



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NOVA ESTRATÉGIA DE COMBATE À VARROOSE DA  
ABELHA (*APIS MELLIFERA*) EM PORTUGAL: TRATAMENTO COMBINADO DE  
ACARICIDAS HOMOLOGADOS

MATHIEU ANTOINE ALVES PASCOAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Presidente**

Doutora Yolanda Maria Vaz

**Vogais**

Doutor José Farraia e Silva Meireles

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Engenheira Joana Segurado Pimenta  
Godinho

ORIENTADORA

Prof.<sup>a</sup> Adjunta Joana Segurado Pimenta  
Godinho

CO-ORIENTADOR

Prof. Doutor Luís Manuel Madeira de  
Carvalho

2012

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE NOVA ESTRATÉGIA DE COMBATE À VARROOSE DA  
ABELHA (*APIS MELLIFERA*) EM PORTUGAL: TRATAMENTO COMBINADO DE  
ACARICIDAS HOMOLOGADOS

MATHIEU ANTOINE ALVES PASCOAL

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

**Presidente**

Doutora Yolanda Maria Vaz

**Vogais**

Doutor José Farraia e Silva Meireles

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Engenheira Joana Segurado Pimenta  
Godinho

ORIENTADORA

Prof.<sup>a</sup> Adjunta Joana Segurado Pimenta  
Godinho

CO-ORIENTADOR

Prof. Doutor Luís Manuel Madeira de  
Carvalho

2012

LISBOA

---

Dedico às mulheres da minha vida,

Carina e Kyara.



## **Agradecimentos**

Depois de 6 anos de tanto trabalho e esforço, mas também de grande felicidade e conhecimento, quero agradecer todo o apoio recebido, tanto a nível pessoal como académico.

Em relação à vida académica, quero agradecer imenso à Prof.<sup>a</sup> Joana Godinho por me introduzir no mundo da apicultura, o qual me era completamente desconhecido, por tanto apoio a nível deste trabalho e mesmo em relação ao meu futuro laboral.

Ao Professor Doutor Luís Carvalho, que aumentou o meu gosto pelos insetos, nomeadamente os que gostam de parasitar, e por ser um tão bom professor, muito obrigado.

À Dr.<sup>a</sup> Maria José Valério, por me orientar no mundo da sanidade apícola e por estar sempre disposta a ajudar, agradeço-lhe imenso. Também agradeço às colegas do Laboratório de Patologia Apícola do LNIV, por me terem integrado tão bem na equipa.

À Hifarmax e ao Dr. Filipe Nunes, agradeço a possibilidade de fazer parte deste ensaio.

Ao Engenheiro Carlos Relva, agradeço toda a preciosa ajuda e camaradagem.

Ao Engenheiro Nuno Costa, por tanta sabedoria transmitida e pelos seus bons conselhos, só lhe posso agradecer.

Quero agradecer à minha namorada Carina por me ter apoiado e guiado ao longo destes 12 anos, e por ter sido a melhor madrinha académica que a FMV já viu. Quero também agradecer à minha filhota, que apesar de ter apenas 1 ano tanto mudou a minha vida. As noites passaram a ser mais “animadas”, mas compensa muito toda a felicidade que tenho desde que nasceu. Adoro-vos e sabem disso!

Aos meus pais, muito obrigado por terem sempre apoiado as minhas decisões fosse o que fosse...

Às minhas irmãs, Sarah e Tess... a nossa convivência na infância foi espetacular, espero que continue assim por muito mais tempo.

Aos meus cunhados por me ajudarem a descontrair: Nuno, Diogo, David e Sara, muito obrigado.

Aos meus avós e tios, agradeço as boas memórias que me trouxeram e espero continuem a trazer por muitos mais anos.

Por fim, mas não com menor importância, quero agradecer aos meus colegas e amigos por tanta camaradagem e amizade ao longo destes 6 anos. Ana, Diogo, Inês, Isabel, Marta e Pedro, vocês são espetaculares!



Avaliação da eficácia de nova estratégia de combate à varroose da **abelha** (*Apis mellifera*) em Portugal: Tratamento combinado de acaricidas homologados.

## Resumo

A morte e o desaparecimento de colónias de abelhas (*Apis mellifera*) e mesmo de apiários inteiros têm vindo a preocupar cientistas do mundo inteiro. Várias doenças e outros fatores foram associados ao *colony collapse disorder* (distúrbio do colapso das colmeias). Os ácaros da espécie *Varroa destructor* são apontados como um dos principais culpados deste problema. Com o crescente aparecimento de resistência aos acaricidas por parte de *Varroa* sp., devido à utilização sucessiva da mesma molécula ou por má aplicação destes, criou-se uma necessidade de desenvolver novos métodos de combate a este parasita. A utilização de protocolos de tratamento combinando mais de um acaricida, têm-se apresentado como uma boa alternativa à utilização convencional de apenas um medicamento. O principal objetivo deste estudo realizado no Posto Apícola da Tapada da Ajuda (em Lisboa), consistiu em determinar a eficácia e qual o melhor método de aplicação de dois acaricidas homologados em Portugal no controlo de *Varroa destructor*. Assim, foram estabelecidos dois grupos de colónias para o estudo, um deles em que foi aplicado em primeiro lugar timol (Thymovar®) e depois o fluvalinato (Apistan®) (TA; n=10) e outro em que se aplicou em primeiro lugar o fluvalinato e depois o timol (AT; n=10).

Para determinar o valor de eficácia de tratamento, foi aplicado um terceiro acaricida como controlo (amitraz). Foi contabilizada a queda de Varroas três vezes por semana, do momento de aplicação do primeiro acaricida, até perfazer duas semanas após a aplicação do acaricida controlo.

A média de eficácia do grupo TA foi de 87,3%, apresentando valores mínimo e máximo de 72,6% e 97,9%, respetivamente. O grupo AT apresentou média de eficácia 91,2%, com valores entre 72,1% e 99%. Comparando os valores de média dos dois grupos, conclui-se que não apresentaram diferença significativa ( $p=0,304$ ), aplicando um teste-t não emparelhado. Foram medidas as temperaturas mínimas e máximas, e a partir daí a temperatura média. Vários picos de valores de queda de *Varroa* são consistentes com o aumento da temperatura, o que indica haver uma possível relação entre estes.

Apesar de não ter sido encontrada diferença entre os dois grupos, os valores de eficácia obtidos foram superiores aos obtidos nos últimos anos em Portugal, aquando da aplicação de apenas um acaricida. Podemos assim concluir que estes protocolos terapêuticos são ambos uma boa escolha para o controlo de *Varroa destructor*, de preferência juntamente com outras técnicas de manejo que reduzam a reprodução destes ácaros.

**Palavras-chave:** *Apis mellifera*, *Colony collapse disorder*, *Varroa destructor*, tratamento combinado, fluvalinato, timol, Portugal.



Efficacy evaluation of a new strategy against *Varroa destructor* in **honey bees** (*Apis mellifera*) in Portugal: combined treatment with approved acaricides.

## **Abstract**

Death and disappearance of bee colonies (*Apis mellifera*) and entire apiaries increased worldwide. Several diseases have been associated to the Colony collapse disorder, and the mite *Varroa destructor* infestation has been noted as one of the main causes of the problem. The increasing emergence of tolerance to acaricides by *Varroa* sp., due to successive use of the same molecule or wrong use of these chemicals, lead to the development of new methods to control this parasite. New protocols combining more than one acaricide have shown to be a good alternative to conventional use of only one drug.

The main objective of this study accomplished at *Posto Apícola* in Tapada da Ajuda (Lisbon, Portugal), was to determine the efficacy and the best method to fight *Varroa destructor* using two acaricides approved in Portugal. Thus, two groups of colonies were established, one that used first thymol (Thymovar®) and then fluvalinate (Apistan®) (TA, n=10), and the other using fluvalinate first and then thymol (AT, n=10).

To assess the efficacy of treatment, a third treatment with amitraz was used as control. Mites fall was measured three times in a week, during the assay, starting at the first treatment and ending two weeks after the control treatment.

The mean efficacy of the treatment protocol for TA group was 87.3%, with 72.6% as a minimum and 97.9% as a maximum. The group AT presented a mean efficacy of 91.2%, with values between 72.1% and 99%. It was concluded, after the statistical analysis with unpaired T-test, that no significant difference ( $p=0,304$ ) was found between the two groups.

The average temperature was calculated with measurement of minimum and maximum daily temperature, and indicated a possible link between these and mite population profile, as several peaks of *Varroa* fall were consistent with temperature peaks.

Although no difference was found between the groups, efficacy results were higher than others obtained in the last years in Portugal, when only one acaricide is used. So, both protocols are a good choice to fight *Varroa destructor*, along with management techniques that reduce the reproduction of these mites.

**Keywords:** *Apis mellifera*, Colony collapse disorder, *Varroa destructor*, tratamento combinado, fluvalinate, thymol, Portugal.



## Índice

---

1. Introdução.....	1
2. Atividades desenvolvidas no estágio curricular.....	3
3. Revisão bibliográfica.....	7
3.1 - Produção Apícola Nacional – Panorama atual .....	7
3.2 - Biologia da Abelha .....	8
3.3 - Doenças das abelhas.....	11
3.3.1 - Loque americana e loque europeia.....	12
3.3.2 - Ascosferiose .....	13
3.3.4 - Doenças provocadas por vírus .....	14
3.3.5 - Nosemose .....	14
3.3.6 - Braulose .....	15
3.3.7 - Parasitismo por traças da cera .....	15
3.3.8 - Senotainiose.....	16
3.3.9 - Acarapisose.....	17
3.3.10 - Varroose .....	17
3.3.10.1 - Biologia da <i>Varroa destructor</i> .....	17
3.3.10.2 - Sinais, consequências da varroose e o seu diagnóstico.....	21
3.3.10.3 - Meios de combate .....	23
3.3.10.3.1 - Maneio.....	24
3.3.10.3.2 - Medidas naturais .....	27
3.3.10.3.3 - Compostos de síntese .....	27
• Fluvalinato - Apistan®.....	28
• Timol - Thymovar®.....	29
• Amitraz - Apivar®.....	30
• Utilização de acaricidas em Portugal.....	31
• Eficácia no combate à varroose .....	31
3.3.10.4 - Protocolos terapêuticos para o combate ao ácaro <i>Varroa destructor</i> .....	33
3.3.11 - Doenças provocadas por outros seres.....	35

4. Ensaio terapêutico .....	36
4.1 - Materiais e métodos .....	36
4.1.1 - Objetivo do ensaio .....	36
4.1.2 - Local do ensaio - Apiário do Posto Apícola .....	36
4.1.3 - Abelhas e colmeias utilizadas .....	36
4.1.4 - Maneio habitual aplicado no Posto Apícola.....	37
4.1.5 - Estrados sanitários .....	37
4.1.6 - Desenho experimental .....	38
4.1.7 - Avaliação da força das colónias.....	39
4.1.8 - Medições e análises .....	41
4.1.8.1 - Força das colónias .....	41
4.1.8.2 - Dados meteorológicos.....	41
4.1.8.3 - Contagem de queda de Varroas em $T_0$ .....	41
4.1.8.4 - Contagem de queda de Varroas durante o tratamento .....	41
4.1.8.5 - Eficácia de tratamento.....	41
4.1.8.6 - Amostras analisadas no LNIV .....	42
4.1.9 - Registo e análise de dados.....	42
4.2 - Resultados .....	42
4.2.1 - Força das colónias.....	42
4.2.2 - Dados meteorológicos durante o ensaio .....	44
4.2.3 - Queda de Varroas em $T_0$ .....	45
4.2.4 - Contagem de queda de Varroas .....	46
4.2.5 - Eficácia de tratamento .....	48
4.2.6 - Amostras analisadas no LNIV .....	50
5. Discussão .....	51
6. Conclusão.....	57
7. Bibliografia .....	59
Anexos.....	68
Anexo 1 – Dados meteorológicos durante o primeiro tratamento (estação meteorológica da Tapada da Ajuda).....	68

Anexo 2 – Dados meteorológicos durante o segundo tratamento (estação meteorológica da Tapada da Ajuda).....	69
Anexo 3 – Dados meteorológicos durante o tratamento controlo (estação meteorológica da Tapada da Ajuda).....	70
Anexo 4 – Queda estimada de <i>Varroa</i> em 24 horas no momento $T_0$ e durante a aplicação do primeiro acaricida.....	71
Anexo 5 – Queda estimada de <i>Varroa</i> em 24 horas durante a aplicação do segundo acaricida.....	72
Anexo 6 – Queda estimada de <i>Varroa</i> em 24 horas durante a aplicação do acaricida controlo.....	73
Anexo 7 – Análise estatística.....	74
Anexo 8 – Resultados das amostras analisadas no LNIV provenientes das colmeias em estudo.....	75
Anexo 9 – Resultados das amostras analisadas no LNIV provenientes das colmeias do apiário não incluídas no estudo.....	76

## Índice de Figuras

---

Figura n.º 1 – Gota de hemolinfa no local onde foi extirpada a cabeça de uma abelha adulta (fotografia original, 2012). .....	5
Figura n.º 2 – Porção cranial do tórax de abelhas adultas e restante tórax e abdómen (fotografia original, 2012). .....	5
Figura n.º 3 – Sinal típico de loque americana: filamento pastoso (fotografia original, 2012). .....	12
Figura n.º 4 – Larvas mumificadas por <i>Ascospaera</i> sp. na tábuca de voo de uma colmeia (fotografia original, 2011). .....	14
Figura n.º 5 – Larvas mumificadas por <i>Ascospaera</i> sp. no interior de alvéolos (fotografia original, 2012). .....	14
Figura n.º 6 – Ácaro da espécie <i>Acarapis woodi</i> observado ao MOC com ampliação de 40x (fotografia original, 2012). .....	17
Figura n.º 9 - Fêmea de <i>Varroa destructor</i> na cabeça de uma larva de abelha (Martin, 2010). .....	18
Figura n.º 8 – Abelha morta recolhida em tabuleiro sanitário, com várias varroas (fotografia original, 2011). .....	18
Figura n.º 10 - Fase reprodutiva e forética do ciclo de vida da <i>Varroa</i> (adaptado de Rosenkranz, Aumeier & Ziegelmann, 2010). .....	20
Figura n.º 11 – Ciclo de vida da <i>Varroa destructor</i> (adaptado de Allsop, 2006). .....	20
Figura n.º 12 – <i>Varroa destructor</i> em criação de zângãos (fotografia original, 2012). .....	22
Figura n.º 13 – Pormenor da diferença do tamanho de alvéolo de zângão (à esquerda) e de obreira (à direita), em lâmina de cera alveolada (fotografia original, 2012). .....	26
Figura n.º 14 – Colmeia em torre, com dois ninhos e acesso permanente a estes (vanEngelsdorp, Gebauer & Underwood, 2009). .....	26
Figura n.º 15 – Tira de Apistan® colocada entre o 3º e o 4º quadro (fotografia original, 2011). .....	29
Figura n.º 16 – Aplicação de Thymovar® (Hifarmax, 2010). .....	30
Figura n.º 17 – Tiras de Apivar® colocadas no ninho de uma colmeia (fotografia original, 2011). .....	30
Figura n.º 18 – Posto Apícola: edifícios e localização das 4 filas de colónias marcadas com um retângulo vermelho (Adaptado de Google Earth, 2012). .....	37
Figura n.º 19 – Tabuleiro coletor de estrado sanitário (fotografia original, 2011). .....	38
Figura n.º 20 – Detritos de uma colmeia e ácaros da espécie <i>Varroa destructor</i> presentes em tabuleiro coletor ao fim de 48h (fotografia original, 2011). .....	38

Figura n.º 21 – Lateral de quadro de ninho de uma colmeia dividido em quatro partes iguais para avaliação da força da colónia - abelhas adultas (fotografia original, 2011).....	40
Figura n.º 22 – Lateral de quadro do ninho de uma colmeia dividido em quatro partes iguais para avaliação da força da colónia - criação (fotografia original, 2011).....	40

## Índice de Gráficos

---

Gráfico n.º 1 – Curva de crescimento teórica da população de <i>Varroa</i> no verão, na presença de criação de obreiras e zângãos (adaptado de Goodwin & Eaton, 2001). .....	23
Gráfico n.º 2 – Curva de crescimento teórica da população de <i>Varroa</i> na presença de criação de zangãos, com eficácia de tratamento de 99, 90 ou 80% no dia 144 (adaptado de Goodwin & Eaton, 2001). .....	33
Gráfico n.º 3 – Força das colónias em relação às abelhas adultas a 7 de outubro e 2 de dezembro de 2011 .....	43
Gráfico n.º 4 – Força das colónias em relação à criação a 7 de outubro e 2 de dezembro de 2011.....	43
Gráfico n.º 5 - Data de aplicação dos três acaricidas e temperaturas mínimas e máximas diárias registadas na estação meteorológica da Tapada da Ajuda, durante o ensaio. ....	45
Gráfico n.º 6 – Valores de média da queda estimada de Varroas em 24 horas e desvio padrão, nos dois grupos e média geral. Data de aplicação dos três acaricidas.....	47
Gráfico n.º 7 – Percentagem acumulada de queda de Varroas ao longo de todo o ensaio. Data de aplicação dos três acaricidas.....	48
Gráfico n.º 8 – Valores de média da queda estimada de Varroas em 24 horas nos dois grupos, datas de aplicação e média de temperatura diária durante o ensaio. ....	48
Gráfico n.º 9 – Comparação da eficácia de tratamento entre o grupo TA e o grupo AT .....	50

## Índice de Tabelas

---

Tabela n.º 1 – Ciclo evolutivo da criação de <i>Apis mellifera</i> (Adaptado de Cicco, 2011). .....	9
Tabela n.º 2 – Ciclo evolutivo da abelha adulta <i>Apis mellifera</i> (Adaptado de Cicco, 2011).....	10
Tabela n.º 3 – Desenho experimental – Aplicação de acaricidas. ....	39
Tabela n.º 4 – Pontuação na avaliação da força das colónias.....	40
Tabela n.º 5 – Média e valores mínimos e máximos de força das colónias nos dois grupos em estudo – TA e AT.....	44
Tabela n.º 6 – Valores de queda estimada de Varroas em 24 horas no momento $T_0$ .....	46
Tabela n.º 7 – Taxa de eficácia de tratamento, média geral e desvio padrão nos dois grupos em estudo.....	49

## **Lista de abreviaturas**

°C – graus Celsius

µg – micrograma

DGV – Direção Geral de Veterinária

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária (antiga DGV)

DIV – Divisão de Intervenção Veterinária

DL – Decreto-Lei

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

MOC – microscópio ótico composto

n – tamanho da amostra

PA – Posto Apícola

PAN – Programa Apícola Nacional

PSA – Programa Sanitário Apícola

## Vocabulário apícola

- a) «Abelha» o indivíduo de espécie produtora de mel pertencente ao género *Apis* sp., designadamente os da espécie *Apis mellifera*;
- b) «Atividade apícola» a detenção de exploração apícola, com finalidade de obtenção de produtos apícolas, reprodução e multiplicação de enxames, polinização, didática, científica ou outra;
- c) «Apiário» o conjunto de colónias de abelhas nas condições adequadas de produção, incluindo o local de assentamento e respetivas infraestruturas, pertencente ao mesmo apicultor, em que as colónias não distem da primeira à última mais de 100 m;
- d) «Apicultor» a pessoa singular ou coletiva que possua uma exploração apícola;
- e) «Autoridade sanitária veterinária nacional» a Direção-Geral de Veterinária (DGV);
- f) «Colmeia» o suporte físico em que os quadros de sustentação dos favos são amovíveis, que pode ou não albergar uma colónia e a sua produção;
- g) «Colónia» o enxame, suporte físico e respetivos materiais biológicos por si produzidos;
- h) «Cortiço» o suporte físico desprovido de quadros para fixação dos favos, sendo estes inamovíveis, que pode ou não albergar uma colónia e a sua produção;
- i) «Cresta» ato de recolha de mel dos favos de colmeias ou cortiços;
- j) «Enxame» a população de abelhas, que corresponde à futura unidade produtiva, com potencialidade de sobrevivência, produção e reprodução autónomas em meio natural, sem qualquer suporte físico;
- k) «Exploração apícola» o conjunto de um ou mais apiários, incluindo as respetivas infraestruturas de apoio pertencentes ao mesmo apicultor, com exclusão dos locais de extração de mel;
- l) «Núcleo» a colmeia de quadros móveis com capacidade superior a três quadros e inferior a seis quadros;
- m) «Quadro» o caixilho que suporta o favo;
- n) «Transumância» a metodologia de atividade apícola com recurso a transporte para aproveitamento de produções específicas ou melhores florações;
- o) «Zona controlada» a área geográfica reconhecida pela autoridade sanitária veterinária nacional e que cumpra os requisitos previstos no Decreto-Lei n.º 203/2005.



## 1. Introdução

---

Este estágio curricular foi realizado de outubro de 2011 a maio de 2012. Foi composto por três partes distintas, todas ligadas à apicultura. A maior parte do estágio ocorreu no Posto Apícola do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB) em fase de reestruturação para Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV), sito na Tapada da Ajuda, do início de outubro de 2011 a fim de março de 2012; excluindo o período de 8 a 24 de fevereiro desse ano, durante o qual o estágio decorreu no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, nomeadamente no Laboratório de Patologia Apícola. Por fim, realizámos o Curso Técnico de Apicultura organizado pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária de 7 a 9 de maio de 2012.

O trabalho experimental decorreu no Posto Apícola, com exceção da avaliação das amostras colhidas em cada colónia do apiário, a qual foi realizada no LNIV.

A crescente morte e/ou desaparecimento de colónias e mesmo de apiários inteiros, tem instaurado grandes níveis de preocupação a nível mundial. Para tentar perceber o porquê deste acontecimento, têm sido realizados inúmeros estudos nas diversas áreas e sobre várias doenças e problemas que afetam a vida da *Apis mellifera*. Como este inseto é responsável por grande parte da polinização das plantas, o seu desaparecimento seria catastrófico para o planeta, como já o tinha referido Albert Einstein: “*If the bee disappears from the surface of the earth, man would have no more than four years to live. No more bees, no more pollination ... no more men!*”.

Assim, o também conhecido por colapso das colónias ou *colony collapse disorder*, levou à necessidade de formação de grupos onde fossem interligados dados obtidos sobre o tema. Devido às grandes perdas económicas e ecológicas, e sobretudo pela ineficácia na resolução deste problema, principalmente no hemisfério norte, foi criada a rede COLOSS (*Prevention of COlony LOSSes*). Esta rede engloba 55 países de todo o Mundo, que colaboram no desenvolvimento de medidas urgentes de combate e gestão do dilema em causa (COLOSS, 2012)

No intuito de melhorar a saúde da colmeia, foi criada a rede BEE DOC (*Bees in EuropE & the Decline Of Honeybee Colonies*), que engloba 11 parceiros da área da patologia, química, genética e apicultura, de toda a Europa, mas trabalhando em parceria com membros de outros continentes. Tem como principal objetivo colmatar falhas no conhecimento de doenças das abelhas, principalmente da nosemose, varroose, três viroses e dois pesticidas utilizados regularmente na apicultura (tiacloprid e tau-fluvalinato). Estuda também genes ligados a maior resistência à doença e o impacto da atividade apícola na saúde das abelhas, com o objetivo de desenvolver novos métodos de diagnóstico e de

profilaxia. Destes grupos fazem parte especialistas de várias áreas, como biólogos, médicos veterinários e engenheiros (Bee Doc, 2012).

Em Portugal, apenas os médicos veterinários estão habilitados a prescrever medicamentos para o combate do ácaro *Varroa destructor*, tornando-se assim participantes ativos no combate a este parasita. O seu papel também consiste na inspeção de apiários e centrais meleiras, bem como à recolha de amostras biológicas para rastreio de doenças das abelhas.

Os principais objetivos deste trabalho consistiram em realizar uma revisão sobre o manejo apícola em geral, mas sobretudo sobre a varroose e o seu agente; e avaliar a eficácia de combate desta problemática doença, utilizando um tratamento combinado de acaricidas homologados, mais concretamente o Apistan® (fluvalinato) e Thymovar® (timol).

## 2. Atividades desenvolvidas no estágio curricular

---

Durante a fase do trabalho desenvolvida no Posto Apícola foram desempenhadas diversas funções, incluindo as tarefas de um apicultor, na recolha de dados para este estudo, mas também no apoio à organização do próprio trabalho desenvolvido no Posto Apícola e dos cursos e aulas que ali foram realizados nesse período.

Como as tarefas do quotidiano na apicultura são vastas e diferentes consoante a época do ano, estas serão enunciadas por ordem cronológica.

No início de outubro foi realizada a cresta (recolha de favos com mel). A primeira tarefa foi de extração do mel dos favos. Começa-se pela operação de desoperculação que consiste em retirar os opérculos dos alvéolos repletos de mel com o auxílio de um garfo de desopercular. Em seguida, os quadros de mel desoperculados são colocados numa centrífuga de eixo vertical radial com a capacidade para 20 quadros. Procedeu-se à centrifugação a velocidade e tempo adequados, sendo o mel expelido contra as paredes internas do centrífugador escorrendo para o fundo deste. O mel é posteriormente filtrado por um conjunto de 3 filtros de diferentes malhas, que retiram as partículas de cera e outros detritos e em seguida sendo depois colocado em recipientes em aço inoxidável com torneira na parte inferior, onde fica de 30 a 60 dias a decantar, de modo a que as partículas mais pequenas de detritos fiquem à superfície. Recolhe-se essas partículas para frascos de mel que poderão ser filtrados mais tarde. O restante mel é enfrascado utilizando a torneira, em frascos de vidro previamente lavados, secos na estufa a 60 °C e arrefecidos à temperatura ambiente. Os frascos cheios são depois colocados em caixas de cartão numa sala escura e à temperatura ambiente. Durante o tempo de decantação do mel, recolhe-se a cera da tina de desoperculação e lava-se o material utilizado. Esta cera, e outra que provenha de quadros danificados ou derretidos por outros motivos, são purificadas numa caldeira específica para cozer cera, de modo a retirar detritos e própolis nela misturada. Com o produto deste procedimento são feitos “queijos” de cera, que serão posteriormente trocados por cera moldada (pronta a colocar nos quadros), para cosmética, produção de ceras e outras variadíssimas utilizações.

As alças contendo os quadros centrifugados são depois armazenadas em local escuro e à temperatura ambiente, de modo a diminuir a deterioração da cera por traças da ordem Lepidoptera, podendo assim ser recolocada nas colmeias na próxima primavera. Para diminuir a probabilidade de contágio de uma colmeia pelos quadros crestados, estes são lavados em água morna com lixívia (500 mL para aproximadamente 100 L de água) e enxaguados em água corrente. Entretanto, é retirado o excesso de cera das alças com o auxílio de um maçarico, ou levadas à estufa a cerca de 120 °C. Por fim, é feita uma coluna de alças para secar a cera dos quadros, com o auxílio de um desumidificador.

O bom manejo apícola pressupõe visitas regulares ao apiário para observação e deteção de anomalias no comportamento das colónias. Para isso deve-se observar as colmeias, principalmente na parte da frente, a tábua de voo e o solo em redor. Pela quantidade de abelhas que entram e saem das colmeias infere-se sobre a força da colónia e observando o número de abelhas coletoras de pólen e néctar pode aceder-se às diferentes fases do ciclo biológico do enxame, sem ser necessário abrir a colmeia. A presença de sujidade na tábua de voo ou na parte frontal da colmeia, ou de um grande número de abelhas mortas no solo, indicam uma alteração do estado normal da colmeia. Sempre que necessário, deve-se abrir uma ou mais colmeias, podendo, ou não observar-se os quadros um a um. É também importante manter o apiário limpo e impedir que a vegetação cresça perto das colmeias, para diminuir a possibilidade de entrada de outros animais para estas.

Depois da cresta, foi efetuada a avaliação da infestação das colónias por ácaros do género *Varroa*, de modo a saber qual o melhor modo de ação para o combate a este parasita. De seguida, foram colocados os fármacos de combate ao parasita em cada colónia, sendo feita a contagem de queda de Varroas a cada 2ª, 4ª e 6ª feira de modo a avaliar a eficácia dos primeiros.

De 21 de outubro a 2 de dezembro de 2011, foi feita a recolha do material presente nos tabuleiros coletores dos estrados sanitários, e congelados, de modo a possibilitar um estudo futuro sobre o pólen presente e colhido pelas abelhas na Tapada da Ajuda, durante esse período.

Com a observação das colónias, foi possível determinar quais as que necessitavam de intervenção, como por troca de um quadro de outra colónia mais forte ou estreitamento da entrada na colmeia. As colónias que morreram por doença, pilhagem ou outras causas foram recolhidas, colocadas na estufa a 120 °C e higienizadas.

De modo a colocar de novo as alças no início da primavera e de apanhar enxames que saíram das colmeias, foi reparado e preparado o material armazenado. Para além da higienização das ceras do ano anterior, foi necessário esticar arames de quadros já utilizados e colocação de cera alveolada nestes. Foi também necessário preparar os núcleos para enxames mais pequenos.

Para a realização da avaliação de todas as colónias do apiário, foram recolhidas amostras de aproximadamente 50 a 70 abelhas vivas, da cartolina do tabuleiro do estrado higiénico e um pedaço de favo com criação aberta e operculada de cada uma destas, como são recomendados no Anexo 2 do Programa Sanitário Apícola de 2011.

As amostras foram todas analisadas no LNIV, atual LNIAV, sendo realizada observação direta das cartolinas, com intuito de diagnosticar presença de ácaros (*Varroa destructor*), piolhos (*Braula coeca*), larvas de abelha mumificadas por *Ascosphaera* sp., larvas de

*Galleria mellonella*, e ainda outros insetos ou detritos que possam indicar alteração do estado normal da colónia.

A observação de favos com criação aberta e fechadas permite diagnosticar varroose, ascosferiose, galleriose, por observação direta a olho nu ou com o auxílio de uma lupa, mas também de loque americana, por coloração com nigrosina e observação ao microscópio ótico composto (MOC) com ampliação de 1000x, do conteúdo presente em alvéolos suspeitos de ter larvas com esta doença.

As abelhas adultas são congeladas de modo a ser possível manuseá-las com mais facilidade. De seguida, é necessário extirpar a cabeça e o primeiro par de patas. Se necessário, é possível recolher hemolinfa da extremidade do tórax (Figura 1). São então realizados vários cortes da parte cranial do tórax (Figura 2), que são colocados 12 horas em ácido láctico, de modo a ocorrer digestão de músculos, amolecimento da quitina, dilatação das traqueias e esclarecimento dos ácaros da espécie *Acarapis woodi*. Em seguida, estes cortes são colocados em lâminas e observados ao MOC a ampliações de 50x e 100x. Por último, o que resta do corpo da abelha é macerado e observado ao MOC, com o intuito de observar esporos de *Nosema* sp.

Para aperfeiçoar a técnica dos procedimentos e ter contacto com doenças inexistentes no Posto Apícola, foi, no âmbito do estágio, prestado auxílio na análise de amostras provenientes de apicultores de várias zonas do país.

Figura n.º 1 – Gota de hemolinfa no local onde foi extirpada a cabeça de uma abelha adulta (fotografia original, 2012).



Figura n.º 2 – Porção cranial do tórax de abelhas adultas e restante tórax e abdómen (fotografia original, 2012).



Após este período no LNIV, foram realizadas novas avaliações de todas as colónias do Posto Apícola, de modo a saber quais deveriam receber tratamento contra a *Varroa* sp. antes de se colocar as alças. Esta avaliação serviu também para saber quais as colónias com presença de alvéolos reais que tinham de ser destruídos, e quais eram as colónias fortes em que era necessário colocar alças, diminuindo assim a probabilidade de enxamear.

No caso de colónias muito fortes, com alvéolos reais bem desenvolvidos e com grande número de abelhas, foi feito o desdobramento da colónia. Os quadros da colónia inicial foram divididos por dois ninhos, que foram completos com quadros com cera alveolada.

A apanha dos enxames começou a 6 de março, continuando ao longo desse mês. Consistiu, na maior parte das situações, no corte do ramo ou ramos em que se encontravam as abelhas, sendo depois colocado no topo de um ninho ou núcleo com quadros, de modo a que estas lá entrassem. Depois de entrarem todas, foi fechada a colmeia e colocada num local vazio de um suporte. Nos dias seguintes foi aplicado tratamento contra a *Varroa* e fizeram-se observações sucessivas, no intuito de confirmar a presença do enxame, da rainha e mais tarde de ovos.

Foi ainda dado apoio a duas colegas da Escola Superior Agrária de Santarém no início dos seus estágios de Segurança e Higiene Alimentar (Curso de Especialização Tecnológica) e Engenharia da Produção Animal (Licenciatura), de modo a integrá-las no trabalho diário do Posto Apícola e obterem um conhecimento básico sobre apicultura. Foi prestado também apoio na receção de voluntários, explicação e organização das tarefas destinadas a estes. Durante todo o estágio auxiliou-se a venda do mel produzido no Posto Apícola.

Por fim, já depois de terminar a parte prática no Posto Apícola, participou-se no Curso Técnico de Apicultura realizado pela DGAV, juntamente com colegas de DIVs de várias zonas do país e de técnicos de associações de apicultores.

### 3. Revisão bibliográfica

---

#### 3.1 - Produção Apícola Nacional – Panorama atual

A apicultura é uma atividade ligada à agricultura e, em Portugal, existem apenas alguns apicultores com esta atividade como única ou principal fonte de rendimento. Embora tenha como o seu principal interesse a produção de produtos oriundos da colónia (mel, cera, própolis, etc.), o papel das abelhas como polinizadoras, aumentando a diversidade da flora e a produtividade de explorações frutícolas têm um maior impacto na economia do nosso país (Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas [MADRP], 2010).

Para ser apicultor não é preciso ter terreno, podendo alugar ou pedir uma autorização para colocar colónias em terrenos comunitários ou particulares, o que permite a certas pessoas ter abelhas suficientes apenas para produzir mel para autoconsumo, sem necessidade de grande especialização na área (MADRP, 2010).

Segundo dados recolhidos em 18 países europeus, de 1965 a 2005, o número médio de colmeias aumentou de 1965 a 1985 (+ 16,2%), mas diminuiu de 1985 a 2005 (-16,1%), sendo que esta diminuição foi em grande parte na Europa Central. O número de apicultores não apresentou variação de 1965 a 1985 em toda a Europa, devido ao grande aumento na zona mediterrânica e Escandinávia, que compensaram a diminuição na Europa Central. Entre 1985 e 2005, o número de apicultores diminuiu em toda a Europa (-31,4%) (Potts et al., 2010).

Em 2010, estavam 17 291 apicultores registados em Portugal, com um total de 38 203 apiários e 562 557 colónias, o que traduz um aumento quando comparado com os números de 2007 (15 267, 32 685 e 555 049, respetivamente). O Centro era a região do país onde se situavam o maior número de apiários (38%) e o Algarve e Alentejo as regiões onde se encontravam o menor número de apicultores, mas onde se localizavam os apicultores com maior número médio de colónias (108,5 e 59,5 colónias por apicultor, respetivamente). Os apicultores nacionais tinham em média 2,21 apiários e 32,5 colónias, sendo que apenas as duas regiões anteriormente citadas apresentavam valores acima desta média. Ainda nesse ano, 96,6% dos apicultores eram considerados não profissionais (detinham menos de 150 colónias cada), representando 61,8% do total das colónias nacionais. Os apicultores profissionais (que possuem mais de 150 colmeias) representam apenas 3,4% do total, mas as suas explorações contêm 38,2% do efetivo nacional (MADRP, 2010).

De todas as colónias existentes em Portugal em 2010, 10,6% diziam respeito a cortiços núcleos, sendo que o resto era na maioria do modelo Lusitana, Reversível e Langstroth (MADRP, 2010).

Assim, a apicultura nacional teve como Valor Bruto da Produção médio (VBP) mais de 49 milhões de euros em 2010, o que representa cerca de 1,9% do total de toda a produção animal nacional de 2009 (MADRP, 2010).

O principal problema atual são as doenças das abelhas que têm dizimado as colónias destes “pequenos” apicultores, que pouco ou nada sabiam do assunto. Assim, o papel do apicultor é cada vez mais importante na manutenção e vigília das abelhas e na prevenção e controlo das doenças, de modo a aumentar a produção melífera, mas também impedir a diminuição da polinização, o que pode levar ao desaparecimento de espécies da flora no nosso território (MADRP, 2010).

Para controlo e erradicação das doenças de declaração obrigatória das abelhas, foram criadas as “zonas controladas”, onde se procede a um controlo sistemático das doenças realizado por uma entidade gestora reconhecida pela DGAV (MADRP, 2010). As doenças de declaração obrigatória a nível nacional são: Loque americana, Loque europeia, Acarapiose, Varroose, Aethinose por *Aethina túmida*, Tropilaelapsiose por *Tropilaelaps* sp., e apenas em zonas controladas a Ascosferiose e Nosemose (Decreto-Lei n.º 203/2005, 2005).

Todo o trânsito de abelhas, enxames, colónias e/ou os seus produtos e qualquer material destinado à apicultura para dentro de uma zona controlada, carece de uma autorização prévia da autoridade sanitária nacional (MADRP, 2010).

### 3.2 - Biologia da Abelha

A abelha doméstica, *Apis mellifera*, é um inseto da ordem *Hymenoptera*, da família *Apidae* e sub-família *Apinae*. Das 20 mil espécies diferentes da família a que faz parte, a *Apis mellifera* é a espécie que mais intervém na polinização da flora. São insetos sociais que vivem em colónias com várias castas (rainha, obreiras e zângãos) (Ramos & Carvalho, 2007).

Encontram-se a maior parte do tempo em abrigos na natureza ou em colmeias e cortiços. Numa colmeia podemos encontrar de 10 000 (no inverno) a 50 000 ou mais abelhas (no verão), sendo que apenas uma é rainha. Podem existir de 200 a 1000 zângãos e o restante trata-se de obreiras (Godinho, 2012).

Como qualquer inseto, a abelha doméstica apresenta um exosqueleto revestido por quitina e o corpo dividido em cabeça, tórax e abdómen. É de referir que tanto o tórax, como o abdómen são constituídos por vários segmentos, unidos por membranas (Pereira, Lopes, Camargo & Vilela, 2003).

O ciclo de vida da criação (Tabela n.º 1) e da abelha adulta (Tabela n.º 2) depende do tipo de casta, o que vai influenciar o ciclo de vida de alguns agentes patogénicos, como é o caso da *Varroa* (Cicco, 2001).

Tabela n.º 1 – Ciclo evolutivo da criação de *Apis mellifera* (Adaptado de Cicco, 2011).

<b>Tempo de vida da criação</b>	<b>Obreira</b>	<b>Rainha</b>	<b>Zangão</b>
<b>1º ao 3º dia</b>	Ovo	Ovo	Ovo
<b>3º dia</b>	Eclosão do ovo	Eclosão do ovo	Eclosão do ovo
<b>3º ao 8º dia</b>	Larva	Larva	Larva
<b>8º dia</b>	Larva	Célula operculada	Larva
<b>8º ao 9º dia</b>	Célula é operculada e larva tece o casulo	Larva tece o casulo	Célula é operculada e larva tece o casulo
<b>10º ao 10º1/2 dia</b>	Pré-pupa	Pré-pupa	Larva termina de tecer o casulo
<b>11º dia</b>	Pré-pupa	Pupa	Pré-pupa
<b>12º dia</b>	Pupa	Pupa	Pré-pupa
<b>16º dia</b>	Pupa	Inseto adulto	Pupa
<b>21º dia</b>	Inseto adulto	-	-
<b>24º dia</b>	-	-	Inseto adulto

O tempo que demora ser encerrado o alvéolo onde se encontram as larvas e o tempo que assim permanecerá, pode aumentar a probabilidade da entrada de Varroas para esse alvéolo, assim como as posturas que irão acontecer até ser desoperculado (Godinho, 2009). Depois de sair do respetivo alvéolo, a abelha desempenha várias funções dependendo da sua idade (Tabela n.º 2), o que leva a estar mais ou menos exposta ao parasita (Cicco, 2001).

A rainha pode chegar a pôr 1500 a 2000 ovos por dia na fase mais ativa da postura, sendo essa a sua principal função. Pode ter uma longevidade de 5 anos, embora seja habitualmente substituída por outra nova ao fim de 2 a 3 anos, naturalmente ou pelo apicultor. Como esta é a progenitora de todas as obreiras, irá transmitir-lhes o seu património genético e respetivas características comportamentais à colónia. Assim, é diretamente responsável por várias características intrínsecas à colónia, tal como a coesão do enxame, a intolerância a outras rainhas e mesmo o instinto de limpeza (Neto, 2009).

Tabela n.º 2 – Ciclo evolutivo da abelha adulta *Apis mellifera* (Adaptado de Cicco, 2011).

<b>Tempo de vida adulta</b>	<b>Obreira</b>	<b>Rainha</b>	<b>Zangão</b>
<b>1º ao 3º dia</b>	Incubação e limpeza da colmeia	Rainha jovem	Vive só na colmeia
<b>4º dia</b>	Alimentação das larvas	Rainha jovem	Primeiros voos para o exterior
<b>5º dia</b>	Alimentação das larvas	Voo nupcial	Procura da rainha para acasalamento
<b>5º ao 6º dia</b>	Alimentação das larvas, produção de geleia real e primeiros voos para o exterior	Rainha é alimentada	Procura da rainha para acasalamento
<b>8º ao 12º dia</b>	Produção de geleia real e cera	Ganho de peso	Procura da rainha para acasalamento ou morte ao acasalar
<b>13º ao 19º dia</b>	Proteção da colmeia	Início da postura	Procura da rainha para acasalamento ou morte ao acasalar
<b>21º ao 30º dia</b>	Proteção da colmeia	Postura	Procura da rainha para acasalamento ou morte ao acasalar
<b>31º dia</b>	Proteção da colmeia	Postura	Morte
<b>31º ao 45º dia</b>	Coleta de pólen e néctar	Postura	-
<b>55º dia</b>	Morte	Postura	-
<b>720º ao 1450º dia</b>	-	Postura, enxameação e morte	-

### 3.3. - Doenças das abelhas

Existem vários organismos que podem afetar a vida da abelha doméstica, tanto diretamente, como alterando a qualidade da cera e do mel produzido na colmeia (Jean-Prost, 1987). Na fase larvar são afetadas principalmente por afeições bacterianas (Loque americana e Loque europeia), fungos (Ascoseferiose) e virais; e na fase adulta por doenças infligidas por protozoários (Nosemose), ácaros (Varroose e Acarapiose) e insetos (Ramos & Carvalho, 2007).

Das doenças de declaração obrigatória, a Tropilaelaps e a Aethinose não são diagnosticadas em Portugal, sendo que a última não foi diagnosticada na União Europeia (Quintans, 2012), com exceção de um caso esporádico detetado em rainhas importadas para o território nacional, oriundas do Texas, o qual foi rapidamente detetado e extinguido (Silva, 2011a).

A doença mais comum em Portugal é a varroose, sendo que apenas algumas ilhas do arquipélago dos Açores estão livres deste ácaro. A loque americana, a acarapiose, a ascoseferiose e a noseemose são também doenças com diagnóstico frequente no nosso território (MADRP, 2010).

No âmbito do Programa Apícola Sanitário de 2006, foi realizado o Rastreio Apícola Nacional (RAN 2006) entre março e setembro desse ano. Visto haver cerca de 30 500 apiários registados na base de dados do INGA, para obter uma prevalência esperada de 50%, índice de confiança de 95% e erro de 4%, a amostra aleatória simples foi de cerca de 600 apiários. Foram assim selecionados 656 apiários distribuídos nas 7 Direções Regionais de Agricultura. A taxa de cumprimento do rastreio (RAN 2006) foi de 63%, com 356 apiários amostrados. O parasita mais encontrado foi o ácaro *Varroa destructor*, diagnosticado em 27,0% (IC 22,4 – 31,6%) dos apiários. Seguiram-se a senotainiose com 19,8% (IC 15,6 – 23,9%) e a noseemose com 18,8% (IC 14,8% - 22,9%) das amostras positivas. Em menores percentagens foram diagnosticadas a ascoseferiose (3,7%; IC 1,7 – 5,6%), a loque americana (2,3%; IC 0,7 – 3,8%), a amebíase (2,3%; IC 0,7 – 3,8%), a galeriose (1,1%; IC 0,03 – 2,2%) e a acarapiose (0,3%; IC > 0 – 0,8%). Não foi realizada a identificação da loque europeia e da cria ensacada (vírus) (Santos, Vaz, Bragança, Valério & Quintans, 2007).

Segundo dados de 2008 a 2010, foram rececionadas e processadas 7130 análises laboratoriais, durante esse período, no Serviço de Patologia Apícola do LNIV. Em amostras de abelhas adultas, ocorreram 2805 casos positivos para as diferentes doenças das abelhas, contra 679 negativos. Na criação, o número de casos negativos superou o de positivos (1471 positivos para 2048 negativos). E na análise de cartolinas, 58 foram positivas e 79 negativas. Analisando os dados ao longo destes três anos, concluíram que a percentagem de casos positivos para varroose diminuiu, tanto nas abelhas adultas como na criação (de 48,5% para 25,5% e de 40,2% para 22,8%, respetivamente). Com o aparecimento do agente *Nosema ceranae*, aumentaram os casos de noseemose, de 2008

para 2010 (15,5% para 23,7%) (Silva, 2011b). Visto estes valores não serem resultado de amostragem aleatória, não são representativos do panorama nacional, mas permitem uma ideia geral das doenças que mais afetaram as abelhas durante esse período.

### 3.3.1 - Loque americana e loque europeia

A loque americana tem como agente patogénico o *Paenibacillus larvae* (bactéria), apenas afeta as abelhas na fase imatura e é muitíssimo contagiosa, daí ser necessário uma intervenção rápida em caso de suspeita. É aconselhado destruir e desinfetar com ação de calor, todo o material proveniente de colónias infetadas com esta doença, de modo a destruir os esporos da bactéria. A infeção inicia-se com a ingestão de esporos pelas larvas, que irão germinar e multiplicar-se muito rapidamente no seu intestino. Apesar da larva continuar a evoluir e poder mesmo chegar ao estado de pupa, acaba por morrer, passando da cor branca pérola para um castanho cada vez mais escuro. Os seus tecidos sofrem liquefação, sobrando apenas uma substância pastosa no alvéolo, podendo conter de 5 a 10 milhões de esporos, que podem manter a infeção durante décadas. Na tentativa de limpar o alvéolo contaminado, as obreiras irão ficar também elas contaminadas e espalhar esporos da bactéria noutros alvéolos (Confederação dos Agricultores de Portugal [CAP], 2007)

Para além desta substância pastosa que fica aderente às paredes dos alvéolos, um dos outros sinais desta doença é a chamada criação em mosaico ou salteada, embora não seja patognomónico. Quando a quantidade de criação afetada é grande, é possível detetar-se um cheiro nauseabundo a podre, mesmo sem abrir a colmeia. Uma das formas simples de diagnosticar esta doença, embora não seja fiável, consiste na introdução de um estilete ou um palito em alvéolos suspeitos, retirando-o de seguida. Caso haja loque americana, a substância pastosa irá ficar aderente ao palito, formando um filamento de vários centímetros (Figura 3) (CAP, 2007; Direção Geral de Veterinária [DGV], 2008).

Figura n.º 3 – Sinal típico de loque americana: filamento pastoso (fotografia original, 2012).



Outro meio de diagnóstico presente no mercado consiste num teste rápido (ELISA), cuja embalagem fornece todo o material necessário para realizar um macerado de abelhas, obtendo um resultado em 1 a 3 minutos (Vita Europe, 2012).

A profilaxia consiste principalmente na observação regular das colmeias e no cuidado de higiene do material apícola utilizado no apiário. É aconselhado a troca de ceras velhas. Como esta doença não tem tratamento, resta apenas ao apicultor a destruição de todo o conteúdo da colmeia (CAP, 2007; DGV, 2008).

A loque europeia é causada pela bactéria *Mellisococcus pluton* e encontra-se em todo o Mundo. Esta doença é semelhante à loque americana, embora seja considerada menos perigosa e não seja diagnosticada tantas vezes no nosso território. Ao fazer o teste com o palito, neste caso não se forma filamento e o cheiro não é tão forte, o que diferencia as duas bactérias (CAP, 2007).

### **3.3.2 - Ascosferiose**

O fungo *Ascosphaera* sp. é responsável pela mumificação de larvas brancas (caso haja apenas micélios de um só sexo) e pretas (caso haja formação de ascocistos), inchando numa fase inicial, mas retraindo numa fase mais avançada, ficando duras, com consistência de giz (Pires, Josa & Costa, 2005).

Os esporos deste fungo podem ficar inativos nas ceras, podendo criar uma nova infeção 15 anos depois da infeção inicial. Estes esporos são ingeridos pelas larvas ao 3º ou 4º dia de vida, que irão germinar no seu intestino (CAP, 2007), e causar-lhe a morte dois dias após operculação, no estado de pré-pupa (Pires, Josa & Costa, 2005).

O diagnóstico desta doença é relativamente fácil, pois podem ser observadas larvas mumificadas no exterior da colmeia, na tábua de voo (Figura 4), ou mesmo ainda nos alvéolos (Figura 5) (CAP, 2007).

O apicultor é o principal responsável pela contaminação de colónias por este fungo, sendo que zangãos e abelhas perdidas ou em pilhagem têm apenas uma pequena contribuição na dispersão desta doença (Puerta, Flores, Ruiz, Ruz & Campano, 2001).

Para prevenir a ascosferiose, é necessário especial cuidado na higiene dos equipamentos utilizados no apiário e devem-se colocar as colmeias elevadas em relação ao solo e fazer uma observação regular. Esta doença aparece principalmente em casos de *stress* na colmeia, como por falta de alimento ou devido a outra doença. Para combater este fungo é aconselhado reforçar as colónias fracas e impedir que a humidade no interior da colmeia seja elevada, por exemplo colocando um estrado sanitário, permitindo melhor arejamento no interior desta (CAP, 2007). Podem também ser seleccionadas rainhas com comportamento higiénico mais apurado, tanto por inseminação artificial como por fecundação natural (Pires, Josa & Costa, 2005).

Figura n.º 4 – Larvas mumificadas por *Ascosphaera* sp. na tábua de voo de uma colmeia (fotografia original, 2011).



Figura n.º 5 – Larvas mumificadas por *Ascosphaera* sp. no interior de alvéolos (fotografia original, 2012).



### 3.3.4 - Doenças provocadas por vírus

Vários tipos de vírus, como o *Deformed wing vírus* – DWV (vírus RNA da família *Iflaviridae*), podem afetar as abelhas, principalmente no estado larvar, embora na sua maioria não causem grandes danos por eles próprios. Em casos de virose, a criação pode aparecer numa espécie de saco cheio de líquido, e que mudam de cor branca pérola, para amarelo pálido. Como não há tratamento específico para este tipo de doenças, o seu combate consiste, mais uma vez, na observação da criação, na troca de ceras e na higiene do material apícola (CAP, 2007; Yañez, 2012).

A maioria dos vírus que afeta as abelhas é transmitida pelo *Varroa destructor* (The Food and Environment Research Agency, 2010).

### 3.3.5 - Nosemose

Ao contrário das doenças acima descritas, a noseemose é diagnosticada na abelha adulta (CAP, 2007). Encontra-se em vários países europeus, tendo sido diagnosticada na sua grande maioria (Loncaric et al., 2007; Budge, 2008; Thrasyvoulou, 2008) e é causada por microsporídios *Nosema* sp., podendo afetar apenas algumas colónias, ou mesmo o apiário inteiro (Budge, 2008).

Ocorre sazonalmente, principalmente no fim do inverno e princípio da primavera em colónias mais fracas (L'Association Canadienne des Professionnels de L'Apiculture, 2008). Estes agentes vivem no intestino médio da abelha, causando-lhe abdómen dilatado e convulsivo, e dificuldade de voo. A presença de diarreia nas paredes da colmeia também é comum num estado avançado da doença (DGV, 2008).

Os esporos produzidos por estes microsporídios são muito resistentes, podendo sobreviver vários anos no interior de uma colmeia (CAP, 2007). Em condições ótimas, entre os 30 °C e

os 34 °C, pode concluir um ciclo evolutivo em 3 a 4 dias, começando pela ingestão de esporos por abelhas adultas, que irão germinar no seu intestino, destruindo-o. Mais tarde, irão ser produzidos novos esporos que irão ser libertados nas fezes de abelhas doentes (Jean-Prost, 1987).

Não havendo tratamento homologado em Portugal para esta doença, devem ser tomadas precauções para diminuir o seu aparecimento no apiário. Para isso, as colónias não devem ser colocadas em locais muito sombrios e húmidos (CAP, 2007). Tem sido associada ao colapso de colónias, devido à morte da criação mais rápida do que a postura realizada pela rainha (Higes et al., 2008).

Desde o aparecimento da *Nosema ceranae* em Portugal, têm aumentado o número de casos desta doença no nosso território (Silva, 2011b).

Várias substâncias foram relatadas como eficazes na luta contra esta doença, como fumagilina (antibiótico), Protofil® (mistura de estratos de plantas, vitaminas e oligoelementos), ácido fórmico, xarope de timol e alho, Nozevit® (solução com polifenóis extraídos de plantas) e Vita feed gold®, com o intuito de combater diretamente o agente, ou simplesmente fortalecendo a colónia (Jean-Prost, 1987; Thrasyvoulou et al., 2008; Gajger, Kozaric, Berta, Nejedli & Petrinec, 2011).

### **3.3.6 - Braulose**

O piolho da abelha (*Braula coeca*) é considerado parasita por alguns autores, mas comensal por outros. Na realidade, não provoca muitos danos quando se encontra em pequenas quantidades, mas se houver um número significativo de piolhos nas abelhas adultas pode levar à diminuição da produção e no caso da rainha, à diminuição de postura. Este inseto encontra-se a maior parte do tempo no tórax de abelhas adultas, pondo ovos na superfície do mel operculado. Após o nascimento das larvas, estas escavam galerias, de cor esbranquiçada, na cera (Jean-Prost, 1987).

Embora não seja dada grande importância a este piolho, foi o agente mais encontrado nas cartolinas apresentadas no LNIV entre 2008 e 2010 (Silva, 2011b). Apesar de não haver tratamento específico, suspeita-se que os acaricidas utilizados contra a *Varroa* também matem este inseto. A prevenção continua a ser o melhor meio de combate, mantendo as colónias fortes e com alimento todo o ano, sendo assim negligenciável os efeitos da braulose nestas colónias (Edinburgh and Midlothian Beekeepers' Association, 2009).

### **3.3.7 - Parasitismo por traças da cera**

A *Galleria mellonella*, também conhecida como *grande fausse-teigne* ou *greater wax moth*, tanto como a *Achroea grisella*, *la petite fausse-teigne* ou ainda *lesser wax moth*, não provocam danos diretos na abelha adulta, mas sim na criação por destruírem a cera do

ninho. No seu estado larvar, estas traças cavam galerias na cera de colmeias vazias, povoadas ou mesmo armazenada, contendo pólen (Jean-Prost, 1987; Hamida, 2001).

A primeira encontra-se espalhada por quase todo o mundo, enquanto a segunda, com desenvolvimento mais dependente da temperatura ambiente, sobrevive apenas em climas temperados e tropicais. As larvas de *Achroea* são semelhantes às da *Galleria*, mas de tamanho mais pequeno (Hamida, 2001)

Para combater estas traças, Jean-Prost (1987) aconselhava o uso de enxofre nas colmeias armazenadas. A manutenção de colmeias fortes e a seleção de rainhas com boas características higiénicas, também impede a entrada destes seres na colónia (Hamida, 2001).

São utilizados vários inseticidas, como o paradiclorobenzeno, o ácido acético, o dióxido de enxofre e a naftalina. Também são utilizados meios de controlo biológico como o *Bacillus thuringiensis* e a planta do absinto (*Artemisia absinthium*) (Hamdan, 2009).

Em Portugal, apenas os medicamentos de uso veterinário contra a varroose estão homologados.

### **3.3.8 - Senotainiose**

A *Senotainia tricuspis* também é endoparasita da abelha doméstica, ocorrendo principalmente na região mediterrânica, durante o verão quando há maior quantidade destas moscas. Trata-se de um inseto vivíparo, sendo que a fêmea ataca abelhas prestes a levantar voo, depositando-lhe uma ou duas larvas, que irão penetrar pela fina membrana entre a cabeça e o tórax (Hamida, 2001).

As larvas irão permanecer nos músculos torácicos, alimentando-se de hemolinfa mas sem se desenvolver. Apenas após a morte da abelha as larvas começam a alimentar-se dos tecidos sólidos, continuando o seu desenvolvimento. Depois de 6 a 10 dias da morte do hospedeiro, as larvas penetram no solo onde passam para o estado de pupa, hibernando no solo até ao próximo verão. O diagnóstico é laboratorial ou por emergência de larvas da mosca em abelhas mortas (Silva, 2011c).

Até 90% da colmeia pode estar infetada com larvas de *Senotainia*, sendo assim importante o seu combate, sendo na sua maioria por manejo apícola, como cobrir o solo próximo das colmeias e não deixar abelhas mortas ao seu redor (Palmeri et al., 2003, citado em Courtney, Pape & Skevington, 2009; Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, 2010).

Em 2009, 10,2% das amostras (abelhas adultas) colhidas de 1912 apiários em Portugal, foram positivas para este parasita, sendo diagnosticado principalmente em julho e setembro (Pires, Cadavez & Valério, 2011).

### 3.3.9 - Acarapisose

A prevalência da acarapisose (*Acarapis woodi*) tem vindo a diminuir bastante desde que se começou a tratar, sistematicamente, todas as colónias contra a *Varroa*. Na sua maior parte, apenas abelhas vindas de locais livres de varroose (e, por isso, em que não se utilizam acaricidas), apresentam este parasita, como a ilha de São Miguel nos Açores, sendo as grandes responsáveis pelas amostras positivas recebidas no LNIV entre 2008 e 2010 (Silva, 2011b).

O ácaro (Figura 6) ainda foi encontrado em 2006 na zona de Poitiers, em França, mas em quantidades infestantes consideradas não alarmantes: 5 das 475 amostras foram positivas (Jillson, 2006).

Figura n.º 6 – Ácaro da espécie *Acarapis woodi* observado ao MOC com ampliação de 40x (fotografia original, 2012).



### 3.3.10 - Varroose

#### 3.3.10.1 - Biologia da *Varroa destructor*

Hoje em dia, a varroose é a doença das abelhas que mais afeta o setor apícola. Este ácaro é considerado como um dos principais culpados do desaparecimento de colónias na Europa e nos EUA (Le Conte, Ellis & Ritter, 2010). Por isso, o futuro da apicultura em Portugal tem de se basear em profissionalização de todos os intervenientes do setor, unindo-os de forma a combater eficazmente esta doença (Pires, 2004).

Apesar da obrigatoriedade de registo, e da distância mínima entre apiários ser de 400 m (de 11 a 30 colmeias móveis) ou de 800 m (de 31 a 100 colmeias móveis) (Decreto-Lei n.º 203/2005, 2005), isto nem sempre acontece, o que dificulta o trabalho da autoridade sanitária e aumentando a dispersão do parasita (Quintans, 2012).

Figura n.º 7 – Abelha parasitada por ácaro da espécie *Varroa destructor* (fotografia original, 2011).



Figura n.º 8 – Abelha morta recolhida em tabuleiro sanitário, com várias varroas (fotografia original, 2011).



Esta doença é provocada pelo ácaro *Varroa destructor*, da Família *Varroidae*. A *Varroa* vive exclusivamente como parasita externo da abelha (Figura 7), alimentando-se da sua hemolinfa. As fêmeas (Figura 8) têm corpo oval achatado, de cor castanho-avermelhado, e dimensões de cerca de 1,6 x 1,1 mm (Murilhas & Casaca, 2004).

O macho é de cor mais clara, tem o corpo mais pequeno, mas patas mais compridas que a fêmea, apresentando assim um dimorfismo sexual acentuado (Shapiro, 2011). As fêmeas apresentam também uma armadura bucal (Figura 9) que lhes permite sugar a hemolinfa das abelhas através do seu revestimento quitinoso, tornando-as débeis e aptas a contrair outra doença, diminuindo o seu tempo de vida (Rosenkranz, Aumeier & Ziegelmann, 2010).

Figura n.º 9 - Fêmea de *Varroa destructor* na cabeça de uma larva de abelha (Martin, 2010).



Estes ácaros têm um ciclo de vida (Figura 10) caracterizado por ter uma parte externa ao alvéolo (fase forética), em que se encontra na abelha adulta a sugar a hemolinfa, podendo passar para outra abelha de outra colmeia, e uma parte interna em que suga a hemolinfa da larva/pupa, onde se desenvolve e reproduz (fase reprodutiva) (Jean-Prost, 1987).

A fêmea adulta entra num alvéolo não operculado onde se irá alimentar de hemolinfa da larva, com o objetivo de realizar a postura de ovos e se reproduzir, pouco depois da operculação (Figura 11) (Murilhas & Casaca, 2004). A operculação ocorre por volta do 9º dia de vida da abelha, e o primeiro ovo (haploide) dá origem a um ácaro macho por volta do 11º dia. A cada 30 horas nasce uma nova fêmea (diploide), que irá acasalar com este macho, quando ambos estiverem férteis (Godinho, 2009).

O ácaro fica fértil logo após a última muda, sendo que o macho atinge a maturidade sexual cerca de 20 horas antes da primeira fêmea (Rosenkranz, Aumeier & Ziegelmenn, 2010).

Na abelha obreira, o alvéolo fica operculado cerca de 11 dias, apenas duas fêmeas irão ser fecundadas e outra poderá sair fértil. No caso do zangão, o alvéolo fica operculado cerca de 14 dias, há possibilidade de três fêmeas serem fecundadas e outra ficar fértil nesse tempo. Daí haver preferência do ácaro para o alvéolo de zangão (mais largo que o de obreira) (Godinho, 2009).

Este facto é exacerbado pelo maior número de abelhas que visitam estes alvéolos, por ser necessário maior quantidade de alimento para o zangão, e por haver maior libertação de feromonas por parte destes do que das obreiras, o que atrai a *Varroa* (Silva 2010). Com a desoperculação, termina o desenvolvimento dos ácaros e as fêmeas imaturas e os machos irão morrer pouco tempo depois. Em casos de colónias muito infestadas de *Varroa*, é possível que entre mais do que uma fêmea por alvéolo, possibilitando cruzamentos entres ácaros que não sejam irmãos (Murilhas & Casaca, 2004). As fêmeas adultas irão sair do alvéolo no corpo de uma abelha adulta, ou irão simplesmente para outro alvéolo vizinho. Estas podem sobreviver até 10 dias na colmeia, e de algumas horas a 9 dias no exterior, consoante a temperatura e humidade ambiental (Jean-Prost, 1987).

Como o aquecimento global, os invernos têm sido cada vez mais curtos e menos rigorosos, o que permite a permanência de criação na colmeia durante mais tempo ou mesmo o ano inteiro. Este fator leva à possibilidade de reprodução do *Varroa* durante todo o ano e dificulta o seu combate (Murilhas, 2008).

Figura n.º 10 - Fase reprodutiva e forética do ciclo de vida da *Varroa* (adaptado de Rosenkranz, Aumeier & Ziegelmann, 2010).

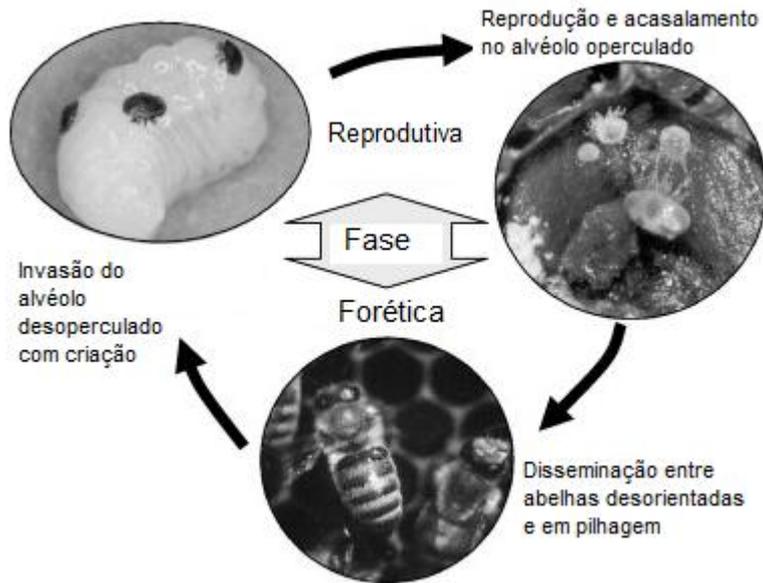
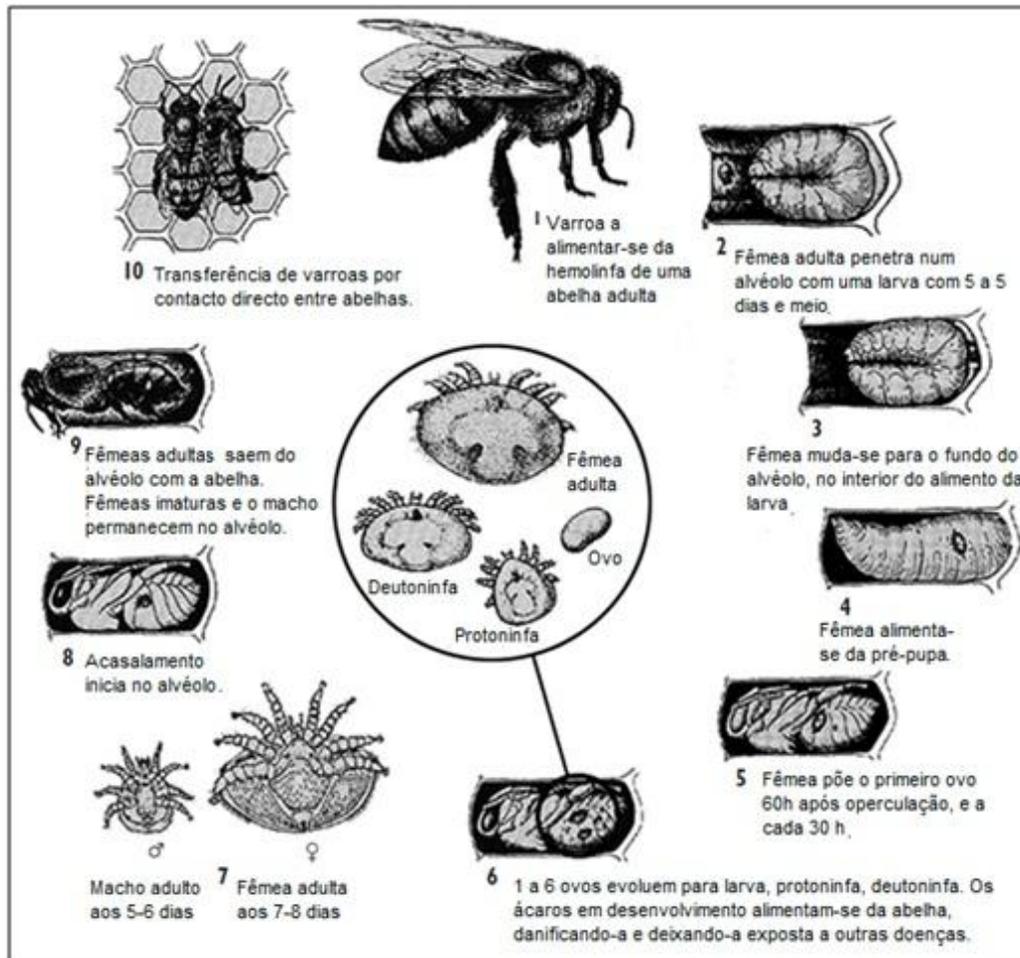


Figura n.º 11 – Ciclo de vida da *Varroa destructor* (adaptado de Allsop, 2006).



### 3.3.10.2 - Sinais, consequências da varroose e o seu diagnóstico

Quando o número de ácaros é baixo, a colónia não apresenta sinais do parasitismo. No entanto, se a infestação for grande, as consequências podem ser nefastas e haver grandes alterações no número de abelhas e criação. Se o manejo apícola for insuficiente, o número de Varroas irá aumentar até ao ponto em que a colónia irá apresentar sinais graves de desorganização social e poderá abandonar a colmeia ou mesmo colapsar (Murilhas & Casaca, 2004).

Um dos primeiros sinais consiste no aparecimento de obreiras com asas deformadas. Isto deve-se à introdução, direta ou indireta, do *deformed wing virus* (DWV) pelo ácaro. Com o aumento da infestação, aumenta o número de obreiras doentes e podem ser vistas algumas a rastejar em frente à colmeia, sem conseguir levantar voo. Finalmente, a criação começa a apresentar sinais de diversas doenças (como a loque americana), normalmente controladas quando o número de Varroas é pequeno. Chega depois a um ponto em que a morte de obreiras ultrapassa a taxa de nascimento, levando ao colapso da colónia. Podem decorrer apenas três semanas dos primeiros sinais a este ponto (Calderone, 2002b).

Assim, a *Varroa* provoca danos diretos e indiretos no seu hospedeiro. O ácaro provoca diretamente malformações e diminuição do tempo de vida média da abelha, e indiretamente possibilita a contaminação da abelha afetada, por outras doenças. A diminuição do número de obreiras na colmeia irá diminuir a sua capacidade de limpeza, o que no caso de presença de ascosferiose irá aumentar a sua prevalência na criação. O ácaro pode também transportar na sua cutícula esporos de *Paenibacillus larvae*, agente da loque americana. Outro dos sinais também observados diz respeito à diminuição de produção, mas passa muitas vezes despercebido aos olhos do apicultor (Hoyo & Cabrera, 2004).

Em locais onde é conhecida a existência da *Varroa*, é aconselhado fazer a sua monitorização a cada 2 meses (situação de quase todo o território Português), e deve ser realizada 2 vezes ao ano em situações livres de *Varroa* (apenas em algumas ilhas do arquipélago dos Açores) (British Columbia Ministry of Agriculture and Lands [BCMAL], 2008).

O diagnóstico deste parasita pode ser feito a olho nu em abelhas adultas (Hoyo & Cabrera, 2004) sendo de fácil execução, sem custos, alta especificidade, mas com baixa sensibilidade, visto que quando a colmeia se encontra no pico máximo de criação, se considera que apenas 15% do número total de ácaros se encontra nas abelhas adultas (Goodwin & Eaton, 2001).

Podemos determinar o grau de infestação da colmeia, observando um número ou uma área certa da criação de obreiras ou de zangãos (Figura 12), visto que cerca de 85% dos ácaros *Varroa destructor* se encontram em alvéolos operculados (BCMAL, 2008). Este teste apresenta uma alta especificidade e sensibilidade na criação de zangãos, não apresenta custos ao apicultor, mas afeta a vida normal da colónia (Goodwin & Eaton, 2001).

Figura n.º 12 – *Varroa destructor* em criação de zângãos (fotografia original, 2012).



Para obter alta sensibilidade e especificidade, mas com baixos custos e sem prejuízo para as abelhas, pode-se realizar o teste do *sugar shake*. Este consiste na recolha de cerca de 300 abelhas para um recipiente, onde será colocado uma colher de sopa de açúcar em pó. De seguida, deve-se girar o recipiente, de modo a que todas as abelhas fiquem cobertas com o açúcar, que irá provocar a queda dos ácaros (aproximadamente 70%) presentes nas abelhas e aumentar o seu instinto de limpeza. Por fim, com o auxílio de uma rede, deve-se separar os ácaros e realizar a sua contagem (Goodwin & Eaton, 2001).

Outro método de diagnóstico é a utilização de estrados sanitários, que consistem em estrados que substituem o fundo da colmeia, habitualmente fechado, por uma grelha com uma gaveta coletora por baixo. Assim, a *Varroa* cai naturalmente para a grelha e depois para a gaveta, onde é colocada uma substância com propriedades adesivas, de modo a não poderem fugir. Por fim, basta recolher a gaveta e fazer uma observação direta, podendo também assim avaliar o grau de infestação da colmeia pela contabilização da queda diária de ácaros *Varroa destructor* (Serrano, Ruiz & Pires, 2002).

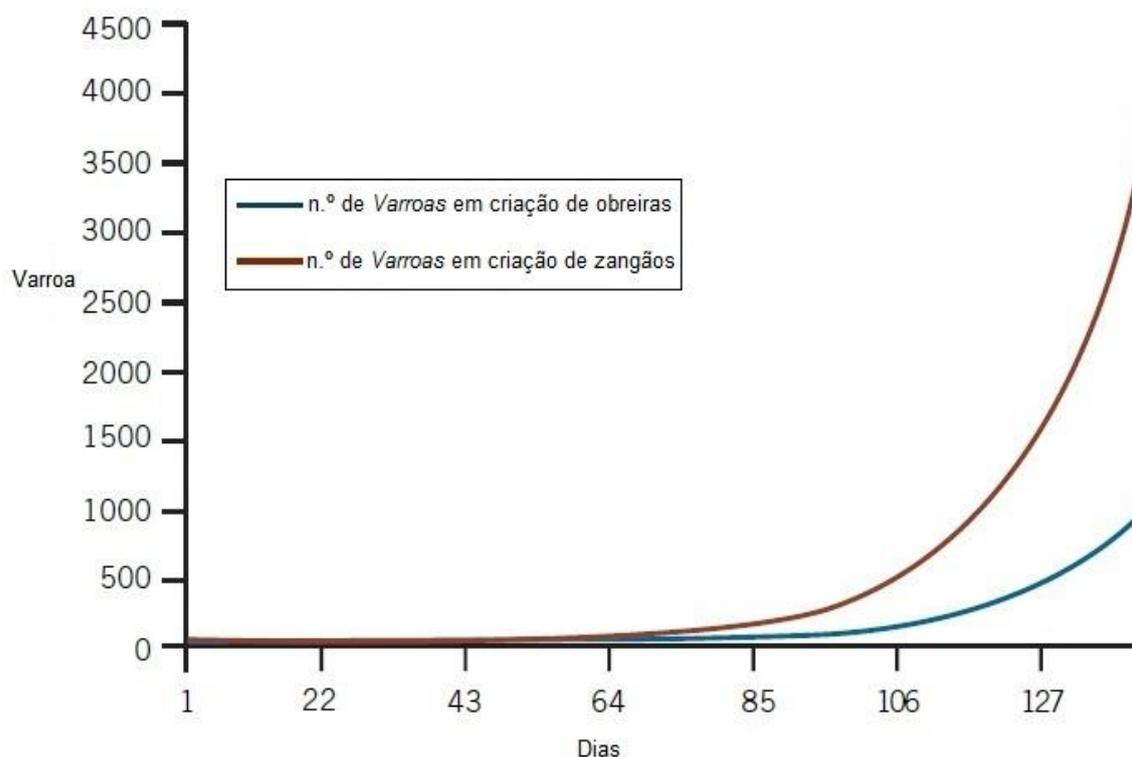
Este método pode ser utilizado normalmente ao longo do ano, ou especialmente no momento da colocação de acaricidas (Murilhas & Casaca, 2004), sendo considerado um teste altamente sensível e específico, mas também moroso e altamente dispendioso (Goodwin & Eaton, 2001).

### 3.3.10.3 - Meios de combate

Os meios de combate à *Varroa* podem ser de vários tipos, nomeadamente a nível do manejo no apiário e restantes infraestruturas, com a utilização de compostos naturais e químicos. Como já referido, esta é a doença de maior prevalência em Portugal e aquela que causa maiores preocupações, daí ser importante o seu controlo.

Embora existam populações de abelhas que resistam à *Varroa*, sem receberem tratamento durante vários anos, criando um estado de equilíbrio entre o parasita e as próprias abelhas (Locke & Fries, 2011), tal não costuma acontecer no nosso país, principalmente devido ao clima mediterrânico, propício para o desenvolvimento da *Varroa*. Isto deve-se ao facto de haver criação o ano inteiro na colmeia, aumentando a velocidade de infestação e multiplicação por parte do ácaro, principalmente no caso de haver criação de zangão (Gráfico n.º 1) (Goodwin & Eaton, 2001).

Gráfico n.º 1 – Curva de crescimento teórica da população de *Varroa* no verão, na presença de criação de obreiras e zângãos (adaptado de Goodwin & Eaton, 2001).



Através do Programa Apícola Nacional, desde 1997 tem sido apoiada uma ação de luta contra a varroose. Esta consiste na compra de medicamentos pelo Estado, que posteriormente os distribui aos apicultores registados. Este fator levou ao aumento do número de apicultores registados e à eficácia de tratamento deste parasita a curto prazo. Desde 2008 que esta distribuição passou a ser exclusiva a organizações de produtores do

setor melífero (com exceção das regiões autónomas da Madeira e Açores), com o objetivo de unir apicultores e melhorar esta luta. Por último, foram criadas as zonas controladas, de forma a monitorizar melhor esta e outras doenças das abelhas (MADRP, 2010).

Para determinar qual(is) o(s) melhor(es) tratamento(s) a aplicar para combater a *Varroa*, é necessário ter em conta as condições climáticas, os períodos de produção de mel, o desenvolvimento da população da própria *Varroa* e o manejo aplicado no determinado apiário. Como não se pode aplicar substâncias que deixariam resíduos no mel, apenas podem ser utilizadas técnicas de manejo para combater a *Varroa* quando este está a ser produzido e armazenado nos alvéolos. Para que a colónia consiga sobreviver ao inverno, é importante diminuir o número de ácaros depois da cresta. Em países da Europa central, as colónias são tratadas em novembro e dezembro, altura em que não têm criação, tornando assim mais eficaz o tratamento por não haver ácaros encerrados em alvéolos. O tipo de colmeia e o tamanho do apiário também influenciam bastante o tipo de tratamento aplicado, visto que certas técnicas implicam grande disponibilidade e conhecimentos por parte do apicultor (Imdorf, Charrière, Kilchenmann, Bogdanov & Fluri, 2003).

Para melhor saber quando atuar para diminuir a presença deste ácaro, é importante saber qual o grau de infestação da colmeia. Quando a colmeia está reduzida ao ninho, isto é, não está a ser armazenado mel para recolha nas alças, é indicado intervir se forem contados 15 fêmeas de *Varroa* sp. ou mais numa colmeia. Em altura de produção de mel, não é considerado problema um número de ácaros *Varroa destructor* inferior a 100 por colmeia e o tratamento pode ser efetuado apenas após a cresta. Entre 100 a 999 ácaros por colmeia, irá haver um impacto económico, devendo tratar-se o mais depressa possível, sendo indicado uma cresta antecipada. No caso de haver mais de 1000 ácaros, a colónia está em risco eminente de colapsar. Devem ser retiradas as alças com mel e tratar imediatamente, voltando a repetir o tratamento no outono. Assim, até considerado um grau de infestação baixo se contadas menos de 15 fêmeas de *Varroa destructor* numa colónia em 24h, médio se forem contadas entre 15 a 999 fêmeas e alta se forem contadas 1000 ou mais fêmeas (BCMAL, 2008).

#### **3.3.10.3.1 – Maneio**

Podemos controlar esta doença com diversas técnicas de manejo a nível genético, biológico e biotecnológico.

O manejo genético consiste em utilizar apenas rainhas conhecidas por terem grande aptidão de limpeza e proteção da colónia contra doenças (Osterlund, 2008). Este é utilizado em vários países, como os Estados Unidos da América, onde foram desenvolvidas linhas de abelhas que dispensam da intervenção em relação à *Varroose* nas suas colónias. Isto deve-se ao maior instinto de limpeza transmitido da rainha às suas filhas, que naturalmente combatem estes ácaros, expulsando-os da colmeia (Rindere, Harris, Hunt & Guzman, 2010).

O comportamento higiênico pode ser avaliado pela introdução voluntária de ácaros em alvéolos de criação de obreiras e calcular qual a percentagem foi limpa ao fim de 24h (Serrano, Pires & Puerta, 2001).

Segundo Rodrigues (2011), a colocação de 11 quadros no ninho em vez dos tradicionais 10, demonstrou que aumenta a área de criação, aumentando assim a temperatura interna da colmeia. Este fator permite que o ciclo da abelha no alvéolo seja encurtado em 1,5 a 2 dias, nascendo mais cedo, o que leva a que menor quantidade de *Varroa* saiam do alvéolo maduras. O facto de aumentar a temperatura da criação de 33 °C para 35 °C leva também à disposição de alvéolos de zangão apenas na periferia dos quadros. A reprodução destes ácaros pode mesmo cessar, caso a temperatura chegue aos 37 °C.

Outro método utilizado consiste em polvilhar as abelhas com açúcar em pó, de modo a aumentar o seu instinto higiênico. Trata-se de um método eficaz, sem efeitos secundários, pouco dispendioso em termos económicos, mas dispendioso em termos de tempo e pode atrair outros insetos para a colmeia, como formigas (Pires, 2005; Hamdan, 2009).

Como estes ácaros têm preferência pelos alvéolos de zângão para se reproduzir, estes podem ser destruídos, de modo a levar as obreiras a limpar essa área, diminuindo o número de Varroas que acasala. Outro método consiste na colocação de um quadro no ninho com uma lâmina de cera contendo alvéolos de zângão (mais largos que os alvéolos de obreiras) (Figura n.º 13). Assim, aumenta a área de criação de zângãos, que deverá ser extraída da colmeia depois de operculada e destruída (Calderone, 2002a).

Foi testado um tipo de colmeia em torre com dois ninhos colocados lado a lado (Figura 14), contendo cada um deles uma rainha. Uma delas ficando responsável pela criação de obreiras e a outra apenas com acesso a quadros com cera alveolada para zangãos. Foi feita uma recolha regular dos quadros com criação de zangãos operculada, de modo a diminuir a quantidade de Varroas na colmeia. Este tipo de colmeias apresentou média de queda diária de Varroas inferior às colmeias controlo (colmeias utilizadas habitualmente). Este método é prático, visto ser facilmente executado durante todo o ano, mesmo na presença de alças (vanEngelsdorp, Gebauer & Underwood, 2009).

Também podem ser utilizados quadros com alvéolos de menor dimensão, de maneira a diminuir a possibilidade de crescimento de Varroas juntamente com larvas de abelhas obreiras (Osterlund, 2008).

O confinamento da rainha apenas a uma parte do ninho pode levar à diminuição do número de *Varroa destructor*, pela diminuição da quantidade de criação, logo diminuindo também a possibilidade de reprodução do ácaro (Murilhas & Casaca, 2004).

Figura n.º 13 – Pormenor da diferença do tamanho de alvéolo de zângão (à esquerda) e de obreira (à direita), em lâmina de cera alveolada (fotografia original, 2012).

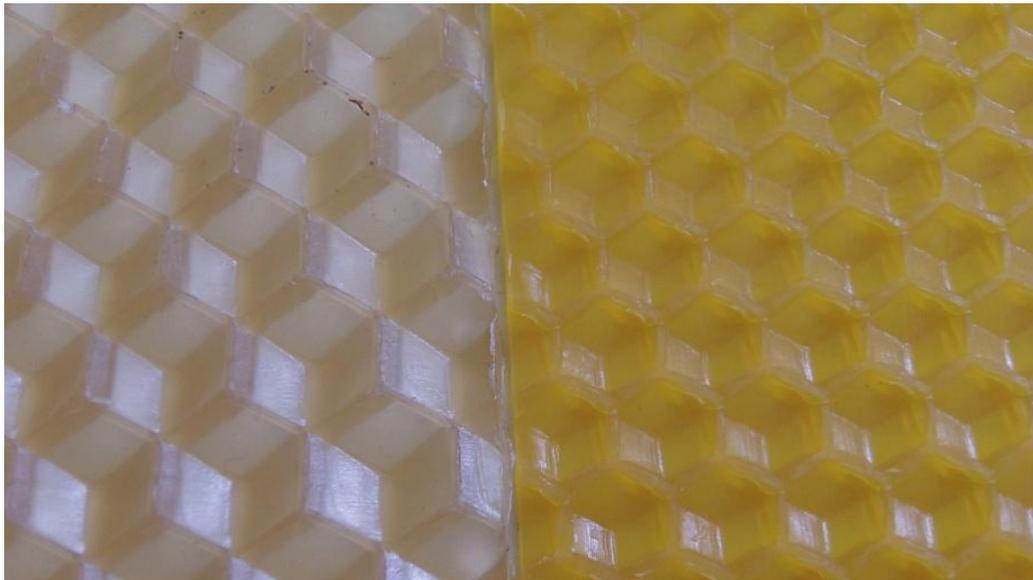


Figura n.º 14 – Colmeia em torre, com dois ninhos e acesso permanente a estes (vanEngelsdorp, Gebauer & Underwood, 2009).



A utilização de estrados sanitários sem a gaveta coletora também diminui o número de *Varroa destructor* na colmeia, visto que estas caem diretamente para o solo, sem possibilidade de voltar a subir para os quadros (Serrano, Ruiz, Pires, 2002).

Estudos antigos (1977 e 1990) indicavam que a uma temperatura de 41° C, os ácaros presentes em abelhas adultas morriam em 5 minutos, e se a temperatura dos alvéolos com criação fosse superior a 36,5° C reduziria significativamente a taxa reprodutiva do *Varroa* (Grobov, 1977 & Le Conte et al., citados em Colin, 2002).

A DGAV, aconselha medidas complementares à utilização de fármacos, uma adequada higiene e regular desinfeção do material apícola, como a substituição regular de ceras e rainhas, a limpeza regular de estrados, e o chamejamento e desinfeção de outros materiais (Direção Geral de Veterinária, 2011).

#### **3.3.10.3.2 - Medidas naturais**

Foram realizados estudos sobre duas espécies de fungos, *Hirsutella thompsonii* e *Metarhizium anisopliae*, foram realizados para avaliar a sua ação antiparasitária sobre a *Varroa*. Concluiu-se que eram necessários, em média, 4,16 dias e 5,85 dias respetivamente, para atingir 90% de taxa de mortalidade dos ácaros (Kanga, James & Boucias, 2002). No entanto outros autores indicam que três produtos vendidos na Holanda, que contêm *Metarhizium anisopliae* e *Lecanicillium lecanii*, mostraram ser ineficazes na luta contra a *Varroa*, aplicados conforme era indicado pela empresa responsável pela sua distribuição. Seriam necessários fungos com melhor desenvolvimento a altas temperaturas, baixa humidade e de fácil aplicação para ter eficácia de tratamento alta (Gerristen & Cornelissen, 2006).

#### **3.3.10.3.3 - Compostos de síntese**

O tratamento da varroose pode ser realizado utilizando compostos químicos naturais ou de síntese química.

Os medicamentos de uso veterinário de síntese química atualmente homologados em Portugal têm como principal princípio ativo o amitraz (Apivar®) e o fluvalinato (Apistan® e Bayvarol®), sendo que o cumafos (Perizin®) saiu recentemente do mercado. Apesar disto, este e outros compostos químicos proibidos ou homologados em outros países ainda são utilizados frequentemente, como o clorfenvinfos, Klartan® (fluvalinato), Acadrex® (fenvalerato), permetrina e outras misturas feitas pelos próprios apicultores. O único princípio ativo de síntese natural, e por isso o único que pode ser utilizado no modo de produção biológica, com medicamentos de uso veterinário homologados é o timol (Apiguard® e Thymovar®). São também utilizados clandestinamente óleos essenciais, ácido

oxálico, ácido láctico, ácido fórmico e outros compostos orgânicos ilegais (Maia, Pereira, Pires & Murilhas, 2005; Nunes, 2011).

O uso de forma errada destes compostos pode levar à deposição de resíduos no mel em quantidades perigosas para a saúde humana (Bogdanov, 2006).

Num estudo realizado em 2010 a 23 amostras de mel à venda na região da grande Lisboa, foram detetadas 4 qualidades de mel com valores de pesticidas superiores a 1 µg/g de mel, sendo que uma dizia respeito a cumafos e as outras 3 a metiocarbe sulfóxido (Almeida, 2010).

Mais tarde, em 2012 e também a nível nacional, não foram encontrados resíduos de acaricidas em nenhuma das 42 amostras analisadas. Por outro lado, em 9,7% das mesmas foram detetadas resíduos de antibióticos, nomeadamente o sulfatiozol (utilizado ilegalmente) (Belas, 2012).

- **Fluvalinato - Apistan®**

O Apistan® é um medicamento de uso veterinário cujo princípio ativo é o fluvalinato (piretróide sintético). É apresentado na forma de tiras de plástico (Figura 15) impregnadas em princípio ativo a 10% (Vita Europe, 2012), contendo 0,8 g de fluvalinato por tira plástica (Hifarmax, 2012).

São colocadas duas tiras por ninho, uma entre o 3º e 4º e outra entre o 7º e o 8º quadro, durante 6 a 8 semanas, de modo a cobrir todo o ciclo de vida da *Varroa* (Murilhas & Casaca, 2004; CAP, 2007; Hifarmax, 2012).

É indicado realizar o tratamento após a última cresta (no outono) e, se necessário, no início da primavera (Hifarmax, 2012).

A sobreutilização e a utilização indevida deste fármaco (utilização em doses inadequadas e não respeitando o tempo de aplicação) levaram ao aparecimento de resistência por parte dos ácaros da espécie *Varroa destructor* (Murilhas & Casaca, 2004; CAP, 2007).

O modo de disseminação do Apistan® é por contacto direto entre as abelhas e as tiras presentes na colmeia, mas também por contacto entre abelhas, não sendo afetado pela temperatura na colmeia (Vita Europe, 2012). O fluvalinato atua ao nível do sistema digestivo dos ácaros *Varroa*, afetando a condução nervosa pelos canais de sódio (Roberts & Huston, 1999).

Deve ser armazenado ao abrigo da luz direta do sol e em embalagem fechada, para não alterar a eficácia do produto (Hifarmax, 2012).

Figura n.º 15 – Tira de Apistan® colocada entre o 3º e o 4º quadro (fotografia original, 2011).



- **Timol - Thymovar®**

O Thymovar® tem como principal substância ativa o timol, presente naturalmente no mel em concentrações de até 0,16 mg/kg (European working group for the coordination of research on integrated *Varroa* control, 2006), o qual deve ser utilizado sob condições ambientais ótimas, variando a sua eficácia consoante a região e o clima em que se encontram as colmeias (Colin, 2002).

Trata-se de um óleo essencial naturalmente presente no mel, que pode ser obtido da planta do tomilho. A sua concentração varia consoante a variedade de tomilho e o modo como é extraído. A sua eficácia para matar Varroas varia de 66 a 98%, consoante o método de aplicação (Goodwin & Eaton, 1999).

Encontra-se na forma de uma esponja celulósica com libertação retardada de timol, colocadas sobre os quadros no ninho (Figura 16) (Murilhas & Casaca, 2005; CAP, 2007). Cada esponja de Thymovar® contém 15 g de timol (Andermatt BioVet AG, 2007).

Como tem forma de atuação por contacto, mas também por evaporação, a sua eficácia é altamente dependente da temperatura na colmeia. Deve ser colocado quando as temperaturas diurnas se encontram entre os 20 °C e os 30 °C (idealmente entre os 20 °C e 25 °C), sendo que perde eficácia abaixo dos 15 °C. Não deve ser administrado em temperaturas acima dos 30 °C visto aumentar o *stress* e a mortalidade das abelhas. Deve ser aplicado no início da primavera ou, preferencialmente, depois da última cresta (Murilhas & Casaca, 2005; Andermatt BioVet AG, 2007; CAP, 2007).

Embora o modo de ação do timol não seja conhecido, acredita-se que afete o ácaro *Varroa* a nível do sistema nervoso (Health Canada Pest Management Regulatory Agency, 2010).

Em ninhos de colmeias Lusitana, é indicado aplicar uma tira de Thymovar® seccionada ao meio, colocando cada metade em cantos opostos, pousados na parte superior dos quadros (Andermatt BioVet AG, 2007).

Para não haver acumulação de timol no mel, o tratamento deve ser aplicado após serem retiradas as alças com mel. O primeiro tratamento deve ser aplicado após a última cresta (final do verão), devendo ficar na colmeia durante 3 a 4 semanas. Logo após este período, deve ser efetuado novo tratamento igual ao anterior (Andermatt BioVet AG, 2007).

Este medicamento deve ser armazenado a temperaturas inferiores a 30 °C e nunca devem ser guardadas embalagens abertas (Andermatt BioVet AG, 2007).

Figura nº 16 – Aplicação de Thymovar® (Hifarmax, 2010).



Figura n.º 17 – Tiras de Apivar® colocadas no ninho de uma colmeia (fotografia original, 2011).



- **Amitraz - Apivar®**

A substância ativa do Apivar® é o amitraz (amadina), sendo que também se encontra na forma de tiras plásticas suspensas entre os quadros (Figura 17). Atua de forma mista, por contacto e sistémico, podendo ser utilizado durante o fluxo de néctar. Embora também haja resistências por parte de *Varroa* a este composto, regra geral tem uma boa eficácia (Murilhas & Casaca, 2004; CAP, 2007).

Este acaricida foi utilizado como teste controlo e, tal como o Apistan®, encontra-se em fase de mudança para medicamento de uso veterinário.

O modo de libertação lenta permite uma eficácia contra a *Varroose*, sem afetar a vida normal das abelhas. O modo de ação é por contacto direto entre abelhas, após o contacto com as tiras plásticas, que são colocadas entre os quadros do ninho (New Zealand Beeswax Ltd., 2012b).

O amitraz é um agonista dos  $\alpha_2$ -adrenoceptores causando um aumento da atividade do sistema nervoso. Assim, causa a morte dos ácaros, mas também o destacamento do aparelho bucal destes, causando a sua queda do hospedeiro (Roberts & Hutson, 1999).

Como a taxa de libertação do princípio ativo não é afetado pela temperatura, a aplicação de Apivar® pode ser feita durante todo o ano, mas preferencialmente após a última cresta, e possivelmente no início da primavera, durante 6 a 8 semanas (New Zealand Beeswax Ltd., 2012a). Como se degrada em três a quatro semanas no mel, não se encontram resíduos deste acaricida neste (Goodwin & Eaton, 1999), embora não seja aconselhada a sua utilização na presença de alças com mel (New Zealand Beeswax Ltd., 2012a).

- **Utilização de acaricidas em Portugal**

Em 2003, 1200 apicultores portugueses referiram que os tratamentos contra a *Varroa* utilizados por eles foram: Apivar® (43%), Apistan® (26%), Klartan® (17%), Acadrex® e outras substâncias como o clorfenvinfos e o timol. Em média realizaram dois tratamentos por ano, colocando o composto de quatro a seis semanas, principalmente no início do ano (janeiro a março) e depois da cresta (julho a setembro). Destes apicultores, 83% substituíram 3 quadros com cera velha por cera nova laminada, na primavera (Maia, Pereira, Pires & Murilhas, 2005). Segundo o Rasteio Apícola Nacional de 2006, nos 208 apiários em que foi feita a recolha de dados sobre o manejo, foram identificados 13 diferentes produtos comerciais contra a varroose, com duração média de tratamento de 1 a 2 meses, aplicados na maioria dos apiários em Janeiro e Julho (Santos et al., 2007).

- **Eficácia no combate à varroose**

Chiesa (1991) concluiu que o tratamento de *Varroa* com timol em pó tinha, em média, uma eficácia de tratamento de 96,7%.

Em 1995 e 1996, já eram referidos casos de diminuição de eficácia de tratamento com Apistan® (fluvalinato) e Apivar® (amitraz) em Itália e em França (Faucon, Drajnudel & Fléché, 1995; Lodesani, Colombo & Spreafico, 1995; Faucon, Drajnudel & Fléché, 1996).

Durante 3 anos consecutivos (2003 a 2005) e nos mesmos apiários, foi testada a eficácia de Apistan® (fluvalinato) e Apivar® (amitraz), em aplicações nos meses de outubro a dezembro. Os resultados demonstraram que a eficácia de Apistan® diminuiu de 85%, para 80% e mesmo 60% ao longo destes anos; enquanto o Apivar® apresentou valores de 95% nos três anos consecutivos (Al-Ghamdi, 2007).

A eficácia de tratamento do ácido fórmico, o ácido oxálico e o timol, todos de origem natural, foram obtidos em 2005, e indicavam que os três compostos tinham eficácia elevada no combate da *Varroa*, mas que o ácido oxálico também levava a um enfraquecimento da colmeia e a uma alta mortalidade de abelhas (Barros, Álvares, Dias, Pires & Vilas-Boas, 2005).

O ácido fórmico, presente naturalmente no mel, pode apresentar eficácia de tratamento da varroose de mais de 95%, caso evaporarem 7 a 10 gramas deste ácido por dia numa

colmeia (Colin, 2002). Mas estes compostos, com exceção do timol, não estão homologados para o combate à varroose no nosso país.

Em 2007, apicultores nacionais queixavam-se de uma alarmante diminuição da eficácia do amitraz no combate da *Varroa*. Foi realizado um estudo com 4000 colmeias, das quais 1579 forneceram dados conclusivos, indicando que 272 destas teriam uma população de *Varroa* tolerante ao amitraz (utilizando como limite inferior de eficácia os 80%) (Pires, Pereira & Murilhas, 2007).

Ainda em 2007, colónias que continham populações de *Varroa* tolerantes ao fluvalinato, não foram tratadas durante 4 meses, após o qual lhes foi aplicado fluvalinato, demonstrando uma média de eficácia de tratamento de 86%. Assim, conclui-se que populações tolerantes que deixaram de estar em contacto sucessivamente e/ou de maneira inapropriada com o fluvalinato, rapidamente ficam suscetíveis a este composto (Pires, Maia & Pereira, 2007a).

Os mesmos resultados foram encontrados em colmeias com ácaros resistentes ao amitraz, mas com média de eficácia de 78% (Pires, Maia & Pereira, 2007b). Estudos anteriores obtiveram eficácia de  $83,5 \pm 3,5$  % (Floris, Satta, Delrio & Cabras, 2001). Foi obtida uma eficácia de tratamento de 93,82%, por aplicação de amitraz por fumigação (Skerl, Nakrst, Zvokelj & Gregorc, 2010).

Aplicando timol, foram obtidas reduções de 67,1% e 70% do grau de infestação de *Varroa* na criação e em abelhas adultas respetivamente, valores significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) aos valores controlo (19,6% e 6,8%), em colónias de *Apis mellifera* do Brasil em 2008 (Castagnino, 2008).

Num ensaio combinado Apistan® (fluvalinato) + Apiguard® (amitraz) (e ácido oxálico como controlo), realizado em Itália no ano 2008, foi obtida uma média de eficácia de tratamento de 94,32% ( $\pm 7,28$ ), apresentando apenas uma colmeia com eficácia abaixo de 90% (75%) (Nunes & Relva, 2011).

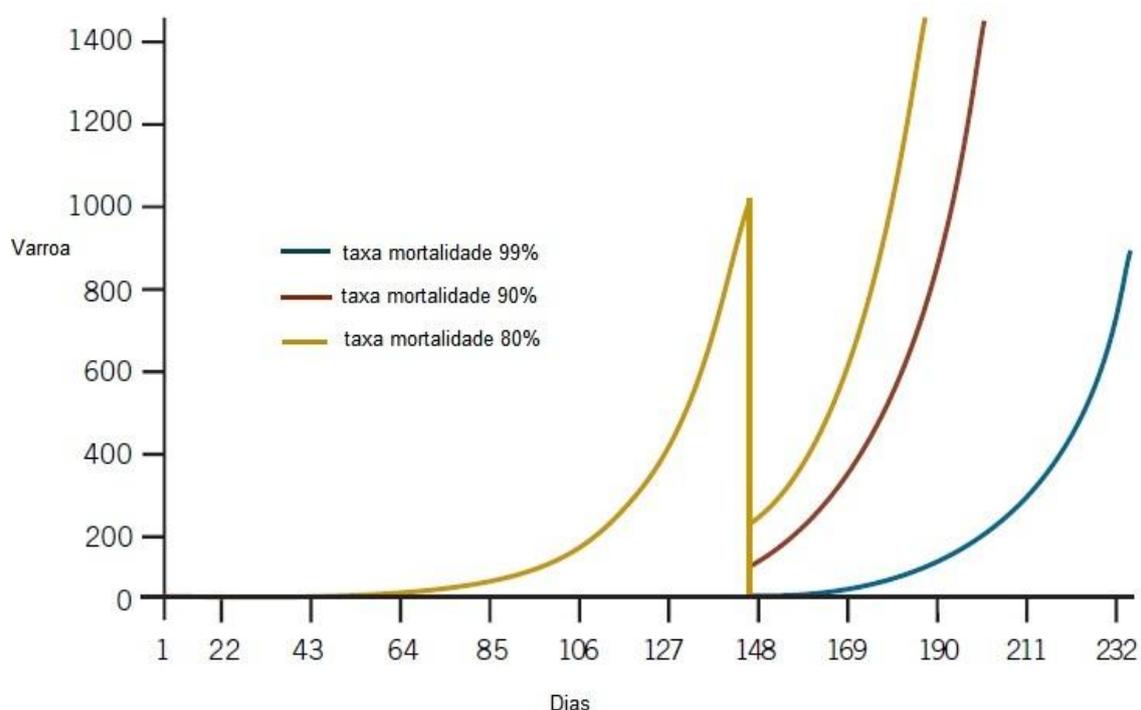
Noutro ensaio semelhante, mas em 2010, foram obtidos médias de eficácia de 93,3% para o grupo com este tratamento, juntamente com a aplicação de Apiivert® (xarope de glucose); e de 94,4% o grupo em que foram aplicados o Apistan® (fluvalinato), Apiguard® (timol), Apiivert® e 100g de um suplemento para abelhas à base de proteínas (Belletti & Vedova, 2012).

No Posto Apícola, foi realizado um ensaio combinado Thymovar® (timol) + Apistan® (fluvalinato) (trocando assim a ordem dos princípios ativos em relação aos ensaios referidos anteriormente), de março a maio de 2011. Neste, foi utilizado o amitraz (Apivar®) como controlo, e a média de eficácia de tratamento obtida foi de 97,16% ( $\pm 3,54$ ), sendo que a eficácia mais baixa foi de 90% e a mais alta perto de 100%. Comparando este ensaio com o realizado em Itália no ano de 2008, conclui-se que ambos são uma boa aposta para lutar contra a *Varroa*, e que o melhor protocolo a utilizar é aquele em que o timol é aplicado em

primeiro lugar, visto ter maior eficácia de tratamento e ser mais fácil escolher o dia com temperaturas mais adequadas para a sua colocação (Nunes & Relva, 2011).

A eficácia de tratamento é importantíssima para o desenvolvimento futuro do parasita na colmeia. Segundo o Ministério da Agricultura e das Florestas da Nova Zelândia (*New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry*), em colmeias com 1000 Varroas e com tratamento com eficácia de tratamento de 80%, 95% e 99%, foram necessários 35, 48 e 94 dias para novamente atingir essa população, como ilustrado no Gráfico n.º2 (Goodwin & Eaton, 2001).

Gráfico n.º 2 – Curva de crescimento teórica da população de *Varroa* na presença de criação de zangãos, com eficácia de tratamento de 99, 90 ou 80% no dia 144 (adaptado de Goodwin & Eaton, 2001).



#### 3.3.10.4 - Protocolos terapêuticos para o combate ao ácaro *Varroa destructor*

O *European working group for the coordination of research on integrated Varroa control* (2006), criou *guidelines* para a avaliação da eficácia de tratamentos contra varroose em colônias de abelhas melíferas.

Segundo este grupo, um estudo deste tipo irá conter erros que devem ser minimizados, mas são impossíveis de eliminar por completo. Para que certo ponto não seja demasiado cuidado, exacerbando outros erros, realizaram uma lista com os principais erros que são encontrados nestes ensaios, e o que deve ser feito para evitá-los, ou, no mínimo, minimizar o seu impacto nos resultados obtidos.

Embora não seja o caso do ensaio apresentado neste trabalho, deveria ser avaliada a eficácia de tratamento, o efeito deste nas abelhas, mas também efeitos ao longo prazo.

Assim, para avaliar a eficácia de tratamento contra a *Varroa*, devem ser realizados os seguintes passos:

- utilizar estrados sanitários, com folha autocolante, protegida com uma rede, a uma distância superior a 0,8 cm. A rede deve cobrir todo o fundo da colmeia e não se encontrar obstruída por própolis;
- após aplicação dos acaricidas deve ser feita a contagem de queda de *Varroa* em intervalos regulares. O intervalo entre contagens varia consoante o tipo de ação do acaricida aplicado. Estes valores devem ser comparados com colónias sem tratamento;
- depois do tratamento testado, deve ser aplicado um acaricida controlo para avaliar o número de Varroas restantes na colmeia;
- a eficácia é calculada pelo número de Varroas mortas durante o tratamento em análise, a dividir pelo número de Varroas mortas durante o tratamento em análise e o tratamento controlo.

$$\frac{\text{°}_t}{\text{°}_t}$$

Para diminuir erros, presumindo que o tratamento controlo é 100% eficaz, é aconselhado seguir os seguintes passos:

- o tratamento controlo deve ser aplicado na ausência de criação fechada;
- o tratamento controlo deve ter uma eficácia mínima de 90 a 95%;
- acaricidas utilizados como controlo não devem ser quimicamente próximos dos acaricidas em estudo;
- deve ser registada a possibilidade dos ácaros se reproduzirem durante o ensaio;
- a mortalidade de ácaros por outras situações a não ser por ação do acaricida ou morte natural deve ser evitada (como por presença de resíduos de acaricidas na colmeia);
- as Varroas mortas devem cair diretamente para o tabuleiro coletor, sem barreiras que possam alterar este fator.

Com o intuito de diminuir a transferência de ácaros entre colmeias, do mesmo apiário, ou mesmo de outros apiários, deve-se:

- realizar em apiários isolados, sendo necessário remover enxames que possam aparecer próximo destes;

- as colmeias devem ser colocadas de forma a diminuir possibilidades de deriva de abelhas para outra colmeia (colocando as colmeias diferentemente direcionadas e em suportes separados);
- evitar as possibilidades de pilhagem (reforçando ou retirando colónias fracas);
- a taxa de infestação das colónias por ácaros da espécie *Varroa destructor* não deve pôr em risco a sua viabilidade;
- apenas colónias com contagens de queda natural de *Varroa* entre 1 a cerca de 40 por dia devem ser utilizados no ensaio.

Para avaliar o efeito dos acaricidas nas abelhas, é necessário:

- colocar coletores de abelhas mortas nas colónias em estudo;
- a mortalidade das abelhas deve ser avaliada de 7 a 14 dias antes do início do ensaio, continuando até 7 a 14 dias após o término deste;
- um grupo controlo, com o mesmo número de colónias do grupo em estudo. Este deve ser mantido a distância suficiente para diminuir o contacto entre abelhas dos dois apiários, e avaliado;
- a força das colónias deve ser avaliada a cada 3 semanas durante todo o ensaio;
- o estado das colónias e a presença de rainha deve ser avaliado no início e no fim do tratamento aplicado;
- a evolução das colónias do ensaio deve ser registada na próxima primavera;
- a predação dos ácaros mortos por outros insetos (como formigas) deve ser evitada para não influenciar a sua contagem.

### **3.3.11 - Doenças provocadas por outros seres**

Existem ainda muitos outros seres que causam problemas, diretos ou indiretos, na vida de *Apis mellifera*, das mais pequenas aranhas e formigas, a vespas, libélulas, coleópteros, lagartos, até mesmo a pequenos roedores e aves, como o pica-pau e o abelharuco (*Merops apiaster*). Mas as próprias abelhas de uma colmeia mais forte, podem levar à morte outra mais fraca ao roubar as suas reservas (pilhagem) (Jean-Prost, 1987; Hamida, 2001).

## 4. Ensaio terapêutico

---

### 4.1 - Materiais e métodos

#### 4.1.1 - Objetivo do ensaio

Como a *Varroa* é um ácaro ubiqüitário e presente em quase todo o mundo, afetando milhares de milhões de abelhas, é importante que se continue a procurar melhores métodos de controlar este parasita (Potts et al., 2010).

Devido à incorreta aplicação dos acaricidas, e à sucessiva utilização das mesmas moléculas químicas nas mesmas colónias, o aparecimento de resistências é cada vez maior (Pires, Maria & Pereira, 2007a; Pires, Maria & Pereira, 2007b; Pires, Pereira & Murilhas, 2007).

Isto faz com que o estudo de novos protocolos de tratamento combinando dois ou mais acaricidas seja importante no combate a populações de *Varroa* resistentes a certos acaricidas (Nunes & Relva, 2011).

Este ensaio teve como principal objetivo testar qual o melhor tratamento combinado contra a varroose. Utilizar primeiro timol e em seguida fluvalinato, ou de modo inverso. Visto que cada um dos medicamentos atua de forma diferente ao nível das abelhas e do próprio ácaro, mas também consoante as condições ambientais, é importante saber qual dos dois deve ser utilizado em primeiro lugar, de modo a obter maior eficácia.

#### 4.1.2 - Local do ensaio - Apiário do Posto Apícola

O ensaio decorreu no apiário experimental do Posto Apícola, localizado na Tapada da Ajuda em Lisboa, instituição integrada no INRB/INIÁV.

A Tapada da Ajuda é caracterizada por conter inúmeras espécies da flora autóctone, mas também importada de outros continentes. Estas incluem variadíssimas plantas com flor propícia à colheita de néctar e pólen por parte das abelhas, pertencentes aos géneros *Oxalis*, *Aloe*, *Eucalyptus*, entre outros.

O apiário encontra-se virado para Sul, protegido de ventos fortes e dividido em quatro filas de colónias (Figura 18), num total que varia de cerca de 40 a cerca de 60, consoante a época do ano. As 20 colónias utilizadas no ensaio encontravam-se dispostas pelas quatro filas. As colónias numeradas de 1 a 6 encontravam-se na primeira fila, de 7 a 15 na segunda fila, 16 e 17 na terceira fila e de 18 a 20 na quarta fila.

#### 4.1.3 - Abelhas e colmeias utilizadas

As abelhas presentes no Posto Apícola são da subespécie *Apis mellifera iberiensis*, nativa de Portugal, Espanha e Gibraltar, conhecida por ser resistente a temperaturas mais baixas do que abelhas de outras subespécies (Godinho, 2012).

Todas as colmeias em uso no Posto Apícola são do tipo Lusitana, com dimensão interior do ninho de 370 mm de lado e 310 mm de altura, contendo 10 quadros.

Figura n.º 18 – Posto Apícola: edifícios e localização das 4 filas de colónias marcadas com um retângulo vermelho (Adaptado de Google Earth, 2012).



#### **4.1.4 - Maneio habitual aplicado no Posto Apícola**

Ao contrário de grande parte dos apiários nacionais, este é visitado frequentemente durante todo o ano, por razões de maneio habitual, mas também por ser um apiário experimental e educativo, recebendo estagiários e alunos de várias áreas e escalões etários.

Assim a observação das colónias é frequente, possibilitando uma intervenção mais rápida e eficaz em caso de anomalia, como presença de doença, falta de nutrientes, pilhagem e outros.

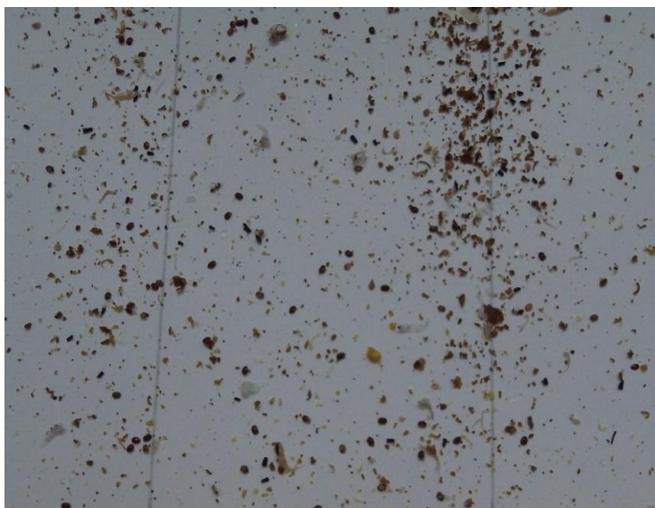
#### **4.1.5 - Estrados sanitários**

Os estrados sanitários utilizados no ensaio são específicos para a colmeia Lusitana, substituindo o fundo de madeira por uma grelha com dimensão suficiente para a passagem do ácaro, mas impossibilitando a passagem das abelhas. As Varroas são assim recolhidas para um tabuleiro (Figura 19), revestido com cartolina branca (Figura 20), de modo a facilitar a visualização e a contagem dos ácaros.

Figura n.º 19 – Tabuleiro coletor de estrado sanitário (fotografia original, 2011).



Figura n.º 20 – Detritos de uma colmeia e ácaros da espécie *Varroa destructor* presentes em tabuleiro coletor ao fim de 48h (fotografia original, 2011).



#### 4.1.6 - Desenho experimental

Para perceber qual o melhor método de aplicação dos dois acaricidas estudados, foram utilizados dois grupos de 10 colónias cada um. Um grupo em que é aplicado em primeiro lugar o timol e depois o fluvalinato (TA, n=10), e o outro grupo em que foi aplicado fluvalinato e depois timol (AT, n=10).

Para escolher quais as colónias incluídas no ensaio, foi realizada uma contagem de queda de *Varroa* em 24 horas, em todas as colónias presentes (55 colónias) no Posto Apícola, na semana de 3 a 7 de outubro de 2011 ( $T_0$ ). Destas, idealmente seriam selecionadas 20 com valores de queda o mais próximo de 100 a 200 Varroas em 24 horas, sendo que as escolhidas apresentaram valores entre os 38 e os 508. A sua divisão em dois grupos foi realizada de modo a obter uma média de valores de queda de Varroas em  $T_0$  semelhante entre estes, sem ter em atenção a sua localização. No grupo TA ficaram incluídas as colónias 1, 2, 3, 4, 8, 11, 12, 15, 19 e 20. Do grupo AT fazem parte as colónias 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18.

Para diminuir a possibilidade de erros, foi avaliada a força das colónias, de modo a excluir alguma que possa estar pouco populosa ou em fase de colapso, o que poderia causar alterações nos resultados obtidos.

O protocolo de aplicação dos acaricidas foi regido pelas indicações dadas pela empresa fornecedora dos acaricidas utilizados neste ensaio (Hifarmax).

O ensaio começou no dia da contagem controlo ( $T_0$ ), a 7 de outubro de 2011, com a aplicação do acaricida correspondente a cada grupo. A 21 de outubro, foi retirado o timol do grupo TA, e foi aplicado o fluvalinato; enquanto que no grupo AT, foi aplicado o timol, mas

não foi retirado o fluvalinato (Tabela nº. 3). A 18 de novembro foi retirado o fluvalinato dos 2 grupos e o timol do grupo AT. Nesse mesmo dia foi aplicado o medicamento controlo nas 20 colónias do ensaio. Foi escolhido o Apivar® como controlo por apresentar resultados de eficácia contra *Varroose* elevados e por ter como molécula ativa o amitraz, de família diferente do timol e do fluvalinato.

Devido ao aumento das temperaturas na segunda semana de outubro de 2011, foram colocadas meias-alças sem quadros nas colónias do grupo TA (com exceção da 15, 19 e 20), por apresentarem sinais de evaporação excessiva de timol na colmeia (agitação excessiva e afastamento das abelhas da zona onde o timol se encontrava). As meias-alças foram retiradas a 18 de novembro desse ano.

Foram realizadas contagens de queda de *Varroa* nas 20 colónias todas as segundas, quartas e sextas-feiras, de 8 de outubro a 2 de dezembro de 2011.

A 2 de dezembro foi avaliada a força das colónias em estudo, de forma a identificar algum desvio dos valores de queda de *Varroa* por existência de colónias fracas ou muito populosas.

Tabela n.º 3 – Desenho experimental – Aplicação de acaricidas.

	Grupo TA			Grupo AT		
	Timol	Fluvalinato	Amitraz	Timol	Fluvalinato	Amitraz
07-Out	Aplicado				Aplicado	
21-Out	Retirado	Aplicado		Aplicado		
18-Nov		Retirado	Aplicado	Retirado	Retirado	Aplicado
02-Dez	Fim do ensaio			Fim do ensaio		
Tempo de aplicação	14 dias	28 dias	14 dias*	28 dias	42 dias	14 dias*

\* - do dia da aplicação ao dia da última contagem de queda de *Varroa* realizada.

Por fim, foram recolhidas amostras (abelhas vivas, cartolina do tabuleiro do estrado sanitário e favos com criação) das colónias que não estavam incluídas no ensaio, a 27 de janeiro de 2012; e das colónias em ensaio a 7 de fevereiro de 2012, com o intuito de avaliar o estado sanitário de todo o apiário.

#### 4.1.7 - Avaliação da força das colónias

A avaliação da força das colónias foi realizada, como referido acima, a 7 de outubro (no período da tarde) e a 2 de dezembro de 2011 (de manhã). Para assegurar uma

homogeneidade de critérios, a força das colónias seguiu o método utilizado pela empresa Hifarmax nos seus ensaios anteriores.

Assim, a avaliação é realizada num dos lados dos quadros 2, 4, 6 e 8 do ninho de cada colmeia. Estes devem ser divididos em 4 partes iguais (mentalmente ou com a ajuda de um acetato), determinando qual a percentagem de cada uma dessas partes se encontra coberta por abelhas adultas (força das colónias em relação às abelhas adultas) (Figura n.º 21). A mesma observação é realizada para a criação (força das colónias em relação à criação) (Figura n.º 22).

Para cada quadrante, deve ser dada a pontuação seguindo os valores da Tabela n.º 4.

Figura n.º 21 – Lateral de quadro de ninho de uma colmeia dividido em quatro partes iguais para avaliação da força da colónia - abelhas adultas (fotografia original, 2011).



Figura n.º 22 – Lateral de quadro do ninho de uma colmeia dividido em quatro partes iguais para avaliação da força da colónia - criação (fotografia original, 2011).



Tabela n.º 4 – Pontuação na avaliação da força das colónias.

Percentagem coberta	0 a 25%	25 a 50%	50 a 75%	75 a 100%
Pontuação	0,25	0,5	0,75	1

Em seguida, deve-se somar a pontuação obtida nos quatro quadrantes do quadro, somar este valor ao obtido nos outros 3 quadros, e por fim, multiplicar por 5, sendo o valor máximo possível de obter de 80. Obtemos assim um valor de força de colónia para o número de abelhas adultas e quantidade de criação.

#### **4.1.8 - Medições e análises**

##### **4.1.8.1 - Força das colónias**

A força das colónias foi medida a 7 de outubro de 2011, antes do início do ensaio, e no dia 2 de dezembro de 2011, no dia da última contagem de queda de *Varroa* sp.

##### **4.1.8.2 - Dados meteorológicos**

Os dados meteorológicos foram recolhidos na estação meteorológica da Tapada da Ajuda, localizada, em linha reta, a menos de 100 m do Posto Apícola. Foram assim recolhidas informações sobre a temperatura máxima e mínima diária, a precipitação, o número de horas de insolação e a humidade relativa. Alguns dados não puderam ser obtidos por falha mecânica ou impossibilidade humana.

##### **4.1.8.3 - Contagem de queda de Varroas em T<sub>0</sub>**

A queda de Varroas por morte natural foi contabilizada na semana de 3 a 7 de outubro de 2011. Os estrados sanitários foram colocados sucessivamente (por falta de material para fazer uma única contagem) em todas as colmeias do apiário, sendo higienizados e desinfetados entre cada utilização. A contagem foi realizada a olho nu e com auxílio de uma lupa manual.

##### **4.1.8.4 - Contagem de queda de Varroas durante o tratamento**

A contagem de queda de Varroas foi realizada todas as segundas, quartas e sextas-feiras, do dia da aplicação do primeiro acaricida (7 de outubro de 2011), até duas semanas após a aplicação do tratamento (2 de dezembro de 2011).

Tal como a contagem em T<sub>0</sub>, esta foi realizada a olho nu, com o auxílio de uma lupa manual, mas também com um contador mecânico devido ao elevado número de ácaros.

Em cada contagem foi registada a hora de recolha dos tabuleiros coletores, realizada de manhã entre as 9h30 e as 11h30 (consoante as condições meteorológicas), sendo recolocados após 2 a 3 horas (tempo de contagem), para poder calcular a queda estimada de Varroas para cada intervalo de tempo, contabilizando assim o tempo em que os tabuleiros não se encontravam na colmeia, caindo os ácaros mortos para o solo.

##### **4.1.8.5 - Eficácia de tratamento**

A eficácia de tratamento foi calculada para cada colmeia, utilizando o número da queda estimada de Varroas e aplicada na seguinte fórmula:

$$\acute{a}c = \frac{\acute{a}c_t}{\acute{a}c_t}$$

Foi também calculada a média de eficácia para cada grupo, de modo a poder compará-las.

#### **4.1.8.6 - Amostras analisadas no LNIV**

As amostras (abelhas adultas, favo com criação aberta e fechada, e cartolina do tabuleiro coletor do estrado sanitário), de todas as colónias (n=42) do apiário do Posto Apícola, foram rececionadas a no Laboratório de Patologia Apícola do LNIV a 8 de fevereiro.

Todas as amostras foram analisadas de acordo com os métodos referidos no ponto 3 deste documento.

#### **4.1.9 - Registo e análise de dados**

Os dados obtidos foram registados e trabalhados em base de dados do programa Office Excel 2007, sendo mais tarde feita análise estatística utilizando o programa SPSS Statistics 19 e Epi Info 7.1.0.6.

Para saber se existe interação entre o tempo de aplicação e a ordem de aplicação, entre os dois grupos, foi realizado o teste ANOVA com medidas repetidas. Para comparar a eficácia de tratamento entre os dois grupos, foi realizado o Teste-T não emparelhado.

Para determinar se a ocorrência de nosemose e varroose nas colónias pertencentes e não pertencentes ao ensaio, foram realizados testes Qui-quadrado ( $X^2$ ) para tabelas 2x2.

Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças para  $p < 0,05$ .

### **4.2 - Resultados**

#### **4.2.1 - Força das colónias**

A força das colónias a 07 de outubro variou de 20 a 52,5 em relação às abelhas adultas, com uma média de 31,82; e de 13,75 a 55 para a criação, com uma média de 32,13. A 02 de dezembro, as variações foram de 0 a 32,5 para abelhas adultas e de 5 a 55 para a criação, apresentando médias de 21,06 e 33,69 respetivamente (gráficos nº. 3 e 4).

É de salientar os valores correspondentes às colónias 7 e 17 no grupo AT, sendo que a primeira apresentou valores de força muito elevados (com exceção das abelhas adultas a 02 de dezembro), enquanto que a 17 apresentou valores baixos de força da colmeia, quase sem presença de abelhas adultas na segunda avaliação (gráficos nº. 3 e 4), acabando por ser pilhada a 15 de dezembro.

A força média relativa às abelhas adultas diminuiu, entre outubro e dezembro, de -10,5 e -11 para o grupo TA e AT, respetivamente. A força média das colónias em relação à criação aumentou ligeiramente no grupo TA (+0,63) e AT (+2,5) (Tabela n.º 5).

Gráfico n.º 3 – Força das colónias em relação às abelhas adultas a 7 de outubro e 2 de dezembro de 2011

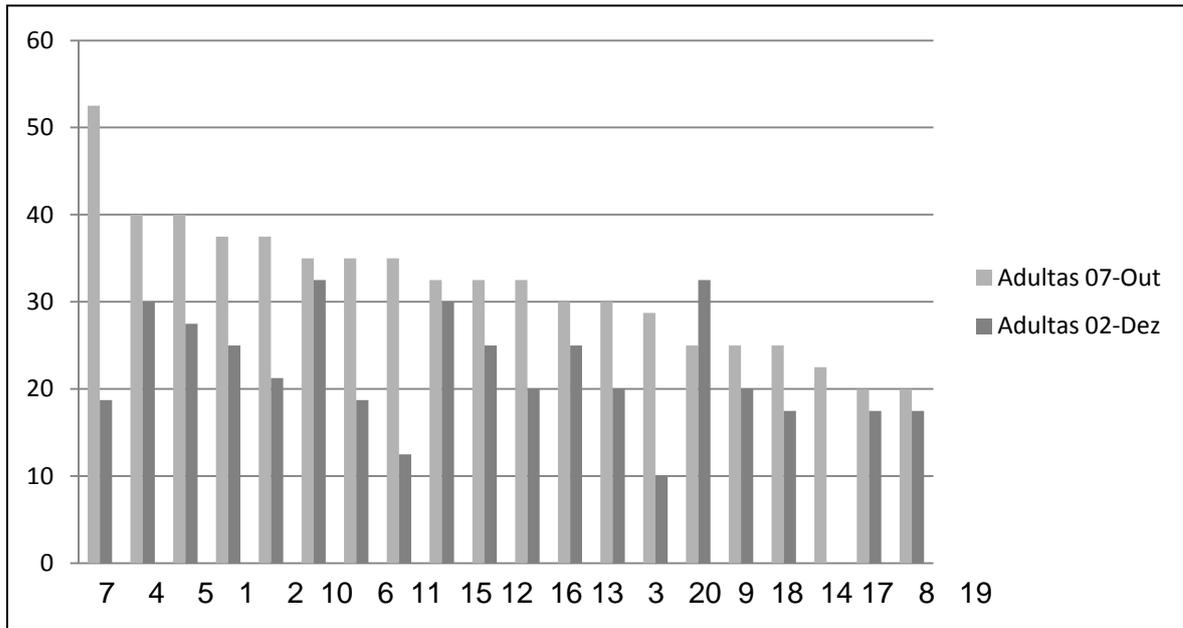


Gráfico n.º 4 – Força das colónias em relação à criação a 7 de outubro e 2 de dezembro de 2011

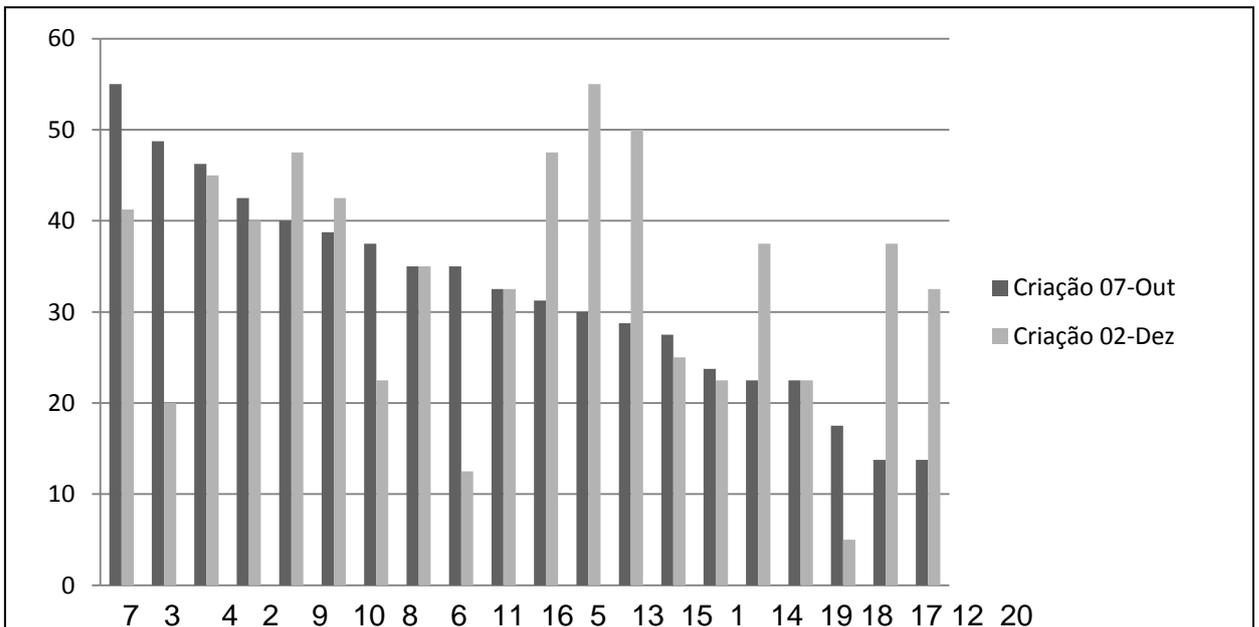


Tabela n.º 5 – Média e valores mínimos e máximos de força das colónias nos dois grupos em estudo – TA e AT.

	Grupo TA - Adultas		Grupo TA- Criação		Grupo AT - Adultas		Grupo AT- Criação	
	07-Out	02-Dez	07-Out	02-Dez	07-Out	02-Dez	07-Out	02-Dez
Média	31,38	20,88	31,63	32,25	32,25	21,25	32,63	35,13
Mínimo	20	10	13,75	12,5	22,5	0	17,5	5
Máximo	40	30	48,75	50	52,5	32,5	55	55
Variação	-	-10,5	-	+0,63	-	-11	-	+2,5

#### 4.2.2 - Dados meteorológicos durante o ensaio

Visto que as condições meteorológicas influenciam a vida numa colmeia, mas sobretudo porque influenciam a taxa de evaporação do timol, é importante relacionar a eficácia do tratamento com a temperatura ambiente.

Após a primeira aplicação de tratamento, registaram-se temperaturas máximas acima dos 30 °C (Gráfico n.º 5) (temperatura máxima para aplicação do timol), razão pela qual foi colocada uma alça vazia por colmeia do grupo TA (com timol nesse intervalo de tempo), com exceção das colónias 15, 19 e 20, que se encontravam à sombra de árvores grande parte do dia.

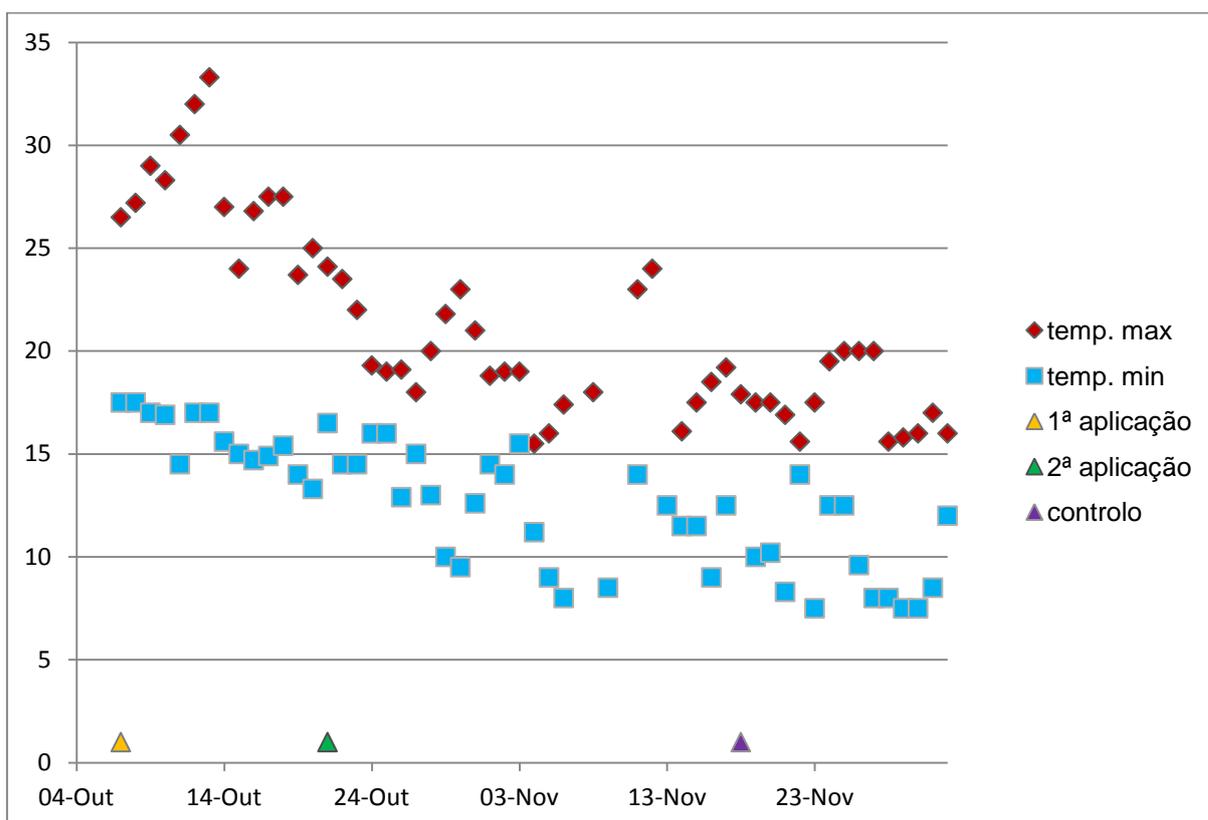
Após 18 de outubro, a temperatura máxima foi sempre superior a 15 °C, temperatura mínima aconselhada para o timol ser eficaz, e inferior a 25 °C (Anexos 1 e 2), temperatura máxima ideal.

A partir de 29 de outubro, as temperaturas mínimas foram inferiores a 12 °C (Anexos 2 e 3), temperatura mínima para haver evaporação de timol, o que afetou a ação deste acaricida. Isto levou a um ajustamento no tempo de aplicação de timol no grupo AT (28 dias em vez dos 14 do grupo TA), de modo a combater um possível erro de resultados por insuficiência de evaporação do medicamento. Este facto foi comprovado por manutenção das tiras de timol com aparência semelhante durante mais tempo neste grupo (AT), ao contrário do grupo TA, em que apenas sobrou a matriz celulósica das tiras em algumas colónias.

Os valores de precipitação foram nulos até 23 de outubro, sendo superiores a 10 mm apenas nos dias 24 e 27 de outubro, e 3, 5, 9, 13 e 19 de novembro (Anexos 1, 2 e 3), mas apenas coincidiu com contagem de quedas de *Varroa* nos dias 24 de outubro e 9 de novembro.

Durante todo o ensaio, a humidade relativa variou de 43 a 98%, com uma média de 75,2% (Anexos 1, 2 e 3).

Gráfico n.º 5 - Data de aplicação dos três acaricidas e temperaturas mínimas e máximas diárias registadas na estação meteorológica da Tapada da Ajuda, durante o ensaio.



#### 4.2.3 - Queda de Varroas em $T_0$

A contagem de queda de Varroas por morte natural em  $T_0$  foi realizada a 7 de outubro (Anexo 4). Para obter um valor de queda em 24 horas, foi dividido o valor obtido pelo número de horas em que os tabuleiros coletores se encontravam nas colmeias, multiplicando depois por 24, obtendo os valores finais indicados na Tabela n.º 6.

As colónias foram separadas deste modo, com o objetivo de obter uma média semelhante entre os dois grupos do ensaio. Embora haja valores muito afastados da média, não havia colónias disponíveis no apiário com número de Varroas contadas mais próximo, para serem incluídos neste estudo.

Tabela n.º 6 – Valores de queda estimada de Varroas em 24 horas no momento T<sub>0</sub>.

Grupo TA		Grupo AT	
Colmeia	nº Varroas/24h	Colmeia	nº Varroas/24h
1	508	6	348
8	257	9	285
3	138	14	225
11	133	18	134
15	115	5	120
12	109	16	116
2	90	13	70
4	70	10	54
19	67	17	44
20	43	7	38
Média	153	Média	143
Mínimo	43	Mínimo	38
Máximo	508	Máximo	348

#### 4.2.4 - Contagem de queda de Varroas

A contagem de queda de Varroas (Anexos 4, 5 e 6) decorreu de 7 de outubro a 2 de dezembro, todas as segundas, quartas e sextas-feiras.

A contagem média de Varroas em 24 horas apresentou uma variação semelhante nos dois grupos, sendo mais elevada nas colmeias em que se encontrava timol (Gráfico n.º 6).

Após a primeira aplicação dos acaricidas, o número de Varroas caídas apresentou um grande pico inicial. Ocorreu um decréscimo nas duas contagens seguintes, provavelmente devido à diminuição das temperaturas mínimas, sendo mais acentuado no grupo com timol.

É de salientar que durante a primeira aplicação, o grupo AT apresentou uma queda média de Varroas mais constante que o grupo TA, que apresentou maiores valores, mas mais suscetível a diferenças de temperatura ambiental.

Na segunda aplicação de acaricidas, o número de Varroas mortas voltou a aumentar, principalmente no grupo AT, que recebeu o timol.

Nas duas contagens seguintes, os números contabilizados sofreram um decréscimo, voltando a aumentar a 31 de outubro, momento em que aumentou a temperatura no apiário.

Após este quarto pico, o número médio de ácaros mortos em 24 horas foi diminuindo até atingir um número entre 30 a 50 Varroas caídas em 24 horas durante cinco contagens.

A 18 de novembro, foi aplicado o acaricida controlo (amitraz - Apivar®), apresentando na contagem seguinte um pico médio de 133 Varroas caídas em 24 horas, vindo depois a diminuir até valores de cerca de 30, momento em que terminou o ensaio.

Na última contagem realizada (2 de dezembro), foram obtidos valores mais elevados aos da contagem anterior, em algumas colmeias dos dois grupos.

No grupo TA, 55,38% do número total de Varroas foram contabilizadas antes da segunda aplicação, mas apenas 87,49% caíram antes da aplicação do acaricida controlo (Gráfico n.º 7).

O grupo AT apresentou valores de contagens de 44,62% e 91,37% do número total de Varroas, antes da aplicação do segundo acaricida e do controlo, respetivamente (Gráfico n.º 7).

Gráfico n.º6 – Valores de média da queda estimada de Varroas em 24 horas e desvio padrão, nos dois grupos e média geral. Data de aplicação dos três acaricidas.

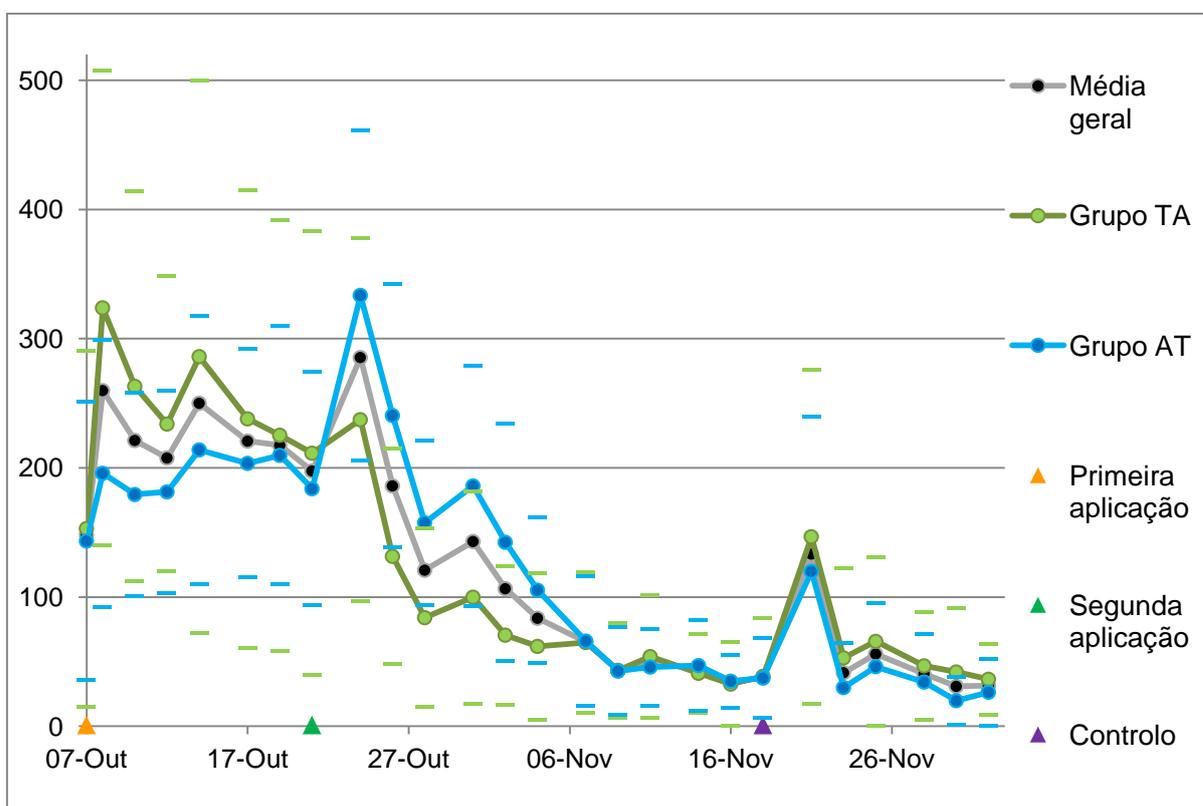


Gráfico n.º 7 – Percentagem acumulada de queda de Varroas ao longo de todo o ensaio.  
Data de aplicação dos três acaricidas.

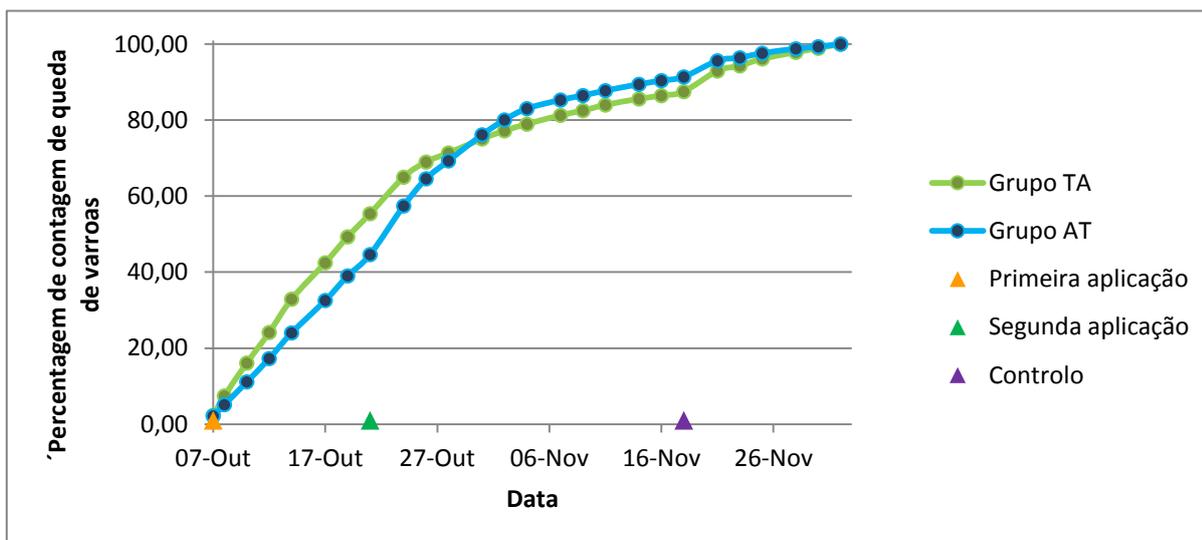
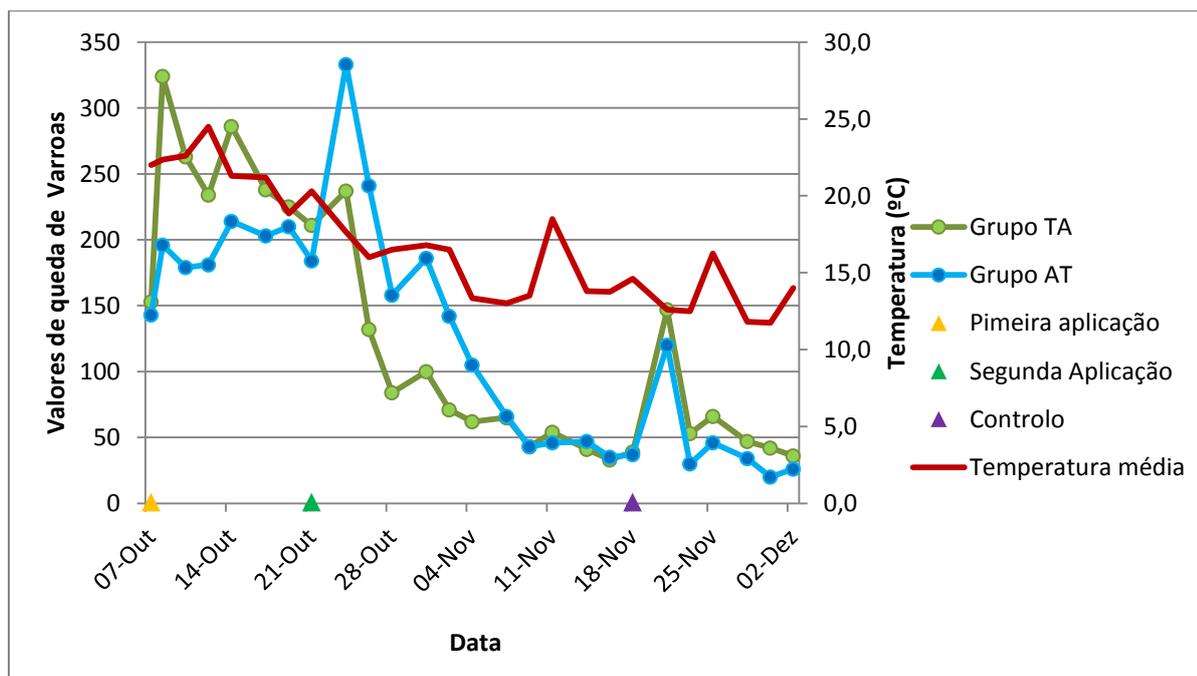


Gráfico n.º 8 – Valores de média da queda estimada de Varroas em 24 horas nos dois grupos, datas de aplicação e média de temperatura diária durante o ensaio.



No gráfico n.º 8 encontram-se os valores estimados de queda de *Varroa* em 24 horas nos grupos TA e AT, o momento de aplicação dos dois acaricidas em estudo e do acaricida controlo e a temperatura média diária durante o ensaio (valor obtido fazendo a média entre a temperatura máxima e mínima registada em cada dia). Observando este gráfico e os valores que constam nos Anexos 4 e 5, constatamos que a média de valores estimados de queda de *Varroa* em 24 horas é superior grupo em que está aplicado o timol, durante as primeiras duas semanas.

#### 4.2.5 - Eficácia de tratamento

Os resultados obtidos demonstraram maior média de eficácia de tratamento no grupo AT (91,2%), bem como menor desvio padrão (7,94). O grupo TA apresentou menor eficácia (87,3%) e maior desvio padrão (8,86) (Tabela n.º 7).

Tabela n.º 7 – Taxa de eficácia de tratamento, média geral e desvio padrão nos dois grupos em estudo.

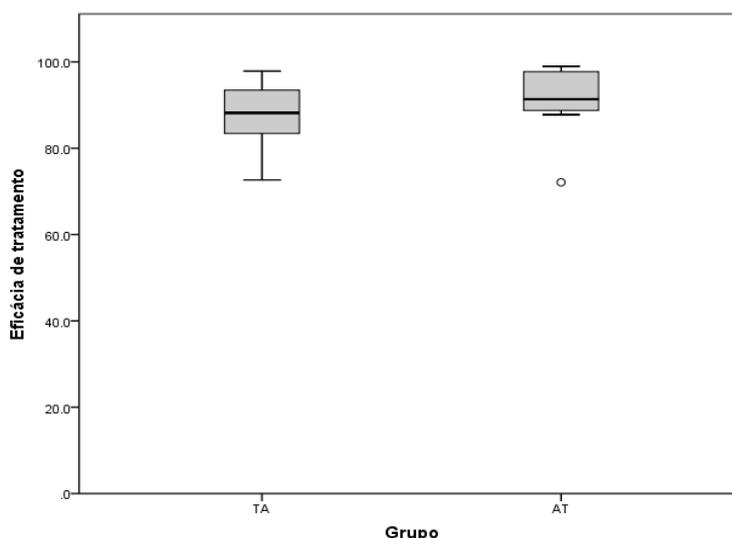
Grupo TA		Grupo AT	
Colónia n.º	Eficácia	Colónia n.º	Eficácia
8	97,9	18	99,0
12	96,2	9	97,8
19	93,4	14	97,7
15	92,9	17	97,0
1	89,3	10	92,6
4	87,1	13	90,2
20	86,9	5	89,5
11	83,4	6	88,8
2	72,8	16	87,8
3	72,6	7	72,1
<b>Média</b>	87,3	<b>Média</b>	91,2
<b>Desv.Padrão</b>	8,86	<b>Desv.Padrão</b>	7,94

É de salientar que as colónias 2, 3 e 7 apresentaram eficácia muito inferior (cerca de 72%) ao valor da média geral (89,2%)

Realizando o teste ANOVA (Anexo 7) para medidas repetidas, e tomando como estatisticamente significativas as diferenças para  $p < 0,05$ , concluímos que há interação entre tempo/modo de aplicação de tratamento entre os dois grupos em estudo, por apresentar um valor de  $p \leq 0,001$ .

Para avaliar a diferença estatística entre a taxa de eficácia de tratamento dos dois protocolos estudados (Gráfico n.º. 9), foi realizado o Teste-T não emparelhado (Anexo 7), tendo obtido como resultado  $p = 0,304$ , o que indica que não há diferença significativa entre os dois grupos (TA e AT), visto que  $p > 0,05$ .

Gráfico n.º 9 – Comparação da eficácia de tratamento entre o grupo TA e o grupo AT



#### 4.2.6 - Amostras analisadas no LNIV

Foram analisadas amostras de 42 colónias, 19 pertencentes ao ensaio e recolhidas dois meses após o término deste (Anexo 8), e 23 externas ao ensaio (Anexo 9). O estado sanitário da colmeia 17 não pôde ser avaliado por ter sido pilhada a 18 de dezembro de 2012, e posteriormente destruída.

Foram diagnosticados vários casos de nosemose, ascosferiose, loque americana e varroose.

Nas 19 colónias em estudo, 6 apresentavam nosemose (31,6%), 1 apresentava ascosferiose (5,3%) e duas loque americana (10,5%). Foram ainda encontradas Varroas, em abelhas adultas, criação e/ou no tabuleiro do estrado sanitário em 36,8% das colónias (7 colónias), mas a média de queda em 24 horas foi de apenas 0,42, com apenas uma colmeia a apresentar 2 Varroas.

O mesmo número de colónias apresentou nosemose (n=3), varroose (n=4) e loque americana (n=1), variando ligeiramente a percentagem de doentes nos dois grupos, devido à ausência da colmeia 17 no grupo AT. Apenas houve diferença para a ascosferiose, que se encontrava presente em apenas uma colmeia do grupo TA, contra nenhuma do grupo AT.

Nas restantes colónias do apiário (23) foi diagnosticado nosemose em 11 colónias (47,8%), ascosferiose numa colmeia (4,3%), e não foi detetada loque americana. Em 20 das 23 colónias (87%), havia presença de ácaros *Varroa destructor*, sendo que a contagem média de queda em 24 horas foi de 22, mas havendo duas colónias com valores superiores a 130.

Realizando testes Qui-quadrado, foi observado que não havia diferença significativa entre colónias pertencentes ou não ao ensaio com nosemose ( $p=0,286$ ), mas que havia diferença significativa para a varroose ( $p=0,0007$ ) (considerando estatisticamente significativas as diferenças para  $p<0,05$ ).

## 5. Discussão

---

Devido à diminuição da eficácia dos poucos acaricidas homologados em Portugal (Pires, Pereira & Murilhas, 2007), a utilização combinada de dois ou mais acaricidas tem vindo a apresentar-se como um possível substituto à aplicação de apenas um destes medicamentos (Nunes & Relva, 2011; Belleti & Vedova, 2012).

Aquando da análise de eficácia de tratamento contra a varrose utilizando um tratamento combinado Thymovar® + Apistan® (grupo TA, n=10) e Apistan® + Thymovar® (grupo AT, n=10), foram obtidos valores de eficácia de 87,3% e 91,2%, respetivamente; o que demonstrou não apresentar diferença significativa, após análise estatística com aplicação de um Teste-T não emparelhado.

Para perceber que fatores poderiam afetar estes resultados, foram avaliadas a força das colónias no momento  $T_0$  e no final do ensaio, os dados meteorológicos durante todo o ensaio e colhidas amostras de todas as colónias do apiário, de modo a avaliar o estado sanitário deste.

Força das colónias em  $T_0$ :

Na primeira avaliação das colónias do apiário (7 de outubro), foi obtida uma média de 31,82 para as abelhas adultas e 31,13 para a criação, o que nos indica que é um bom apiário, embora haja variações que, apesar de serem normais por se tratar de seres vivos, nos indicam que certas colmeias possam estar debilitadas pela presença de alguma doença. Esta variação da condição das colónias pode ser explicada por se tratar de um apiário experimental, o que levou a uma diferente gestão das colónias ao longo dos anos.

Os resultados obtidos na força das colónias a 7 de outubro indicaram também que a colónia 7 se encontrava com um elevado número de abelhas adultas, apesar de não apresentar contagem de queda de Varroas consistentes com esse número aquando da aplicação dos acaricidas em estudo. Isto pode indicar hábitos de higiene elevados por parte das abelhas desta colmeia e/ou resistência a algum destes acaricidas por parte da população de Varroas nela presente (Pires, 2005; Pires, Maia & Pereira, 2007a).

Queda de *Varroa destructor* em  $T_0$ :

Com os valores obtidos para a queda de Varroas por morte natural em 24 horas antes de iniciar o ensaio, juntamente com os valores de força das colónias, foram selecionadas quais as colónias a incluir no estudo, e separadas em 2 grupos o mais semelhantes possível. Tanto na força das colónias como nos valores de queda natural dos ácaros, as colónias apresentaram diferenças acentuadas, mas não havia alternativas pelo baixo número total de colónias do Posto Apícola.

Embora os *guidelines* (European working group for the coordination of research on integrated *Varroa* control, 2006) indiquem que apenas colónias com 1 a 42 Varroas mortas por dia devem ser incluídas no ensaio, tal não foi possível, sendo o valor máximo de 508. A utilização de colónias com números muito elevados de queda de Varroas pode prejudicar o ensaio por morte dessas colónias em casos de infestação massiva da colmeia por este ácaro. Por outro lado, podemos aferir se o tratamento é eficaz em colónias com grandes infestações de *Varroa destructor*, e não apenas na presença de pequena quantidade destes ácaros.

Queda de *Varroa destructor* e condições meteorológicas ao longo do ensaio:

Com os valores de queda diária resultante da ação dos acaricidas, podemos pensar que a ação do timol é mais exuberante que a ação do fluvalinato, que, por sua vez, apresenta uma ação mais estável e duradoura, o que se assemelha aos resultados obtidos por Nunes e Relva (2011), mas a aplicação conjunta dos dois medicamentos em estudo no grupo AT não nos permite tirar conclusões.

Devido à grande flutuação das temperaturas registadas, foi necessário um controlo constante da queda de Varroas e um ajustamento de protocolo de administração dos acaricidas. O Thymovar® deve ser aplicado durante 3 a 4 semanas (Andermatt BioVet AG, 2007), mas como grande parte do timol já havia evaporado da matriz celulósica ao fim de 2 semanas (em colmeias mais expostas ao sol e a temperaturas mais elevadas), e as contagens de *Varroa* se encontravam em regressão, foi decidido aplicar o segundo acaricida em todas as colmeias. Após esse período, as temperaturas baixaram, nunca passando dos 25° C, o que levou a uma dispersão mais lenta do timol, ficando 4 semanas nas colmeias do grupo AT (Murilhas & Casaca, 2005; Andermatt BioVet AG, 2007; CAP, 2007). Observando o Gráfico n.º 8, constatamos que os valores de queda de Varroas tende a aumentar com o aumento da temperatura, nas duas primeiras semanas em que o Timol se encontra nas colmeias de cada grupo, o que nos indica poder haver maior libertação do princípio ativo em temperaturas mais elevadas.

O Apistan® deve ser aplicado durante 6 a 8 semanas (Hifarmax, 2012), mas visto não ter modo de ação influenciado pela temperatura (Vita Europe, 2010), teve tempo de aplicação dependente do Thymovar®, ficando apenas 4 semanas no grupo TA e 6 semanas no grupo AT. Estas alterações ao protocolo não são viáveis na maior parte dos apiários, pois implica uma observação regular e de grande parte das colónias para saber quando aplicar o segundo tratamento.

As baixas temperaturas, tal como a elevada taxa de humidade relativa e a elevada precipitação, levam a que as abelhas coletoras permaneçam na colmeia durante mais tempo, aumentando a temperatura interna nesta, bem como o contacto entre abelhas e o acaricida, e mesmo entre as próprias abelhas (Jean-Prost, 1987). Este fator leva a um

aumento da propagação do medicamento pela colmeia, combatendo assim a menor evaporação do timol (CAP, 2007).

Da primeira avaliação da força das colónias para a segunda, diminui a força em relação às abelhas adultas nos dois grupos (TA=-10,5 e AT=-11), valores aproximados e consistentes com os obtidos num ensaio semelhante (Belletti & Vedova, 2012), o que seria de esperar pela diminuição da temperatura ambiente e do fluxo nectarífero. O aumento da força das colónias em relação à criação é ligeiro (TA=+0,63 e AT=+2,5), o que pode ser explicado pelo clima temperado da região onde se encontra o apiário, bem como ao aumento das temperaturas que tem vindo a acontecer nos últimos anos, pela baixa precipitação ocorrida durante o período do ensaio e pela presença constante de flores propícias para a alimentação das abelhas na Tapada da Ajuda, ao contrário do que acontece em países com Invernos mais rigorosos, em que deixa de haver criação no ninho (Imdorf, Charrière, Kilchenmann, Bogdanov & Fluri, 2003). Os valores obtidos para a colmeia 17 a 2 de dezembro ocorreram por falta de rainha na colmeia, provavelmente pelo facto da colónia se encontrar muito debilitada (os valores de força da colónia a 7 de outubro indicaram valores abaixo da média), o que previa uma possível pilhagem, vindo a acontecer 13 dias depois.

O aumento da queda de Varroas observado em algumas colónias na última contagem (2 de dezembro) (Anexo 6) pode ser explicado pela avaliação da força das colónias ter sido realizada antes da recolha dos tabuleiros coletores, o que poderá ter causado um aumento da queda destes ácaros, por manipulação da colmeia.

Quando analisados os valores de percentagem de Varroas caídas ao longo do ensaio, concluímos que os dois grupos apresentaram aumento gradual e semelhante, mas, como indicado anteriormente, sempre maior no grupo com timol aplicado.

Este fator é comprovado pela maior percentagem do número total de Varroas caídas no momento da aplicação do segundo acaricida, por parte do grupo TA (55,38%), do que o grupo AT (44,62%), mas cujos valores invertem no momento da aplicação do acaricida controlo (TA= 87,49% e AT= 91,37%).

Devido ao facto das colónias do Posto Apícola terem sido tratadas maioritariamente com fluvalinato (Apistan®) nos últimos anos, leva à possibilidade da presença de colónias com populações de *Varroa destructor* que apresentem resistência a acaricida (Pires, Maia & Pereira, 2007a), o que pode explicar a ação mais lenta deste acaricida.

Foi observado um aumento dos valores de queda, quase constante, nas contagens realizadas à Segunda-feira, muito provavelmente por não serem retirados os tabuleiros durante dois dias seguidos, na altura do dia de maior atividade das abelhas (de manhã) (Cicco, 2011).

Eficácia de tratamentos:

A eficácia das colônias variou de 72,6 a 97,9% no grupo TA, e de 72,1 a 99% no grupo AT, o que indica haver grande influência da condição da colmeia e das próprias abelhas nos resultados obtidos.

Devido ao pequeno número de ensaios realizados sobre o tratamento combinado com fluvalinato e timol (de que tenhamos conhecimento), não nos foi possível fazer grandes comparações com resultados anteriores.

De três ensaios realizados com este tipo de tratamento, todos apresentaram valores de eficácia superiores aos obtidos neste trabalho. No ensaio realizado com Apistan® (fluvalinato) e Apiguard® (com princípio ativo igual ao Thymovar®), foi obtida uma eficácia média de  $94,32 \pm 7,28\%$  (Nunes e Relva, 2011), superior aos 91,2% obtidos no grupo AT. O ensaio semelhante, realizado em 2012 por Belleti e Vedova, apresentou eficácia de 93,3%, mas foi adicionada Apiivert® e suplemento proteico ao fluvalinato e timol.

No estudo realizado no mesmo ano e no mesmo local deste trabalho, mas durante os meses de março a maio, com aplicação de Thymovar® (timol), Apistan® (fluvalinato) e Apivar® (amitraz, como controlo), foram obtidas eficácias de 90% a quase 100%, e média de  $97,16 \pm 3,54\%$ , valores bastante superiores ao grupo TA (87,3%).

Apesar disso, as médias de eficácia obtidas são superiores a valores obtidos por alguns autores nos últimos anos, em casos de aplicação de apenas um dos dois acaricidas em estudo, como o caso do fluvalinato com valores abaixo dos 86% (Al-Ghamdi, 2007; Pires et al., 2007a), do timol com eficácia de 67,1 a 70% (Castagnino, 2008), ou mesmo do acaricida controlo (amitraz) com resultados de 78% (Pires, Maia & Pereira, 2007b) e  $83,5 \pm 3,5\%$  (Floris, Satta, Delrio & Cabras, 2001).

Realizando o teste Anova para medidas repetidas, concluímos que houve interação entre tempo/modo de aplicação de tratamento ( $p < 0,05$ ), fator esperado devido à diferença do tempo de aplicação dos dois medicamentos, que foi influenciado pelas condições ambientais.

O Teste-T não emparelhado demonstrou não haver diferença significativa entre a eficácia de tratamento nos dois grupos ( $p = 0,304$ ), o que confirma a aproximação dos resultados das médias (TA= 87,3% e AT= 91,2%).

Resultados obtidos no LNIV:

Com os resultados obtidos pela análise de amostras das colônias de todo o apiário, observámos que o tipo de protocolo utilizado nos dois grupos não afeta a colmeia em relação a outras doenças, e nem mesmo à varroose. Não acreditamos que a presença de ascosferiose numa colmeia do grupo AT seja por influência dos acaricidas utilizados.

A presença de ascosferiose é baixa no apiário, ocorrendo em apenas duas colônias, uma colónia pertencente ao ensaio e outra externa a este, o que seria de esperar, visto ser uma

doença que ocorre principalmente em colónias fracas e desnutridas (CAP, 2007), o que não era o caso no Posto Apícola.

As duas colónias em que foi diagnosticada loque americana pertenciam aos grupos TA e AT, mas acreditamos que seja por contaminação do solo (CAP, 2007) por colónias existentes anteriormente no local onde se encontravam estas duas.

A percentagem de infestação das colónias externas ao ensaio com nosemose (47,8%) é superior à obtida das colónias do ensaio (31,6%), mas esta diferença não é estatisticamente significativa ( $p=0,286$ ), embora pudesse ser explicado pela maior debilidade das primeiras por conterem maior número de Varroa (Budge, 2008). Este facto é visível pela alta percentagem de colónias não pertencentes ao ensaio (87%), com queda natural de Varroas (apresentando estas uma média de 22 Varroas em 24 horas), comparada à percentagem das colónias pertencentes ao ensaio (36,8%), e que apresentaram queda de 1 a 2 Varroas em 24 horas. Esta diferença de diagnóstico de varroose é estatisticamente significativa, visto que  $p<0,05$  ( $p=0,0007$ )

Isto leva-nos a acreditar que o fator preponderante na presença de varroose nas amostras processadas é a aplicação de um terceiro acaricida (amitraz como controlo), o que veio a diminuir ainda mais a população de *Varroa destructor*, fortalecendo colónia (Thrasylvoulou et al., 2008; Gajger, Kozaric, Berta, Nejedli & Petrinec, 2011).

Ao longo de todo o ensaio, deparámo-nos com alguns obstáculos na realização do mesmo. O facto de não haver maior número de colónias limitou a organização de dois grupos controlo homogéneos entre si, e entre as colónias de cada grupo.

Por não se poder controlar os fatores ambientais houve necessidade de realizar algumas alterações do protocolo ao longo o ensaio, por parte da empresa fornecedora dos acaricidas, de modo a adaptar o modo de administração destes medicamentos às temperaturas diárias e previstas. Isto indica-nos que é difícil realizar um protocolo fixo, mesmo determinando vários protocolos para aplicar em diferentes épocas do ano, aumentando a probabilidade de aplicação incorreta dos acaricidas por parte dos apicultores. A presença de precipitação nos dias de recolha de tabuleiros dificultou este processo, tal como contagem dos ácaros da espécie *Varroa destructor*.

Na continuação deste trabalho, e de modo a obter resultados de maior eficácia e confiança, deveriam ser feitas algumas alterações a este desenho experimental.

Os acaricidas deveriam ser aplicados durante o tempo mínimo indicado pelo distribuidor (3 semanas para o Thymovar® e 6 semanas o Apistan®). De modo a não aplicar o timol em temperaturas baixas, o ensaio deveria iniciar-se em setembro, ou num local com temperaturas mais elevadas durante o outono.

As colmeias deveriam ser protegidas da chuva, de modo a que não entrasse água para o tabuleiro dos estrados sanitários, revestidos com uma substância com propriedades autocolantes, de modo a impossibilitar a fuga de Varroas ainda vivas.

De preferência, deveriam ser escolhidas colónias com populações de *Varroa* semelhantes, que não ponham em causa a viabilidade do enxame, não resistentes aos acaricidas em estudo (realizando testes prévios), e colocadas em apiários isolados, de modo a diminuir contaminações cruzadas e pilhagens.

Deveriam também ser utilizados três grupos controlo, um sem tratamento, e os outros com a aplicação de apenas um acaricida.

Embora os objetivos do estudo tenham sido realizados, para melhorar a confiança nos resultados, o ensaio deveria ser realizado noutros apiários, em várias localizações do país, pois a eficácia pode variar, como já referido, pelas condições ambientais e pela presença de populações de *Varroa destructor* resistentes a certos acaricidas.

## 6. Conclusão

---

Para este estudo, foram utilizados dois grupos com 10 colónias cada ( $n=10$ ), sendo aplicado um acaricida após o outro, com ordem invertida em cada um dos grupos. A eficácia média de tratamento foi de 87,3% no grupo com primeira aplicação de timol, e de 91,2% no grupo em que foi aplicado em primeiro lugar o fluvalinato.

Ao realizar a contagem de queda de Varroas e a força das colmeias no momento  $T_0$ , concluímos tratar-se de um apiário heterogéneo, apresentando colónias com diferentes graus de infestação deste parasita e diferentes força de colónia.

A força das colónias diminui ao longo do ensaio para o número de abelhas adultas, o que seria de esperar com o avançar do outono. O aumento ligeiro da força das colónias em relação à criação pode dever-se ao combate eficaz à varroose.

Após análise estatística e através de um teste ANOVA para medidas repetidas, concluímos que há interação entre o tempo e o modo de aplicação de tratamento ( $p<0,05$ ). Com aplicação de um Teste-T não emparelhado, concluímos que não há diferença significativa entre os dois grupos ( $p=0,304$ ), o que seria de esperar visto os dois grupos apresentarem médias de eficácia de tratamento aproximadas ( $TA= 87,3\%$  e  $AT= 91,2\%$ ).

Apesar disto, as médias de eficácia foram ambas elevadas e superiores a estudos nacionais com aplicação de apenas um acaricida, apresentando-se assim, como uma boa alternativa para o combate ao *Varroa destructor*.

Visto que a queda de ácaros apresentou picos de contagens consistentes com os picos de aumento de temperatura, acreditamos que estes protocolos sejam dependentes da temperatura ambiental. Assim, a escolha entre os dois protocolos deverá pender mais pelas condições ambientais e o local onde será aplicado, do que propriamente a eficácia.

A aplicação de timol em primeiro lugar pode ser mais útil, visto que o seu modo de ação é influenciado pela temperatura, podendo mais facilmente atrasar ou adiantar o tratamento consoante as previsões meteorológicas. Por outro lado, no caso de tratamentos no fim do verão ou no início do outono, em que haja temperaturas muito elevadas, pode levar a que a sua aplicação em primeiro lugar não seja ideal, utilizando primeiro o fluvalinato, com modo de ação independente da temperatura.

Depois de analisadas as amostras colhidas em todas as colónias do apiário, concluímos que a presença de nosemose em colmeias do estudo e externas ao estudo não apresentava diferenças significativas. A presença de uma colmeia de cada um destes grupos com ascosferiose e de apenas duas do grupo das colónias em estudo com loque americana também nos indica não haver diferenças entre eles.

Avaliando a presença de varroose nos dois grupos, concluímos que a aplicação de três acaricidas tem eficácia, a longo prazo, bastante superior à aplicação de apenas dois acaricidas. Na contagens realizadas no final do mês de janeiro 2012, as colônias em estudo apresentaram média de queda de *Varroa destructor* em 24 horas de 0,4, enquanto que as restantes colônias, em que apenas foram aplicados os dois acaricidas em estudo (timol e fluvalinato), apresentaram média de 22 ácaros desta espécie. Após análise estatística por teste Qui-quadrado ( $X^2$ ) para tabelas 2x2, concluímos que houve diferenças significativas nos resultados de diagnóstico de varroose nas colmeias do estudo e nas colmeias externas ao estudo, visto que  $p=0,0007$ .

Neste ensaio não foi avaliado o ponto de vista económico, pelo que seria necessário comparar os resultados da produção de mel (e outros produtos da apicultura), entre grupos e entre estes e um grupo controlo, e os custos de cada tratamento. Embora este fator possa não ser de grande relevância para grande parte dos apicultores nacionais, visto que os medicamentos são fornecidos pelas associações de apicultores e financiados pelo Plano Apícola Nacional; e, por outro lado, porque está indicada a utilização de Apistan® e Thymovar® em duas aplicações (o que implica a compra do medicamento no dobro das quantidades), trata-se de um objeto de estudo interessante, principalmente para apicultores não afetos a associações apícolas, ou para outros países sem financiamento dos medicamentos.

## 7. Bibliografia

---

Al-Ghamd, A.A. (2007), Evaluation of the relative efficacy of different acaricides against *Varroa destructor* on *Apis mellifera carnica*. *Annals of Agricultural Science*, 52, 501-510. Acedido em Ago. 3, 2012, disponível em <http://faculty.ksu.edu.sa/alkhazim/Documents/papers/2t.pdf>

Allsopp, M. (2006). Analysis of *Varroa destructor* infestation of Southern African honeybee populations. Dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. Pretoria: Faculty of Natural & Agricultural Science – University of Pretoria.

Almeida, C.M.V.B. (2010). Detecção de contaminantes no mel. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Andermatt BioVet AG (2007). Thymovar® – Package leaflet. Acedido em abril 14, 2012, disponível em: [http://www.biovet.ch/en/images/stories/ABV/Produkte/THYMOVAR®/THYMOVAR®-Package\\_leaflet.pdf](http://www.biovet.ch/en/images/stories/ABV/Produkte/THYMOVAR®/THYMOVAR®-Package_leaflet.pdf)

Barros, L., Álvares, R., Dias, L., Pires, S., Vilas-Boas, M. (2005). Performance of alternative acaricides in organic beekeeping under Portuguese northeast conditions [abstract]. Apimondia abstracts Ireland 2005, 39. Dublin: Apimondia.

BEE DOC (2012) *Bees in Europe & the Decline Of honeybee Colonies*. Acedido em Jul.14, 2012, disponível em <http://www.bee-doc.eu/index.php>

Belas, A.J.I. (2012). Resíduos de medicamentos veterinários em mel. Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.

Belletti, P., Vedova, G.D. (2012). *Efficacy of Apistan® plus Apiguard® treatment against Varroa destructor*. Italy: Beekeeper's Association of Gorizia.

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, 1-18. France: EDP sciences.

British Columbia Ministry of Agriculture and Lands [BCMAL] (2008). *Varroa mite detection methods*. Acedido em Jun. 22, 2012, disponível em: [http://www.agf.gov.bc.ca/apiculture/factsheets/222\\_vardetect.htm](http://www.agf.gov.bc.ca/apiculture/factsheets/222_vardetect.htm)

Budge, G. (2008). *Nosema ceranae* – what is *Nosema ceranae* and how do you test for it? Bee Craft, Jan.2008, 7-8. Acedido a Jan. 25, 2012, disponível em: <https://secure.fera.defra.gov.uk/beebase/downloadNews.cfm?id=8>

Calderone, N.W. (2002a). Evaluation of drone brood removal for management of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in the Northeastern United States. Cornell University Master Beekeeper Program. Acedido em abril 18, 2012, disponível em [http://www.masterbeekeeper.org/pdf/research\\_summary\\_05.pdf](http://www.masterbeekeeper.org/pdf/research_summary_05.pdf)

Calderone, N.W. (2002b). Integrated pest management *Varroa destructor* in the Northeastern United States using drone brood removal and formic acid. Cornell University Master Beekeeper Program. Acedido em abril 18, 2012, disponível em: [http://www.masterbeekeeper.org/pdf/Varroa\\_drone\\_removal.pdf](http://www.masterbeekeeper.org/pdf/Varroa_drone_removal.pdf)

Castagnino, G.L.B. (2008). Produtos naturais no controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas *Apis mellifera* L. (Africanizadas). Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia para obtenção do título de Doutor. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu – Universidade Estadual Paulista.

Chiesa, F. (1991). Effective control of Varroaosis using powdered thymol. *Apidologie*, 22, 135-145. France: EDP Sciences.

Cicco, L.H.S. (2011). Ciclo evolutivo das abelhas. Acedido em Ago. 25, 2012, disponível em <http://www.saudeanimal.com.br/abelha25.htm>

Colin, M.E. (2002). Alternative control of the varroosis. CIHEAM. Acedido em abril 22, 2012, disponível em <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/c21/97605910.pdf>

COLOSS (2012). Prevention of COlony LOSSes network. Acedido em Jul. 14, 2012, disponível em <http://www.coloss.org/>

Confederação dos Agricultores de Portugal (2007). *Manual de sanidade apícola: sintomas – profilaxia – controlo*. Lisboa: FNAP.

European working group for the co-ordination of research on integrated *Varroa* control (2006). *Technical guidelines for the evaluation of treatments for control of Varroa mites in honey bee colonies*. Acedido a Ago. 22, 2012, disponível em: <http://www.agroscope.admin.ch/imkereii/00316/00329/04435/index.html?lang=en>

Courtney, G.W, Pape, T., Skevington, J.H., Sinclair, B.J. (2009). Biodiversity of dipteral. In R. Footitt & P. Adler (Eds.), *Insect biodiversity: science and society*. (pp.185-222). Acedido em maio 1, 2012, disponível em: [http://www.canacoll.org/Diptera/Staff/Skevington/pdfs/Courtney\\_Biodiversity\\_of\\_Diptera\\_2009\\_Smaller\\_file.pdf](http://www.canacoll.org/Diptera/Staff/Skevington/pdfs/Courtney_Biodiversity_of_Diptera_2009_Smaller_file.pdf)

Decreto-Lei n.º 203/2005 de 25 de novembro. Diário da República – I Série-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa,

Direção Geral de Veterinária (2008). Doenças das abelhas – diagnóstico, tratamento e profilaxia. Lisboa: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Direção Geral de Veterinária (2011). Programa Sanitário Apícola 2011. Lisboa: Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.

Edinburgh and Midlothian Beekeepers' Association (2009). Bee diseases and their management – braula. Acedido em Jun 15, 2012, em: <http://www.edinburghbeekeepers.org.uk/diseases/Braula1.pdf>.

Faucon, J.P., Drajnudel, P., Fléché, C. (1995). Mise en évidence d'une diminution de l'efficacité de l'Apistan® utilisé contre la varroose de l'abeille (*Apis mellifera* L). *Apidologie*, 26, 291-296. France: EDP sciences.

Faucon, J.P., Drajnudel, P., Fléché, C. (1996). Varroose: mise en évidence de la résistance du parasite aux acaricides par la méthode de «détermination du temps letal moyen». *Apidologie*, 27, 105-110. France: EDP sciences.

Floris, I., Satta, A., Delrio, G., Cabras, P. (2001). Effectiveness and persistence of amitraz in plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apimondia 2001*. Acedido em Ago. 14, 2012, disponível em <http://www.apimondia.com/congresses/2001/Papers/313.pdf>

Gajger, I.T., Kozaric, Z., Berta, D., Nejedli, S., Petrinec, Z. (2011). Effect of the herbal preparation Nozevit on the mid-gut structure of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema* sp. spores. *Veterinarni Medicina*, 56, 344-351.

Gerritsen, L., Cornelissen, B. (2006). Biological control of *Varroa destructor* by fungi. *Proceedings of the Netherlands Entomological Society Meeting*, 17, 125-132. Acedido em Jun. 22, 2012, disponível em <http://www.nev.nl/sete/sete-2006/125-132-GerritCor-2006.pdf>

Godinho, J.S.P. (2009). Curso prático de apicultura: varroose. Lisboa: Posto Apícola – Unidade de Investigação de Silvicultura e Produtos Florestais.

Godinho, J.S.P. (2012). Curso prático de apicultura: introdução. Lisboa: Posto Apícola – Unidade de Investigação de Silvicultura e Produtos Florestais.

Goodwin, M., Eaton, C.V. (2001). Control of *Varroa* – a guide for New Zealand beekeepers. New Zealand Ministry of Agriculture and Forestry. Wellington: Words & Pictures.

Hamdan, K. (2009). Powdered sugar dusting in bee colonies as *Varroa* control - a bee-friendly way to knock down *Varroa* mites. Acedido em abril 18, 2012, disponível em: [http://www.countryrubes.com/images/Powdered sugar dusting in bee colonies as \*Varroa\* control updated 9 09 09l.pdf](http://www.countryrubes.com/images/Powdered%20sugar%20dusting%20in%20bee%20colonies%20as%20Varroa%20control%20updated%209%2009%2009l.pdf)

Hamdan, K. (2009). Preventing beeswax combs from wax moth damage. Acedido em abril 18, 2012, disponível em: [http://www.countryrubes.com/images/Preventing beeswax combs from wax moth damage.pdf](http://www.countryrubes.com/images/Preventing%20beeswax%20combs%20from%20wax%20moth%20damage.pdf)

Hamida, T.B. (2001). Enemies of bees. CIHEAM. Acedido em abril 22, 2012, disponível em <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/b25/99600245.pdf>

Health Canada Pest Management Regulatory Agency (2010). Thymol. Acedido em novembro 12, 2012, disponível em: [http://publications.gc.ca/collections/collection\\_2011/sc-hc/H113-9-2010-18-eng.pdf](http://publications.gc.ca/collections/collection_2011/sc-hc/H113-9-2010-18-eng.pdf)

Hifarmax (2010). Thymovar®. Acedido em Jul. 24, 2012, disponível em: [http://www.hifarmax.com/fckeditor\\_files/file/Thymovar®ES.pdf](http://www.hifarmax.com/fckeditor_files/file/Thymovar®ES.pdf)

Hifarmax (2012). Apistan®. Acedido em Jul. 24, 2012, disponível em: [http://www.hifarmax.com/fckeditor\\_files/file/aprApistan®.pdf](http://www.hifarmax.com/fckeditor_files/file/aprApistan®.pdf)

Higes, M., Martín-Hernández, R., Botías, C., Bailón, E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L., Nozal, M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G., Meana, A. (2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology*, 10, 2659-2669. Acedido em Jun. 10, 2012, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18647336>

Hoyo, M., Cabrera, C.G. (2004). *Varroa*, un problema com solución. Salta: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Imdorf, A., Charrière, J.D., Kilchenmann, V., Bogdanov, S., Fluri, P. (2003). Stratégie de lute alternative contre *Varroa destructor* en Europe centrale. *APIACTA*, 38, 258-285. Acedido em março 24, 2012, disponível em: <http://www.agroscope.admin.ch/imkereei/00316/00329/02078/index.html?lang=fr>

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana (2010) *Quaderni di zooprofilassi: aspetti igienico-sanitari in apicoltura*. Acedido em maio 1, 2012, disponível em <http://www.izslt.it/izslt/uploads/00000000-a8dc-01f3.pdf>

Jean-Prost, P. (1987). Apiculture. (pp170-219). Paris: J.b.baillièrè.

Jillson, K.M. (2006). The occurrence of *Acarapis dorsalis*, *Acarapis externus* and *Acarapis woodi* mites in honey bee populations surrounding Poitiers, France. Honors Baccalaureate of Arts in International Studies in Environmental Science thesis. Corvallis: Oregon State University.

Kanga, L.H.B., James, R.R., Boucias, D.G. (2002). *Hirsutella thompsonii* and *Metarhizium anisopliae* as potential microbial control agents of *Varroa destructor*, a honey bee parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*, 81, 175-184. Acedido em Jun. 22, 2012, disponível em <http://naldc.nal.usda.gov/download/17011/PDF>

L'Association Canadienne des Professionels de L'Apiculture (2008). *Nosema Disease – Diagnosis and Control*. Agriculture and Agri-Food Canada. Acedido em Jan. 25, 2012, disponível em <http://www.capabees.com/main/files/downloads/nosema.pdf>

Le Conte, Y., Ellis, M., Ritter, W. (2010). *Varroa* mites and honey bee health: can *Varroa* explain part of the economy losses? *Apidologie*, 41, 353-363. Acedido em Jan. 22, 2012, disponível em [http://www.apidologie.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/full\\_html/2010/03/m09176/m09176.html](http://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/full_html/2010/03/m09176/m09176.html)

Locke, B., Fries, I. (2011). Characteristics of honey bee colonies (*Apis mellifera*) in Sweden surviving *Varroa destructor* infestation. *Apidologie*, 42, 533-542. France: EDP sciences.

Lodesani, M., Colombo, M., Spreafico, M. (1995). Ineffectiveness of Apistan® treatment against the mite *Varroa jacobsoni* oud in several districts of Lombardy (Italy). *Apidologie*, 26, 67-72. France: EDP sciences.

Loncaric, I., Derakhshifar, I., Köglberger, E., Moosbeckhofer, R., Martín, R., Higes, M., Meana, A. (2007). First report of *Nosema ceranae* in colonies of *Apis mellifera carnica* in Austria. Austria: AGES.

Maia, M., Pereira, O., Pires, S., Murilhas, A. (2005). Beekeeping in Portugal. An updated overview focused on coping with *Varroa* [abstract]. *Apimondia abstracts Ireland 2005*, 39, 172. Dublin: Apimondia.

Martin, G.S. (2010). Female *Varroa destructor* on the head of a bee nymph. Acedido em Set. 6, 2012, disponível em: <http://www.flickr.com/photos/sanmartin/5048727154/in/set-72157624902505391>

Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas (2010). Plano apícola nacional – triénio de 2011-2013. Acedido em Fev. 25, 2012, em: [http://www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN\\_2011\\_13.pdf](http://www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN_2011_13.pdf)

Murilhas, A., Casaca, J. (2004). Conviver com a *Varroa* em Portugal – um contributo para a adopção de boas práticas apícolas de convivência com a *Varroa*. AVAPInt – apicultura, varrose, ambiente e protecção integrada. Évora: Universidade de Évora.

Murilhas, A., Casaca, J. (2005). Utilização do timol na luta contra a *Varroa* em Portugal. Apicultura, varrose, ambiente e protecção integrada. Évora: Universidade de Évora.

Murilhas, A.M. (2008). Apicultura e polinização – em que medidas poderemos evitar um desastre anunciado? O Apicultor. Acedido em Ago. 13, 2012, em: <http://www.oapicultor.com/artigos/Apicultura%20e%20Poliniza%C3%A7%C3%A3o.pdf>

Neto, J.G. (2009). Manual de criação de rainhas autóctones em Portugal. Lisboa: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal.

New Zealand Beeswax Ltd (2012a). Apivar® – FAQ's. Acedido em Ago. 15, 2012, disponível em <http://www.Apivar.co.nz/FAQs.htm>

- New Zealand Beeswax Ltd (2012b). Apivar® – Information. Acedido em Ago. 15, 2012, disponível em <http://www.Apivar®.co.nz/information.htm>
- Nunes, F. (2011). Acaricidas: resistências. Ourém: Hifarmax. Acedido em Jul. 25, 2012, disponível em [http://www.aarleiria.com/assets/files/pdf/Acaricidas\\_Resistencias.pdf](http://www.aarleiria.com/assets/files/pdf/Acaricidas_Resistencias.pdf)
- Nunes, F., Relva, C. (2011). À procura da máxima eficácia no tratamento da varroose: resultados da combinação Thymovar® ou Apiguard® com Apistan®. Lisboa: Hifarmax.
- Osterlund, E. (2008). Sustainable beekeeping. Bee Culture, June 2008, 34-37. Acedido em Jun. 12, 2012, disponível em <http://www.elgon.se/story-2008/SustainableBeek.pdf>
- Pereira, F.M., Lopes, M.T.R., Camargo, R.C.R., Vilela, S.L.O. (2003). Produção de Mel: Morfologia e Biologia das Abelhas *Apis mellifera*. Acedido em Fev. 01, 2012, disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/morfologia.htm>
- Pires, S.M.A (2004). Doenças das abelhas: a varroose. ArribasMel 2004 – 1º Encontro do Mel das Arribas do Douro. Acedido em março 28, 2012, disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/5896/3/Reprograf11061410230ARRIBASMEL2004.pdf>
- Pires, S.M.A. (2005). Contribuição para o estudo do comportamento higiénico associado ao ácaro *Varroa destructor* em colónias de abelhas melíferas portuguesas. Tese original submetida para a obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Pires, S.M.A., Josa, A., Costa, A. (2005). A infecção por ascosferiose de colónias higiénicas de abelhas melíferas. Veterinária Técnica, Mai/Jun 05, 38-47. Lisboa: Sindicato Nacional dos Médicos Veterinários.
- Pires, S., Maia, M., Pereira, O. (2007a). Fluvalinate-tolerant *Varroa* populations rapidly loose their lead against Apistan® [abstract]. Apimondia Programme & Abstracts, 40, 140-141. Melbourne: Apimondia.
- Pires, S., Maia, M., Pereira, O. (2007b). How challenging to Apivar® field treatments are amitraz-tolerant *Varroa* populations [abstract]? Apimondia Programme & Abstracts, 40, 140. Melbourne: Apimondia.
- Pires, S., Pereira, O., Murilhas, A. (2007). Field and laboratory testing for amitraz-tolerant *Varroa* populations. How comparable are their results [abstract]? Apimondia Programme & Abstracts, 40, 143. Melbourne: Apimondia.
- Pires, S.M.A., Cadavez, V., Valério, M.J. (2011). Prevalence and geographical distribution of *Senotainia tricuspis* (Meigen) [abstract] OIE Symposium Program. Acedido a Jul. 14, 2012, disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/6706/3/OIESENOTAINIA2011.pdf>

Potts, S.G., Roberts, S.P.M., Dean, R., Marris, G., Brown, M.A., Jones, R., Neumann, P., Settele, J. (2010). Declines of managed honey bees and beekeepers in Europe. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 15-22. Acedido em março, 24, 2012, disponível em <http://www.ibra.org.uk/articles/European-honey-bee-declines>

Puerta, F., Flores, J.M., Ruiz, J.A., Ruz, J.M., Campano, F. (2001). Fungal diseases of the honeybee (*Apis mellifera* L.). CIHEAM. Acedido em abril 22, 2012, disponível em <http://ressources.ciheam.org/om/pdf/b25/99600236.pdf>

Quintans, S. (2012). Sanidade Apícola. Curso Técnico de Apicultura. Venda Nova: Direcção Geral de Alimentação e Veterinária – Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território.

Ramos, J.M., Carvalho, N.C. (2007). Estudo morfológico e biológico das fases de desenvolvimento de *Apis mellifera*. *Revista Científica Electrónica de Engenharia Florestal*, 10. Acedido em Jul. 14, 2012, disponível em: [http://www.revista.inf.br/florestal10/pages/artigos/ARTIGO\\_05.pdf](http://www.revista.inf.br/florestal10/pages/artigos/ARTIGO_05.pdf)

Rinderer, T.E., Harris, J.W., Hunt, G.J., Guzman, L.I. (2010). Breeding for resistance to *Varroa destructor* in North America. *Apidologie*, 41, 409 - 424. Acedido em Jan. 22, 2012, disponível em [http://www.apidologie.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/full\\_html/2010/03/m09127/m09127.html](http://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/full_html/2010/03/m09127/m09127.html)

Roberts, T., Huston, D. (1999). Metabolic pathways of agrochemicals – insecticides and fungicides – part two, 670 – 677, 729 – 733. Acedido em Nov. 12, 2012, disponível em: [http://books.google.pt/books?id=2x53jP2qtUC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=qbs\\_qe\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.pt/books?id=2x53jP2qtUC&printsec=frontcover&hl=pt-PT&source=qbs_qe_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Rodrigues, R.F.L (2011). 11º Quadro, viver ou morrer com a *Varroa*. *O Apicultor*, 33-38. Acedido em março 24, 2012, disponível em: <http://www.oapicultor.com/artigos/11%C2%BA%20Quadro,%20Viver%20ou%20Morrer%20com%20a%20Varroa.pdf>

Rosenkranz, P., Aumeier, P., Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor* [abstract]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 96-119. Acedido em Fev. 22, 2012, disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201109001906>

Santos, F., Vaz, Y., Bragança, M., Valério, M.J., Quintans, S. (2007). Resultados do rastreio apícola nacional 2006. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102, 381.

Serrano, J.M.F. Pires, S.M.A., Puerta, F.P. (2001). Comportamento higiénico de *Apis mellifera* ibérica em células de criação de obreiras artificialmente infestadas com o parasita *Varroa*. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96, 71-74. Acedido a março 24, 2012, disponível em: [http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6\\_2001/Comporta.pdf](http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf6_2001/Comporta.pdf)

Serrano, J.M.F, Ruiz, J.A., Pires, S.M.A. (2002). Avaliação da população de ácaros *Varroa destructor* a partir da sua recolha nos estrados de colmeias de *Apis mellifera* ibérica. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 97, 193-196. Acedido em março 24, 2012, disponível em [http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12\\_2002/544\\_193\\_196.pdf](http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2002/544_193_196.pdf)

Shapiro, L. (2011). *Varroa destructor* Anderson & Trueman, 2000. Acedido em Ago. 28, 2012, disponível em <http://eolspecies.lifedesks.org/pages/23071>

Silva, C.M.R. (2010). Luta contra *Varroa destructor* Anderson & Trueman: avaliação de estratégias biotécnicas e bioquímicas com o óleo de *Mentha cervina* L. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia florestal e dos Recursos Naturais. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa.

Silva, M.J. V. (2011a). 1º Diagnóstico del *Aethina túmida* en la Unión Europea. Lisboa: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

Silva, M.J. V. (2011b). Principais doenças diagnosticadas no efectivo apícola de 2008 a 2010. Lisboa: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

Silva, M.J. V. (2011c). Senotainiose or apimíase. Lisboa: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

Skerl, M.I.S, Nakrst, M., Zvokelj, L., Gregorc, A. (2010). The acaricidal effect of flumethrin, oxalic acid and amitraz against *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera carnica*) colonies. *Acta Veterinaria Brno*. Acedido em Ago. 14, 2012, disponível em: <http://actavet.vfu.cz/pdf/201180010051.pdf>

The Food and Environment Research Agency.(2010). Managing *Varroa*. Acedido em Jun 15, 2012, disponível em <https://secure.fera.defra.gov.uk/beebase/index.cfm?pageid=167>

Thrasivoulou, A., Tananaki, Ch., Gkoras, G., Karazafiris, E., Lazaridou, E., Gounari, S., Dimou, M., Karagianni, A. (2008) *Nosema ceranae* in Greece and some attempts to control it. 1st International Mugla Beekeeping and Pine Honey Congress – Mugça, Turkey. Greece: Aristotelian university Thessaloniki.

vanEngelsdorp, D., Gebauer, S., Underwood, R. (2009). A modified two-queen system: “tower” colonies allowing for easy drone brood removal for *Varroa* mite control. *Science of Bee Culture*, vol.1, nº1, 1-4. Acedido em Jul. 22, 2012, disponível em: <http://ento.psu.edu/pollinators/publications/twoQueens>

Vita Europe (2010). Apistan® safety data sheet. Acedido em Jul. 15, 2012, disponível em [http://www.vita-europe.com/wp-content/uploads/MSDS\\_Apistan®\\_23Mar10.pdf](http://www.vita-europe.com/wp-content/uploads/MSDS_Apistan®_23Mar10.pdf)

Vita Europe (2012). AFB Diagnostic test kit. Acedido em Jul. 15, 2012, disponível em <http://www.vita-europe.com/products/afb-diagnostic-test-kit/>

Yañez, O., Jaffé, R., Jarosch, A., Fries, I., Moritz, R.F.A., Paxton, R.J., Miranda, J.R. (2012). Deformed wing virus and drone mating flights in the honey bee (*Apis mellifera*): implications for sexual transmission of a major honey bee virus. *Apidologie*, 43, 17-30. France: EDP Sciences.

## Anexos

### Anexo 1 – Dados meteorológicos durante o primeiro tratamento (estação meteorológica da Tapada da Ajuda).

	Temperatura máxima	Temperatura mínima	Precipitação	Horas de insolação	Humidade relativa%	
<b>07-Out</b>	26,5	17,5	0	9,4	61	Primeiro tratamento
<b>08-Out</b>	27,2	17,5	0	10	43	
<b>09-Out</b>	29	17	0	9,4	43	
<b>10-Out</b>	28,3	16,9	0	10	55	
<b>11-Out</b>	30,5	14,5	0	10	59	
<b>12-Out</b>	32	17	0	9,6	51	
<b>13-Out</b>	33,3	17	0	9,7	66	
<b>14-Out</b>	27	15,6	0	9,2	86	
<b>15-Out</b>	24	15	0	9,1	86	
<b>16-Out</b>	26,8	14,7	0	5,3		
<b>17-Out</b>	27,5	14,9	0	9,2	57	
<b>18-Out</b>	27,5	15,4	0	9,5	65	
<b>19-Out</b>	23,7	14	0	9,6	66	
<b>20-Out</b>	25	13,3	0	9,2	57	

**Anexo 2 – Dados meteorológicos durante o segundo tratamento (estação meteorológica da Tapada da Ajuda).**

	Temperatur a máxima	Temperatura mínima	Precipitação	Horas de insolação	Humidade relativa%	
<b>21-Out</b>	24,1	16,5	0	9,6	75	Segundo tratamento
<b>22-Out</b>	23,5	14,5	0	8,6	88	
<b>23-Out</b>	22	14,5	0	4,3	91	
<b>24-Out</b>	19,3	16	30,6	5,2	64	
<b>25-Out</b>	19	16	2,2	6,3	76	
<b>26-Out</b>	19,1	12,9	0	0		
<b>27-Out</b>	18	15	32,2	4,6	79	
<b>28-Out</b>	20	13	3,7	9,6	74	
<b>29-Out</b>	21,8	10	0	8,7	66	
<b>30-Out</b>	23	9,5	0	8,8	78	
<b>31-Out</b>	21	12,6	0	1,9	89	
<b>01-Nov</b>	18,8	14,5	2,5	1,1	79	
<b>02-Nov</b>	19	14	2	1	93	
<b>03-Nov</b>	19	15,5	39,5	5,9		
<b>04-Nov</b>	15,5	11,2	6,6	1,4	91	
<b>05-Nov</b>	16	9	10,5	7,5	79	
<b>06-Nov</b>	17,4	8	1,5	8,8	70	
<b>07-Nov</b>			0	8,6	73	
<b>08-Nov</b>	18			0		
<b>09-Nov</b>		8,5	47	0	79	
<b>10-Nov</b>						
<b>11-Nov</b>	23	14	0			
<b>12-Nov</b>	24					
<b>13-Nov</b>		12,5	52			
<b>14-Nov</b>	16,1	11,5	0	6,2	82	
<b>15-Nov</b>	17,5	11,5	0	6,2	80	
<b>16-Nov</b>	18,5	9	1,6	3,7	86	
<b>17-Nov</b>	19,2	12,5	0	7,5	77	

**Anexo 3 – Dados meteorológicos durante o tratamento controlo (estação meteorológica da Tapada da Ajuda).**

	Temperatura máxima	Temperatura mínima	Precipitação	Horas de insolação	Humidade relativa%	
<b>18-Nov</b>	17,9		0	1,2		Tratamento Controlo
<b>19-Nov</b>	17,5	10	31,6	3,6	84	
<b>20-Nov</b>	17,5	10,2	0	7,2	81	
<b>21-Nov</b>	16,9	8,3	0,7	0,5	79	
<b>22-Nov</b>	15,6	14	1,2	2,2	78	
<b>23-Nov</b>	17,5	7,5	7	8,6	75	
<b>24-Nov</b>	19,5	12,5	0	8,8	72	
<b>25-Nov</b>	20	12,5	0	8,8	67	
<b>26-Nov</b>	20	9,6	0	8,7	79	
<b>27-Nov</b>	20	8	0	8,8	79	
<b>28-Nov</b>	15,6	8	0	8	81	
<b>29-Nov</b>	15,8	7,5	0	0,5	98	
<b>30-Nov</b>	16	7,5	0	5	91	
<b>01-Dez</b>	17	8,5			95	
<b>02-Dez</b>	16	12			87	

**Anexo 4 – Queda estimada de *Varroa* em 24 horas no momento T<sub>0</sub> e durante a aplicação do primeiro acaricida.**

Colmeia	07-Out	08-Out	10-Out	12-Out	14-Out	17-Out	19-Out	21-Out
	T <sub>0</sub>	Primeiro tratamento						
<b>1</b>	508	776	584	457	788	675	603	647
<b>2</b>	90	178	168	78	77	88	63	99
<b>3</b>	138	425	242	179	181	128	189	171
<b>4</b>	70	280	121	225	265	200	140	135
<b>5</b>	120	170	163	182	176	128	188	139
<b>6</b>	348	352	275	318	357	307	365	292
<b>7</b>	38	71	67	63	97	89	78	73
<b>8</b>	257	415	452	370	483	329	391	258
<b>9</b>	285	252	171	152	219	206	314	229
<b>10</b>	54	141	163	199	217	227	194	169
<b>11</b>	133	264	293	244	306	253	229	260
<b>12</b>	109	142	149	140	116	109	78	50
<b>13</b>	70	216	216	161	164	174	149	131
<b>14</b>	225	340	326	289	405	319	270	275
<b>15</b>	115	309	187	221	306	324	288	270
<b>16</b>	116	158	173	172	225	269	275	298
<b>17</b>	44	36	80	86	64	65	52	39
<b>18</b>	134	223	160	195	214	253	211	194
<b>19</b>	67	250	299	292	233	171	173	142
<b>20</b>	43	198	134	137	107	102	96	82
<b>Média Geral</b>	148	260	221	208	250	221	217	198
<b>Grupo TA</b>	153	324	263	234	286	238	225	211
<b>Grupo AT</b>	143	196	179	181	214	203	210	184

Anexo 5 – Queda estimada de *Varroa* em 24 horas durante a aplicação do segundo acaricida.

Colmeia	24-Out	26-Out	28-Out	31-Out	02-Nov	04-Nov	07-Nov	09-Nov	11-Nov	14-Nov	16-Nov	18-Nov
	Segundo tratamento											
1	576	334	238	274	116	104	134	88	116	63	67	58
2	204	131	111	134	86	115	122	65	68	59	33	43
3	236	205	165	176	187	171	150	106	134	107	94	158
4	337	113	75	147	76	34	64	25	27	29	20	25
5	335	313	242	330	290	157	153	98	100	70	35	42
6	483	269	165	306	303	195	143	107	82	109	60	92
7	492	244	185	220	177	161	87	42	62	92	60	88
8	280	113	44	31	27	19	34	22	27	21	8	7
9	390	407	220	226	126	106	40	28	38	21	19	17
10	230	158	99	126	65	50	15	14	19	25	31	29
11	203	134	76	86	86	105	85	74	103	58	68	43
12	88	45	25	15	15	7	7	10	12	8	2	5
13	334	268	135	144	105	87	40	27	30	29	29	25
14	331	251	191	210	121	119	75	25	38	40	49	31
15	180	80	37	33	27	14	13	7	18	18	14	17
16	400	296	193	179	133	113	62	55	61	64	54	41
17	52	33	29	24	14	14	6	6	7	8	3	1
18	289	166	117	95	90	52	38	25	21	13	10	8
19	105	71	28	43	18	18	13	9	9	16	10	15
20	163	88	43	60	66	31	27	26	25	31	11	16
Média Geral	285	186	121	143	106	84	65	43	50	44	34	38
Grupo TA	237	132	84	100	71	62	65	43	54	41	33	39
Grupo AT	333	241	158	186	142	105	66	43	46	47	35	37

**Anexo 6 – Queda estimada de *Varroa* em 24 horas durante a aplicação do acaricida controlo.**

<b>Colmeia</b>	<b>21-Nov</b>	<b>23-Nov</b>	<b>25-Nov</b>	<b>28-Nov</b>	<b>30-Nov</b>	<b>02-Dez</b>
	<b>Tratamento controlo</b>					
<b>1</b>	199	100	114	115	117	83
<b>2</b>	204	94	171	64	81	60
<b>3</b>	417	219	172	120	136	69
<b>4</b>	152	23	37	26	18	51
<b>5</b>	145	39	65	40	29	40
<b>6</b>	243	36	90	60	25	64
<b>7</b>	384	115	153	119	60	66
<b>8</b>	24	2	14	7	8	9
<b>9</b>	24	11	13	11	4	3
<b>10</b>	70	13	27	16	17	14
<b>11</b>	273	58	81	57	15	23
<b>12</b>	10	3	4	8	5	6
<b>13</b>	99	16	30	36	18	41
<b>14</b>	42	10	6	5	7	4
<b>15</b>	60	9	25	17	20	26
<b>16</b>	168	53	73	53	35	29
<b>17</b>	14	0	1	0	1	0
<b>18</b>	8	7	4	2	1	2
<b>19</b>	46	9	16	19	12	13
<b>20</b>	82	12	23	35	9	24
<b>Média Geral</b>	133	41	56	40	31	31
<b>Grupo TA</b>	147	53	66	47	42	36
<b>Grupo AT</b>	120	30	46	34	20	26

## Anexo 7 – Análise estatística.

### ANOVA medidas repetidas

#### Mauchly's Test of Sphericity<sup>b</sup>

Measure:time

Within Subjects Effect	Mauchly's W	Approx. Chi-Square	df	Sig.	Epsilon <sup>a</sup>		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Lower-bound
tempo	.000		189		.117	.142	.053

Tests the null hypothesis that the error covariance matrix of the orthonormalized transformed dependent variables is proportional to an identity matrix.

a. May be used to adjust the degrees of freedom for the averaged tests of significance. Corrected tests are displayed in the Tests of Within-Subjects Effects table.

b. Design: Intercept + tratamento  
Within Subjects Design: tempo

#### Tests of Within-Subjects Effects

Measure:time

Source		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
tempo	Sphericity Assumed	15500853.96	19	815834.419	35.296	.000	.662
	Greenhouse-Geisser	15500853.96	2.228	6957588.885	35.296	.000	.662
	Huynh-Feldt	15500853.96	2.698	5744636.438	35.296	.000	.662
	Lower-bound	15500853.96	1.000	15500853.96	35.296	.000	.662
tempo * tratamento	Sphericity Assumed	1462045.390	19	76949.757	3.329	.000	.156
	Greenhouse-Geisser	1462045.390	2.228	656241.958	3.329	.041	.156
	Huynh-Feldt	1462045.390	2.698	541835.904	3.329	.031	.156
	Lower-bound	1462045.390	1.000	1462045.390	3.329	.085	.156
Error(tempo)	Sphericity Assumed	7905117.250	342	23114.378			
	Greenhouse-Geisser	7905117.250	40.102	197123.749			
	Huynh-Feldt	7905117.250	48.570	162758.146			
	Lower-bound	7905117.250	18.000	439173.181			

### Teste-T não emparelhado

#### Group Statistics

grupo	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eficácia TA	10	87.258981	8.8591300	2.8015029
AT	10	91.236681	7.9426298	2.5116801

#### Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower		Upper
Eficácia	Equal variances assumed	.219	.645	-1.057	18	.304	-3.9777002	3.7625730	-11.8825726	3.9271723
	Equal variances not assumed			-1.057	17.790	.305	-3.9777002	3.7625730	-11.8892818	3.9338815

**Anexo 8 – Resultados das amostras analisadas no LNIV provenientes das colmeias em estudo.**

Colmeia	Nosemose	Varroose	Ascosferiose	Loque Americana	Notas
07.1 (1)	-	1	-	-	
09.1 (2)	-	0	-	-	
11.1 (3)	-	0	-	-	
17.1 (4)	-	0	-	-	
18.1 (5)	-	1	-	-	
20.1 (6)	✓	0	-	-	
08.2 (7)	-	0	-	-	
10.2 (8)	-	1	-	✓	
11.2 (9)	✓	1	-	-	
12.2 (10)	-	0	-	-	
14.2 (11)	-	1	-	-	Colmeia fraca
15.2 (12)	✓	0	-	-	
16.2 (13)	-	0	-	-	
19.2 (14)	-	0	-	-	
23.2 (15)	-	0	-	-	
02.3 (17)	-----	-----	-----	-----	Pilhada a 02-Fev
03.3 (16)	✓	2	-	✓	
01.4 (18)	-	0	-	-	
05.4 (19)	✓	0	✓	-	
06.4 (20)	✓	1	-	-	

✓ : Diagnóstico positivo

- : Diagnóstico negativo

\* : Contagem de queda de Varroas em 24h

**Anexo 9 – Resultados das amostras analisadas no LNIV provenientes das colmeias do apiário não incluídas no estudo.**

<b>Colmeia</b>	<b>Nosemose</b>	<b>Varroose*</b>	<b>Ascosferiose</b>	<b>Loque Americana</b>	<b>Notas</b>
02.1	✓	1	-	-	
03.1	-	11	-	-	
04.1	-	1	-	-	
05.1	✓	22	-	-	
08.1	-	1	-	-	
13.1	✓	1	-	-	
16.1	-	2	-	-	
02.2	-	0	-	-	
03.2	✓	1	-	-	Colmeia fraca
04.2	-	54	-	-	
05.2	✓	57	-	-	
06.2	✓	132	-	-	
07.2	✓	5	-	-	
09.2	-	131	-	-	
18.2	-	0	-	-	Sem abelhas e criação
20.2	-	1	✓	-	
21.2	✓	2	-	-	
01.3	-	1	-	-	
04.3	-	13	-	-	
05.3	✓	13	-	-	
02.4	✓	30	-	-	
03.4	✓	34	-	-	
04.4	-	0	-	-	

✓ : Diagnóstico positivo

- : Diagnóstico negativo

\* : Contagem de queda de Varroas em 24h