

O serie din compozițiile brevetate cu rol în stimularea sistemelor de imune din albine conțin compuși naturali din categoria polifenolilor. Brevetul SUA 7597912 B descrie utilizarea extractelor de hamei, care includ acizi (fenolici) alfa, humulone, adhumulone, cohumulone și/sau derivați, și/sau acizi (fenolici) beta, lupulone, adlupulone, colupulone, și/sau derivați, pentru tratarea și prevenirea atacului acarienilor paraziți. Cererea de brevet KR20140045726 A se referă la o compoziție de hrănire a albinelor care include polifenoli din tărâțe de orez. Cererea de brevet EP 2193722 A1 revendică un procedeu de obținere a hranei de albine din părți ale plantelor bogate în compuși polifenolici.

Alte compoziții cu rol în activarea sistemelor imunitare din albine sunt cele care includ pre- și probiotice. Bacterii probiotice sunt benefice pentru sănătatea albinelor (Vasque *et al.*, 2012, PLoS One, 7:e33188), prevenind infecția cu *Paenibacillus larvae*, bacteria care produce loca americană (Mudronova *et al.*, 2011, J. Api. Res., 50:323-324), și stimulând răspunsul imun al albinelor (Evans și Lopez, 2004, J. Econ. Entomol., 97:752-756). Cererea de brevet SUA 20130064796 A prezintă utilizarea unei compoziții care include bacterii acetice din genul *Sacharibacter*, împreună cu una sau două bacterii antagoniste care formează spori (*Bacillus thuringiensis* și *Bacillus laterosporus*), pentru protecția împotriva patogenilor bacterieni, cum este de exemplu *Paenibacillus larvae* care produce loca americană. Cererea de brevet KR20130101370 protejează o compoziție de hrană pentru albine care include 0,05 - 5 părți de bacterii probiotice din grupul reprezentat de *Lactobacillus plantarum* YML001, *Lactobacillus plantarum* YML004, și *Leuconostoc citreum* KM20.

Pre-bioticele, compușii care favorizează dezvoltarea bacteriilor probiotice, au fost de asemenea incluse în diferitele compoziții destinate activării sistemelor de apărare din albine. Fructo-oligozaharidele sunt prezentate în cererea de brevet KR20100125738 A ca prebiotic în combinație sinbiotică cu bacteriile prebiotice din grupul lactobacililor *Streptococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus lactis*, și al bacililor gram pozitivi sporulanți, inclusiv *Bacillus subtilis*. Cererea de brevet RO128464 A se referă la o compoziție pentru protecția albinelor împotriva bolilor și dăunătorilor, prin activarea sistemelor de apărare ale albinelor și prin limitarea dezvoltării populațiilor de agenți patogeni și dăunători, care include fructo-oligozaharide probiotice și uleiuri esențiale.

Un dezavantaj comun al compozițiilor prezentate mai sus este determinat de faptul că nu prezintă componente care să activeze specific și genele de detoxifiere din albine. La albine activarea genelor de detoxifiere este însoțită și de o exprimare superioară a genelor implicate în imunitatea albinelor (Mao *et al.*, 2013, PNAS, 110:8842-8846), speciile reactive de oxigen fiind efectori și semnale comune în desfășurarea căilor metabolice specifice celor două răspunsuri fiziologice (Nathan și Cunningham-Bussel, 2013, Nat. Rev. Immunol. 13: 349–361). Albinele au un deficit al genelor implicate în detoxifiere, comparativ cu alte insecte (Claudianos *et al.*, 2006 Ins. Mol. Biol., 15, 615-636). Sistemele de detoxifiere sunt induse semnificativ numai de o serie de compuși naturali din polen și propolis, fiind mult mai puțin induse de compuși xenobiotici, cum ar fi insecticidele sistemice neo-nicotinice utilizate pentru tratamentul seminței sau acaricidele folosite pentru limitarea dezvoltării acarienilor paraziți (Mao *et al.*, 2013, PNAS, 110:8842-8846). Datorită acestei particularități, de inducere comună a sistemelor de apărare majore, imune și de detoxifiere, albinele sunt mai afectate de diferitele xenobiotice de origine antropică, comparativ cu alte insecte. Dozele sub-letale de insecticide fac albinele mult mai sensibile la atacul agenților patogeni (Doublet *et al.*, 2014, Environ. Microbiol. doi:10.1111/1462-2920.12426, Pettis *et al.* 2012, Naturwiss., 99, 153-158). O activare concomitentă a enzimelor implicate în imunitate și în detoxifiere ar determina o creștere sinergică a toleranței albinelor la stresurile abiotice din mediu, în special xenobiotice, și la cele biotice, reprezentate de atacul paraziților și al agenților patogeni.

Un alt dezavantaj al compozițiilor descrise mai sus se referă la faptul că nu acționează și la nivelul mecanismelor implicate în imunitatea socială a albinelor, fiind destinate activării sistemelor de apărare la nivelul albinelor individuale. Albinele, ca și celelalte insecte sociale, au evoluat pentru dezvoltarea unei imunități sociale, cu rol în combaterea riscului crescut de transmitere a bolilor și a paraziților, rezultat din aglomerarea specifică modului social de viață (Cremer *et al.*, 2007, Curr. Biol., 17, R693-R702). Mesagerii chimici / feromonii sunt esențiali pentru buna funcționare a acestei imunități sociale (Richard și Hunt, 2013, Ins. Soc., 60, 275-291).

Aditivii alimentari care acționează ca potențatori de aromă sunt compuși care stimulează imunitatea socială, pentru că reduc pragul de percepție a mesagerilor chimici volatili implicați în acest tip de imunitate. Maltolul, larg utilizat pentru a potența aroma alimentelor (Leblanc și Akers, 1989, Food Techn., 43, 18–84), a fost inclus în cadrul unor compoziții pentru atragerea insectelor (brevet JPS5345368 B2) și este

unul din ingredientele unor compoziții destinate tratării familiilor de albine. Brevetul RO 115411 se referă la utilizarea maltolului, formulat ca tabletă efervescentă, pentru tratarea bolilor fungice ale albinelor. Cererea de brevet RO 129059 descrie utilizarea unei compoziții care include și maltol, alături de clorură de dimetil-alchil -C12-C16-benzil amoniu și propolis, pentru tratarea albinelor. Cererea de brevet RO 128464 A asociază maltolul fructo-oligozaharidelor și uleiurilor esențiale, pentru a obține un produs cu rol în combaterea patogenilor și paraziților albinelor.

Deși maltolul are o acțiune anti-oxidantă (Murakami *et al.* 2001, Biomed. Res., 22, 183-186), în prezența metalelor tranzitionale, și în special a fierului, maltolul poate avea o acțiune pro-oxidantă (Murakami *et al.* 2006, Biomet., 19, 253-257). O supra-producere de specii reactive de oxigen datorită complexelor de maltol și fier intervine în delicatul echilibru al căilor metabolice de detoxifiere și de apărare, determinând apariția unor nivele de specii reactive de oxigen cu efecte patologice. Stresul oxidativ, rezultat din astfel de nivelele supra-fiziologice / patologice ale speciilor reactive de oxigen, este implicat și în deteriorarea memoriei olfactive a albinelor lucrătoare (Farooqui, 2014, Front. Gen., 5, 60). Sunt necesare deci compoziții care să includă compuși care să prevină acțiunea pro-oxidantă a maltolului, prin care acesta ar acționa antagonic asupra sistemelor de apărare și de detoxifiere la nivelul albinelor, și asupra memoriei olfactive implicate în imunitatea socială, inclusiv în recunoașterea surorilor din același stup.

Maltolul inhibă dezvoltarea lactobacteriilor (Banerjee *et al.*, 1980, Experientia, 36, 313-315) și permeabilizează membrana celulară bacteriană (Schved *et al.*, 1996. Lett. Appl. Microb., 22, 189-191). Aceste caracteristici nu sunt favorabile bacteriilor probiotice specifice familiilor de albine, lactobacteriilor fructofilice. Aceste bacterii, puse în evidență recent (Endo *et al.*, 2009. System. Appl. Microb., 32, 593-600), sunt adaptate unor nișe bogate în fructoză, cu o activitate redusă a apei / presiune osmotică mare. Acțiunea inhibitorie a maltolului asupra lactobacteriilor, ca și acțiunea de modificare a permeabilității membranei celulare, afectează capacitatea lactobacteriilor fructofilice de a se supraviețui într-un mediu cu presiune osmotică mare. Pentru a menține acțiunea de favorizare a comunicării feromonale implicate în imunitatea socială a familiilor de albine exercitate de maltol, fără afectarea dezvoltării lactobacteriilor fructofilice benefice albinele, sunt necesare compoziții care să includă componente care să anuleze efectele negative ale maltolului asupra lactobacteriilor fructofilice.

Un exemplu de ingrediente active care stimulează lactobacteriilor fructofilice sunt fructo-oligozaharidele (Dominguez *et al.*, 2014, Food Bioproc. Technol. 7, 324-337.). Concentrația în care fructo-oligozaharidele se regăsesc în miere, și care susține dezvoltarea unor bacterii probiotice benefice este de max. 58 mg/kg (0,058 mg/g, Mei *et al.*, 2010, Int. Food Res. J., 17:557-561). O cantitate mai ridicată de fructo-oligozaharide, în special din cele cu 3 și mai mult resturi de fructoză, reprezintă un indicator de falsificare a mierii cu sirop de fructoză obținut din inulină (Ruiz-Matute *et al.*, 2010, J. Food Compos. Anal. 23: 273-276), astfel încât fructo-oligozaharidele trebuie dozate cu precizie pe stup, pentru a asigura dezvoltarea unor microbiocenoze benefice albinelor, cu antagonism față de microorganismele patogene pentru albine și cu acțiune de stimulare a imunității albinelor, fără a genera posibile probleme, legate de suspiciuni privind falsificarea mierii.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a descrie o compoziție care să includă compuși care nu interacționează antagonic, ci sinergic / complementar, cu acțiuni de: (i) stimulare concomitentă a sistemelor de detoxifiere și de apărare la nivelul fiecărei albine; (ii) favorizare a comunicării feromonale implicate în imunitatea socială a familiilor de albine, și (iii) facilitare a dezvoltării lactobacteriilor fructofilice benefice familiilor de albine. Este un obiectiv derivat al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care această compoziție să fie administrată în cantități precis dozate, în funcție de acțiunea dorită, prin pulverizare, pe corpul stupului, pentru a se vaporiza ulterior în stup, și/sau pe ramele de albine și pe albine, pentru a stimula preponderent imunitatea socială în familiile de albine, și/sau prin includere ca supliment nutritiv în hrana administrată albinelor, pentru a stimula preponderent sistemele moleculare de detoxifiere și apărare de la nivelul fiecărei albine.

Autorii au descoperit că o combinație echimolară de acizi hidroxicinamici, acid p-cumaric și acid cafeic, aplicată în raport de masa de 1:5 față de maltol, anulează acțiunea inhibitorie a acestuia față de lactobacteriilor fructofilice. De asemenea autorii au găsit că acest amestec de acizi hidroxicinamici blochează efectul prooxidant al maltolului în țesuturile albinelor, determinând concomitent și o stimulare semnificativă a unei componente cheie din sistemelor de apărare din albine.

Compoziția conform invenției este alcătuită din 0,395 - 0,41 părți acid p-cumaric, 0,395 - 0,45 părți acid cafeic, 4,15 - 4,3 părți maltol, 4,25 - 4,4 părți fructo-oligozaharide cu mai puțin de 10 resturi de hexoze în moleculă, 0,97 - 1 părți stearat

de magneziu, 33,9 - 35 părți bicarbonat de sodiu, 15,5 - 16 părți acid citric, 11,6 - 12 părți acid tartric, 23,3 - 24 părți amestec dextroză – maltoză cristalizat prin pulverizare, apă până la 100 părți.

Procedeul de aplicare a produsului conform invenției este alcătuit din următoarele etape: dizolvarea a 1 g din compoziția de mai sus predozată, formulată ca tabletă efervescentă, în 100 ml apă, urmată de diluarea cu sirop (invertit) de zahăr sau sirop de glucoză-fructoză din porumb, în raport de 1:1, în cazul soluției destinate utilizării pentru stropirea corpului stupului sau a ramelor de albine și a albinelor, sau în raport de 1:9 a celei utilizate ca supliment în hrana albinelor, aplicarea în același timp, în cadrul tratamentelor de toamnă înaintea iernării, prin stropire pe corpul stupului și prin stropire pe ramele cu albine și pe albine, a soluției formate prin diluare în raport 1:1 cu hrană pentru albine, pentru stimularea preponderentă a imunității sociale, sau aplicarea concomitentă, în perioadele de început de cules sau de lipsă de nectar, prin stropire pe corpul stupului a soluției formate prin diluare în raport 1:1, și ca supliment nutraceutic stimulat în hrana albinelor, a soluției diluate în raport de 1:9 în hrană pentru albine.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Acțiune complementară și/sau sinergică a ingredientelor compoziției conform invenției asupra: sistemelor de apărare, imune și de detoxifiere, de la nivelul albinelor individuale; microbiocenozei lactobacteriilor fructofilice de la nivelul tractului digestiv al albinelor și de la nivelul stupului; imunității sociale mediate prin mesageri chimici volatili;
- Tabletare prin comprimare directă datorită utilizării amestecului de dextroză – maltoză cristalizat prin pulverizare;
- Stabilitatea în timp crescută ca urmare a utilizării unui sistem efervescent în care acidul citric este parțial înlocuit de acid tartric;
- Aplicarea ușoară cu respectarea riguroasă a dozei chiar în condiții de teren, datorită pre-dozării ca tabletă efervescentă, care asigură și o omogenizare a soluției de aplicat în timpul dezagregării efervescente;
- Neafectarea valorii comerciale a mierii;
- Eficacitatea ridicată în combaterea patogenilor fungici și efect adjuvant cu produsele naturale utilizate pentru combaterea acarienilor paraziți, respectiv uleiurile esențiale și acidul formic;

- Posibilitatea aplicării după necesități, prin stropirea corpului stupului și/sau stropirea ramelor și a albinelor și/sau adăugare în hrana albinelor;
- Stimularea activității de hrănire a albinelor, datorită maltolului care este și un potențator de aromă;
- Omogenizarea componentei volatilizabile aplicate pe partea inferioară a podișorului, datorită acțiunii de ventilare realizate de albinele care zboară spre hrănitorul de pe podișor.

În continuare invenția va fi descrisă prin prezentarea unor exemple de realizare.

Exemplul 1. Într-un vas de amestecare se amestecă în proporție geometrică 1 g stearat de magneziu (Parteck[®] Lub MST, Merck, Darmstadt, Germania), 4,24 g de acid p-cumaric, denumire IUPAC acid (E)-3-(4-hidroxifenil)-2-propenoic (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, SUA), 4,66 g de acid cafeic, denumire IUPAC acid 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoic, (Cayman Europe, Talin, Estonia), 44,5 g maltol, denumire IUPAC 3-hidroxi-2-metil-4H-piran-4-onă (Otsuka Chemical, Naruto, Japonia), 45,5 g fructo-oligozaride cu mai puțin de 10 resturi de hexoze în moleculă (Orafti[®]P95, Orafti-Beneo, Tienen, Belgia), 362 g bicarbonat de sodiu (carbonat acid de sodiu Emprove[®], Merck), 165 g acid citric, denumire IUPAC acid 2 hidroxi-1,2,3-propan tricarboxilic (Citric Acid Anhydrous Fine Granular 16/40, Citrique Belge, Tienen, Belgia), 124 g acid tartric, denumire IUPAC acid 2,3-dihidroxisuccinic (tartaric acid, Emprove[®], Merck), 248 g amestec dextroză – maltoză cristalizat prin pulverizare (Emdex[®], Edward Mendell, Carmel, NY, SUA). Ingredientele se usucă în etuvă la 105°C, timp de 4 ore, și apoi se tablează direct pe o presă de tabletat EP-1 (Erweka, Heusenstamm, Germania), în matrițe cu diametrul de 18 mm, la o presiune de 1,8.. 2 tone forță. Se obțin tablete de 1±0,035 grame, care au o duritate de 9,2 până la 10,5 kPa, și un timp de dezagregare cuprins între 60 și 80 secunde. În funcție de umiditatea relativă a mediului compoziția tabletelor este de 0,395-0,41 părți acid p-cumaric, 0,395-0,45 părți acid cafeic, 4,15-4,3 părți maltol, 4,25-4,4 părți fructo-oligozaharide cu mai puțin de 10 resturi de hexoze în moleculă, 0,97-1 părți stearat de magneziu, 33,9-35 părți bicarbonat de sodiu, 15,5-16 părți acid citric, 11,6-12 părți acid tartric, 23,3-24 părți amestec dextroză – maltoză cristalizat prin pulverizare, apă până la 100 părți.

Tabletele se ambalează separat în folie laminată tri-strat, polipropilenă – aluminiu – polietilentereftalat, care reprezintă o barieră la umiditatea atmosferică, asigurând o stabilitate la păstrare superioară.

Optimizarea raportului dintre acizii hidroxicinamici, p-cumaric și cafeic, și maltol, s-a realizat cu ajutorul unor experimente programate prin tehnica suprafețelor de răspuns, cu ajutorul soft-ului Design-Expert® v.9.0 (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA). S-au folosit două bioteste, prin care s-a urmărit efectul diferitelor combinații de maltol și acizi hidroxicinamici, p-cumaric și cafeic, asupra creșterii lactobacteriilor fructofilice și asupra stresului oxidativ și inducerii CYP9Q, enzimă din clasa citocrom P450 monooxigenazelor cu rol cheie în sistemele de apărare din albine (Mao *et al.*, 2013, PNAS, 110:8842-8846).

Tulpina de *Lactobacillus kunkeei* DSM 12361, care este una din lactobacteriile fructofilice benefice albinelor (Endo și Salminen, 2013, System. Appl. Microbiol., 36, 444-448), a fost cultivată în prezență de maltol, acizi hidroxicinamici, p-cumaric și cafeic, și amestec de maltol și acizi hidroxicinamici în diferite proporții, pe mediu lichid fructoză – extract de drojdie – polipeptonă (FYP) cu următoarea formulă: 300 g/l fructoză, 10 g/l extract drojdie, 5 g/l polipeptonă, 2 g/l acetat de sodiu trihidrat, 10 ml/l Tween 80, 0,02 g/l MgSO₄·7H₂O, 0,02 g/L MnSO₄·4H₂O, 2 g/L of FeSO₄·7H₂O, 2 g/L NaCl. Raportul de 4,1 părți acid p-cumaric, 4,5 părți acid cafeic și 43 părți maltol, determinat ca fiind optim în privința stimulării dezvoltării bacteriilor *L. kunkeei*, a fost retestat în condiții de laborator, folosind 400 g/l sirop de fructoză – glucoză (Isosugar 031™, Tate and Lyle, Londra, Marea Britanie, cu 74,8% substanță uscată, din care 50,2% este reprezentată de fructoză) în loc de 300 g/l fructoză. Rezultatele, prezentate în tabelul 1 de mai jos, arată că acizii hidroxicinamici compensează efectele negative ale maltolului asupra lactobacililor fructofilici.

Tab. 1. Efectul maltolului, acizilor hidroxicinamici, p-cumaric și cafeic, și al amestecului acestora asupra dezvoltării lactobacteriilor fructofilice *L. kunkeei*.

Variantă experimentală	Dezvoltare cultură (% martor)	Producere acid lactic (% martor)
Mediu FYP cu sirop de fructoză - glucoză	100%	100%
Mediu FYP cu sirop de fructoză – glucoză + 21,5 mg/l maltol	76,8	67,9
Mediu FYP cu sirop de fructoză – glucoză + 2,05 mg/l acid p-cumaric și 2,25 mg/l acid cafeic	123,5	112,5
Mediu FYP cu sirop de fructoză – glucoză+ 21,5 mg/l maltol, 2,05 mg/l acid p-cumaric și 2,25 mg/l acid cafeic	107,4	104,8

Pentru testarea efectului maltolului, acizilor hidroxicinamici, p-cumaric și cafeic, și a amestecului lor, asupra stres-ului oxidativ și inducerii CYP9Q, 15 albine lucrătoare cu vârsta de 1 zi au fost plasate în cutii de plastic de 500 ml, acoperite cu tifon, și hrănite cu 1 g de turtă glucidică (martor) sau 1 g turtă glucidică la care s-au adăugat compușii de testat. Turta glucidică s-a obținut din părți egale de zahăr pudră și sirop de fructoză – glucoză (Isosugar 031TM, Tate and Lyle). În siropul de fructoză - glucoză s-au omogenizat în prealabil compușii de testat. După trei zile abdomenele albinelor au fost prelevate prin disecție, înghețate în azot lichid, și stocate la -80°C, în vederea extragerii ARN pentru analiza exprimării CYP9Q și pentru determinarea peroxizilor lipidici (ca malondialdehidă), ca markeri ai stresului oxidativ. ARN a fost extras din abdomenele înghețate prin metoda TRIzol (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA), tratate cu DNase (Ambion[®] protocol, Thermo Fisher Scientific) și utilizate pentru analiză cantitativă a exprimării CYP9Q prin RT-PCR, conform procedurii descrise de Mao *et al.*, 2011 (PNAS, 108, 12657-12662). Peroxizii lipidici au fost determinați ca malondialdehidă, cu acid tiobarbituric (Rael *et al.*, 2004, J. Biochem. Mol. Biol., 3, 749–752).

Rezultatele, prezentate în tabelul 2 de mai jos, arată că acizii hidroxicinamici limitează efectul pro-oxidant al maltolului în organismul albinelor și că determină o inducere semnificativă a exprimării CYP9Q.

Tab. 2. Efectul maltolului, acizilor hidroxicinamici, p-cumaric și cafeic, și al amestecului acestora asupra stres-ului oxidativ și inducerii CYP9Q, enzimă din clasa citocrom P450 monooxigenazelor cu rol cheie în sistemele de apărare din albine.

Variantă experimentală	Stres oxidativ - MDA (% martor)	Inducere CYP9Q (% martor)
Turtă glucidică cu zahăr și sirop de fructoză - glucoză	100%	100%
Turtă glucidică cu zahăr și sirop de fructoză - glucoză + 4,3 μg/g maltol	123,7%	102,9
Turtă glucidică cu zahăr și sirop de fructoză - glucoză + 0,41 μg/g acid p-cumaric și 0,45 μg/g acid cafeic	73,5	164,7
Turtă glucidică cu zahăr și sirop de fructoză - glucoză + 4,3 μg/l maltol, 0,41 μg/l acid p-cumaric și 0,45 μg/l acid cafeic	92,4	174,6

*MDA – malondialdehidă, marker pentru stresul oxidativ, formată din peroxizi lipidici, determinată cu acid tiobarbituric

Exemplul 2. La începutul culesului sau în perioadele lipsite de cules se aplică un prim tip de tratament combinat. Se dizolvă o tabletă efervescentă de 1 g în 100 ml

apă potabilă, urmată de diluarea cu sirop (invertit) de zahăr sau sirop de glucoză-fructoză din porumb, în raport de 1:1, în cazul soluției destinate utilizării pentru stropirea corpului stupului, sau în raport de 1:9 a celei utilizate ca supliment în hrana albinelor. Soluția diluată în raport 1:1 cu hrană pentru albine se aplică prin stropire pe partea inferioară a podișorului care acoperă ramele, pentru stimularea preponderentă a imunității sociale mediate de compuși chimici volatili. Soluția diluată în raport de 1:9 cu hrană de albine se aplică în hrănitorul de podișor. Atragerea albinelor în zona de vaporizare a soluției aplicate pe partea inferioară a podișorului favorizează expunerea albinelor și a paraziților de pe albine la acțiunea vaporilor de maltol și omogenizează vaporii în stup sub acțiunea curenților de aer asociați zborului albinelor.

Procedeul de aplicare a fost experimentat în primăvara anului 2014, într-o perioadă cu lipsă temporară de nectar, între sfârșitul culesului la salcâm și înainte de începerea culesului la floarea-soarelui. Experimentul s-a realizat în cadrul unei singure stupine, și a inclus următoarele variante experimentale: V_1 – martor netratat; V_2 – tratament cu 1,8 kg de sirop de zahăr invertit (Apiinvert[®], Agrana, Viena, Austria) în care s-au omogenizat 200 ml soluție rezultată prin dizolvarea a 2 tablete efervescente conform Ex.1, aplicat în hrănitorul de podișor; V_3 – tratament cu 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă efervescentă conform Ex.1, cu 100 g sirop invertit de zahăr (Apiinvert[®], Agrana), prin stropire pe podișor; V_4 - tratament combinat, cu 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă efervescentă conform Ex.1, cu 100 g sirop invertit de zahăr (Apiinvert[®], Agrana), prin stropire pe podișor, tratament cu 1,8 kg de sirop de zahăr invertit (Apiinvert[®], Agrana) în care s-au omogenizat 200 ml soluție rezultată prin dizolvarea a 2 tablete efervescente conform Ex.1, aplicat în hrănitorul de podișor. Fiecare variantă experimentală a inclus patru repetiții, fiecare repetiție incluzând câte 3 stupi, fiecare stup având 15.000 albine; randomizarea celor patru variante în patru repetiții a fost făcută în pătrat latin.

Stupii au fost cântăriți la începutul perioadei de experimentare și după 4 săptămâni de experimentare. Monitorizarea în timp a efectului produsului asupra infestării cu acarieni a fost realizată prin folosirea unei foi de carton depusă pe fundul anti-*Varroa*, pe care s-au înregistrat acarienii morți. Monitorizarea evoluției ascosferozei s-a realizat prin numărarea zilnică a larvelor moarte (puiet văros, simptom infecție *Ascospaera apis*) scoase la urdiniș. Datele obținute în cadrul

experimentului s-au prelucrat prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA).

Rezultatele sunt prezentate în tab.3. Aceste rezultate demonstrează o eficacitate bună a produsului realizat și aplicat conform invenției, concomitent prin stropire a soluției care acționează prin vaporizare pe podișor, pentru stimularea imunității sociale, și ca supliment în hrana albinelor a emulsiei destinate stimulării sistemelor de apărare la nivelul fiecărei albine.

Tab. 3. Eficacitatea produsului conform invenției, aplicat concomitent ca stropire a soluției care acționează prin vaporizare și ca supliment în hrana albinelor a soluției pentru stimularea albinelor*.

Tratament	Acarieni morți (nr. mediu pe săptămână)	Puiet văros (nr. mediu larve pe săptămână)	Variație masă stup (kg)
V ₁ martor netratat	172c	224c	2,25c
V ₂ tratament cu 1,8 kg de sirop de zahăr invertit în care s-au omogenizat 200 ml soluție rezultată prin dizolvarea a 2 tablete efervescente conform Ex.1, aplicat în hrănitorul de podișor	368ab	98b	3,07b
V ₃ tratament cu 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă efervescentă conform Ex.1, cu 100 g sirop invertit de zahăr, prin stropire pe podișor	312b	105b	2,94b
V ₄ - tratament combinat, cu 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă efervescentă conform Ex.1, cu 100 g sirop de zahăr invertit, prin stropire pe podișor, tratament cu 1,8 kg de sirop de zahăr invertit, în care s-au omogenizat 200 ml soluție rezultată prin dizolvarea a 2 tablete efervescente conform Ex.1, aplicat în hrănitorul de podișor	402a	72a	3,36a

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru $P > 0,05$

Exemplul 3. În cadrul tratamentelor stupului din timpul toamnei, ca pregătire de iernare, se aplică un al doilea tip de tratament combinat. Se dizolvă o tabletă efervescentă de 1 g în 100 ml apă potabilă, urmată de diluarea cu sirop (invertit) de zahăr sau sirop de glucoză-fructoză din porumb, în raport de 1:1. Soluția rezultată se aplică prin stropire, pe partea inferioară a podișorului care acoperă ramele, pentru stimularea preponderentă a imunității sociale mediate de compuși chimici volatili, și prin stropire în același timp, pe ramele cu albine și pe albine, pentru stimularea comportamentului de deparazitare reciprocă a albinelor. Este recomandat ca

tratamentul acesta combinat să se realizeze împreună cu aplicarea unui tratament pe bază de produse volatile anti-*Varroa* naturale, uleiuri esențiale sau acid formic. Scopul unui astfel de tratament este de a realiza o asociere a acțiunilor de protecție a stupului contra atacului de *Varroa destructor*, prin combinarea efectului -cid specific al vaporilor de timol cu efectul de deparazitare prin curățire reciprocă a albinelor („grooming”), stimulat prin stropire cu sirop care reprezintă hrană pentru albine, amestecat cu maltol, acizi hidroxicinamici, p-cumaric și cafeic, și fructo-oligozaharide.

Procedeul de aplicare a fost experimentat în toamna anului 2013, la sfârșitul lunii septembrie, într-o perioadă în care temperatura medie din timpul zilei a variat între 16,8 și 23,5°C, fiind peste cea de 15°C recomandată pentru tratamentele în care timolul se aplică pentru evaporare ulterioară. Experimentul a fost realizat în cadrul unei singure stupine, și a inclus următoarele variante experimentale: V₁ – mator netratat; V₂ – tratament cu un produs etalon pe bază de timol aplicat prin vaporizare (Apiguard[®], 2 tăvițe a 50 g gel, 12,5 g timol per tăviță, deasupra ramelor, sub podișor); V₃ – tratament cu un produs etalon pe bază de timol aplicat prin vaporizare (Apiguard[®], 2 tăvițe deasupra ramelor, sub podișor) și cu 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă efervescentă conform Ex.1, cu 100 g sirop de glucoză – fructoză din porumb (Isosugar 031[™], Tate and Lyle) aplicat prin stropirea podișorului; V₄ - tratament cu un produs etalon pe bază de timol aplicat prin vaporizare (Apiguard[®], 2 tăvițe deasupra ramelor, sub podișor) și cu 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă efervescentă conform Ex.1, cu 100 g sirop de glucoză – fructoză din porumb (Isosugar 031[™], Tate and Lyle), aplicată prin stropirea ramelor de albine și a albinelor, cu ajutorul unei pompe de mână, pe ramele expuse prin ridicare parțială a corpului superior al stupului; V₅ - tratament cu câte 200 g de soluție, rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă efervescentă conform Ex.1, cu 100 g sirop de glucoză – fructoză din porumb (Isosugar 031[™], Tate and Lyle), aplicate prin stropire pe podișor și, respectiv, pe ramele de albine și albine. Fiecare variantă experimentală a inclus cinci repetiții, fiecare repetiție incluzând câte 3 stupi, fiecare stup având 15.000 albine; randomizarea celor cinci variante în cinci repetiții a fost făcută în pătrat latin.

Înainte de aplicarea tratamentelor s-au prelevat câte 300 de albine din câte trei rame pe care s-a determinat gradul de infestare prin utilizare metodei propuse de

De Jong *et al.*, 1982, *Apidologie* 13:297-303. Pentru diagnosticarea prezenței *Varroa* pe puiet au fost inspectate, prin deschidere, câte 100 celule de puiet de lucrătoare din fiecare stup. Pe baza rezultatelor coloniile au fost împărțite în trei categorii de infestare cu *Varroa*, scăzut, mediu, ridicat, iar fiecare repetiție a inclus câte o colonie din fiecare categorie de infestare.

Monitorizarea în timp a efectului produsului asupra infestării cu acarieni a fost realizată prin folosirea unei foi de carton depusă pe fundul anti-*Varroa*, pe care s-au înregistrat acarienii morți. La sfârșitul perioadei de experimentare de 4 săptămâni s-a procedat din nou la o estimare a infestării cu acarieni din stupii folosiți în experiment, prin prelevarea a câte 300 albine per colonie și a câte 100 de larve. Eficacitatea fiecărui tratament a fost estimată prin calcularea unui indice de reducere = (indicele inițial – indicele final) / indicele inițial x 100. Datele obținute în cadrul experimentului s-au prelucrat prin analiza varianței (Statistica 10, StatSoft, Tulsa, OK, SUA). Rezultatele sunt prezentate în tab. 4.

Tab. 4. Eficacitatea produsului conform invenției, stropiri efectuate în același timp, pe corpul stupului a emulsiei care acționează prin vaporizare, și pe ramele cu albine și pe albine, a emulsiei care acționează prin stimularea albinelor*

Tratament	Eficacitate anti- <i>Varroa</i> (%)	Acarieni morți (nr. mediu pe săptămână)	Puiet văros nr. mediu larve pe săptămână)
V ₁ martor netratat	-	187e	164d
V ₂ Apiguard®, 2 tăvițe a 50 g gel, 12,5 g timol per tăviță	63,2b	537c	132c
V ₃ Apiguard®, 2 tăvițe a 50 g gel, și 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă Ex.1, cu 100 g sirop de glucoză – fructoză aplicat prin stropirea podișorului	67,4ab	642b	98b
V ₄ - Apiguard®, 2 tăvițe a 50 g gel, și 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă Ex.1, cu 100 g sirop de glucoză – fructoză aplicat prin stropirea albinelor și ramelor	72,5a	797a	105b
V ₅ - tratament cu câte 200 g de soluție rezultată prin diluarea a 100 ml soluție în care s-a dizolvat 1 tabletă Ex.1, cu 100 g sirop de glucoză – fructoză din porumb, aplicate prin stropire pe podișor și pe ramele de albine și albine.	51,2c	424d	72a

*valorile urmate de aceeași literă nu diferă semnificativ pentru P>0,05

Aplicarea concomitentă a produsului comercial gel destinat acțiunii prin volatilizare și a unei stropiri a ramelor și albinelor cu soluția care conține 1 g/l

compoziție conform Ex.1, diluată în sirop de fructoză - glucoză în raport de 1:1, a dus la o creștere semnificativă a eficacității de combatere a acarienilor *Varroa destructor*. O creștere a eficacității de combatere a acarienilor se constată și în cazul aplicării unei soluții de 1 g/l din compoziția conform Ex.1, diluată în sirop de fructoză – glucoză, în raport de 1:1, care este peste cea a compusului comercial gel aplicat singur, însă la limita asigurării statistice. Aplicarea concomitentă a soluției care conține 1 g/l compoziție conform Ex.1, diluată în sirop de fructoză - glucoză în raport de 1:1, ca tratament aplicat prin stropire pe podișor și pe ramele de albine și pe albine determină o creștere suplimentară a eficacității de combatere a acarienilor paraziți de către timolul din produsul comercial, dar această creștere nu a fost asigurată statistic în condițiile experimentale date.

Soluția de 1 g/l din compoziția conform Ex.1, diluată în sirop de fructoză - glucoză 1:1, aplicată ca tratament combinat, prin stropirea podișorului și a ramelor de albine și a albinelor, are un efect de combatere a acarienilor paraziți sub cea a produsului comercial gel care include timol, dar eficacitatea de combatere a bolilor fungice este semnificativ crescută.

Aceste rezultate demonstrează o eficacitate bună a produsului realizat conform invenției, aplicat conform invenției, prin stropiri efectuate în același timp, pe corpul stupului a soluției care acționează prin vaporizare, și pe ramele cu albine și pe albine, a soluției care acționează prin stimularea comportamentului de curățare reciprocă a albinelor. Compoziția include componente caracteristice polenului, acid p-cumaric, prezent în sporopolenina specifică polenului, și oleorezinelor din propolis – acidul cafeic. Această compoziție cu ingrediente caracteristice polenului și propolisului are o eficacitate ridicată în combaterea patogenilor fungici și prezintă un efect adjuvant cu produsele naturale utilizate pentru combaterea acarienilor paraziți. Stimularea sistemelor de apărare, de la nivelul albinelor individuale și de la nivelul stupului, determină și o stimulare a dezvoltării familiilor de albine în perioadele lipsite de cules semnificativ.

Revendicări

1. Supliment nutraceutic pentru familiile de albine **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din 0,395 - 0,41 părți acid p-cumaric, 0,395 - 0,45 părți acid cafeic, 4,15 - 4,3 părți maltol, 4,25 - 4,4 părți fructo-oligozaharide cu mai puțin de 10 resturi de hexoze în moleculă, 0,97 - 1 părți stearat de magneziu, 33,9 - 35 părți bicarbonat de sodiu, 15,5 - 16 părți acid citric, 11,6 - 12 părți acid tartric, 23,3 - 24 părți amestec dextroză – maltoză cristalizat prin pulverizare, apă până la 100 părți.

2. Procedul de administrare a suplimentului nutraceutic pentru familiile de albine **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: dizolvarea a 1 g din compoziția de mai sus predozată, formulată ca tabletă efervescentă, în 100 ml apă, urmată de diluarea cu sirop (invertit) de zahăr sau sirop de glucoză-fructoză din porumb, în raport de 1:1, în cazul soluției destinate utilizării pentru stropirea corpului stupului sau a ramelor de albine și a albinelor, sau în raport de 1:9 a celei utilizate ca supliment în hrana albinelor, aplicarea în același timp, în cadrul tratamentelor de toamnă înaintea iernării, prin stropire pe corpul stupului și prin stropire pe ramele cu albine și pe albine, a soluției formate prin diluare în raport 1:1 cu hrană pentru albine, sau aplicarea concomitentă, în perioadele de început de cules sau de lipsă de nectar, prin stropire pe corpul stupului a soluției formate prin diluare în raport 1:1, și ca supliment nutraceutic stimulatîv în hrana albinelor, a soluției diluate în raport de 1:9 în hrană pentru albine.