



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Atomic study using hair as an environmental bio-indicator for monitorization of
Ecosystems**

**Miguel Mendes da Costa
Coimbra, 14 de Julho de 2017**



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Atomic study using hair as an environmental bio-indicator for monitorization of
Ecosystems**

Coimbra, 14 de Julho de 2017

Autor

Miguel Mendes da Costa

Aluno do Mestrado integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Prof. Doutora Ana Calado

Prof. Doutor António Silvério Cabrita

Prof. Doutora Teresa Mateus

Orientador Interno

Prof. Doutora Teresa Letra Mateus

Coorientador Interno

Prof. Mestre José Ricardo Cabeças

Orientador (es) Externo (s)

Eng.º Alfredo Cunhal Sendim

Herdade Freixo do Meio

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudo
Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

Resumo

Neste estágio curricular propusemo-nos a recolher amostras de pêlo de pequenos ruminantes de explorações em modo de produção extensivo com o objectivo de utilizar o pêlo como bio-indicador de elementos contaminantes presentes no ambiente onde os animais pastoreiam. As amostras obtidas surgiram de quatro regiões de Portugal, tendo sido armazenadas à temperatura ambiente até possibilidade de as preparar para a análise por espectroscopia de fluorescência de Raio-X.

A espectroscopia de fluorescência de Raio-X proporcionou-nos a identificação de metais pesados e outros elementos no pêlo. Com a informação obtida relacionámos a presença dos elementos identificados e a sua possível interacção no organismo dos animais, assim como tentar compreender a sua presença com as diferentes condições naturais e actividades antropogénicas encontradas entre as quatro regiões de Portugal.

As componentes práticas deste estágio curricular dividiram-se no contacto prático na área de Produção Animal Biológica na Herdade do Freixo do Meio, situada em Foros de Vale Figueira na região do Alentejo, actividades técnico-científicas no laboratório de Parasitologia da Escola Universitária Vasco da Gama onde se realizaram análises coprológicas, estudos na área da Apicultura, e preparação e processamento de amostras para análise no Trace Analysis and Imaging Laboratory do Departamento de Biofísica da Universidade de Coimbra.

Das actividades desenvolvidas resultaram relatórios parasitológicos com identificação de géneros parasitários do tracto gastro-intestinal e avaliação da carga parasitária ambiental em parques de certos grupos de animais em Alentejo e Minho, trabalhos técnico-científicos em Apicultura, assim como um estudo atómico com identificação de zinco, cobre, ferro e bromo em amostras de pêlo, que sugerem possível contaminação ambiental.

Abstract

For this curricular internship we proposed to collect samples of hair of small ruminants explored in outdoor livestock production. Our aim was to use hair as a bio-indicator of contaminant elements present in the environment where animals graze. We obtained samples from four regions of Portugal that were storage at environmental temperature until we could prepare them for analysis with X-Ray fluorescence spectroscopy.

X-Ray fluorescence spectroscopy assessments were made for identification of heavy metals and other elements present in hair. The information obtained was used to make relations between the presence of the elements found and their possible interaction within animal body as also to make a relationship between the presence of those elements and the natural conditions and anthropogenic activities in the different sampled groups of the four regions of Portugal.

The practice contact of the curricular internship was divided in activities in the field of organic animal production in Herdade Freixo do Meio, located in Foros de Vale Figueira in Alentejo, as well technical-scientific activities in the Parasitology laboratory of Escola Universitária Vasco da Gama (University of Veterinary Medicine) for coprological analysis, studies in the field of Apiculture, and preparation of samples of hair. Analysis has performed in The Trace Analysis and Imaging Laboratory fo Biophysics department of Coimbra University, being after studied.

Activities performed during internship resulted in parasitologic reports with identification of gastrointestinal parasites and evaluation of the parasitic load in groups of animals from Alentejo and Minho, technical-scientific works in the field of Apiculture, as also an atomic study with identification of zinc, copper, iron, bromine in hair samples, suggesting a possible environmental contamination.

Dedicatória

Dedico esta dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudo Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da Escola Universitária Vasco da Gama aos meus familiares, em especial à minha mãe, Aurea de Oliveira Mendes, e à minha irmã, Cátia Alexandra Mendes Cabrita, assim como a um especial amigo, Humberto Conceição, que tiveram um papel activo na minha formação e educação e que proporcionaram condições para que pudesse concluir esta etapa da minha vida. Gostaria também de dedicar este trabalho ao Professor Doutor Silvério Cabrita da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra pela dedicação e sabedoria que partilhou para a minha formação académica e desenvolvimento de competências pessoais e técnico-científicas.

Todo este trabalho é dedicado também a todos os Professores que acompanharam o meu percurso académico e que me apoiaram durante o caminho que percorri.

Agradecimentos

O projecto de investigação desenvolvido e que deu origem a esta Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudo Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da Escola Universitária Vasco da Gama resultou do apoio de diferentes entidades e pessoas ao qual agradeço e menciono em seguida:

- Escola Universitária Vasco da Gama – Instituição de Ensino Superior a qual disponibilizou os seus laboratórios e material de trabalho, assim como às pessoas que cooperaram para que tudo fosse realizado nas melhores condições. Esta instituição ao qual pertença como aluno foi o principal elemento que proporcionou a oportunidade e execução de todo o trabalho que apresento na dissertação, tendo estado sempre disponível em criar novas oportunidades e incentivar um excelente espírito de trabalho e de produtividade científica.

É com grande reconhecimento e gosto que agradeço à Prof^a Doutora Teresa Letra Mateus e ao Prof.^o Mestre José Ricardo Cabeças por toda a paciência, cuidado, disponibilidade e sabedoria que contribuíram na excelente orientação deste projecto de Investigação & Desenvolvimento e actividades do estágio curricular.

Agradeço ao Sr. Francisco Seco e à Sr.a Paula Amaral pelo apoio, atenção e tempo que prestaram na elaboração das actividades de laboratório e para que todo o processamento das amostras recolhidas em campo resultasse de forma correcta para posterior análise.

- Cooperativa Agrícola de Coimbra – Proporcionou a oportunidade e demonstrou interesse em ajudar na obtenção de amostras para o estudo desenvolvido e presente nesta dissertação.
- Herdade Freixo do Meio – Agradeço ao Eng.^o Alfredo Cunhal Sendim pelo seu interesse no projecto de estudo e toda ajuda prestada. Gostaria de agradecer também ao Eng.^o Gustavo Nunes pelo apoio e interesse prestado durante o desenrolar do estágio curricular.

Índice

1. Introduction	1
2. Material and methods	3
2.1. Study area	3
2.2.1. Sampling	5
2.2.2. Preparation of samples	5
2.3. X-ray Fluorescence Spectroscopy (XFS)	6
3. Results and Discussion	6
3.1. Zinc (Zn)	7
3.2. Copper (Cu)	8
3.3. Iron (Fe)	8
3.4. Bromine (Br)	9
4. Conclusions	9
5. Acknowledgments	10
Bibliographic references	11

Anexos

Anexo 1 - Examples of identified elements in sampled groups

Anexo 2 - Relatório de actividades do Estágio curricular

Anexo 3 - A importância da Polinização na Agricultura

Anexo 4 - Parasitas gastrointestinais em ovinos produzidos em modo de produção biológico numa herdade do Alentejo

Anexo 5 - Biodiversidade (também) parasitária em suínos de produção biológica no Minho e no Alentejo

Anexo 6 - Peso da Rainha à Emergência como fator de selecção de *Apis mellifera*

Índice de Figuras

Figure I – Locations in Portugal where samples were obtained

4

Índice de tabelas

Table I - Number of identified elements per sample group

7

Lista de Abreviaturas

ATPase - Adenosine triphosphatase

Br - Bromine

Cu - Copper

DNA - Deoxyribonucleic acid

Fe - Iron

g - Grams

Kev - Kilo electron volt

mm - Millimeters

pH - Potential of hydrogen

ROS - Reactive oxygen species

XFS - X-ray fluorescence spectroscopy

Zn - Zinc

°C - Degree centigrade

μA - Microamperes

% - Percent

Atomic study using hair as an environmental bio-indicator for monitorization of Ecosystems

Costa, M.^{1*}, Cabeças, J. R.^{1**}, Mateus, T. L.^{1***}

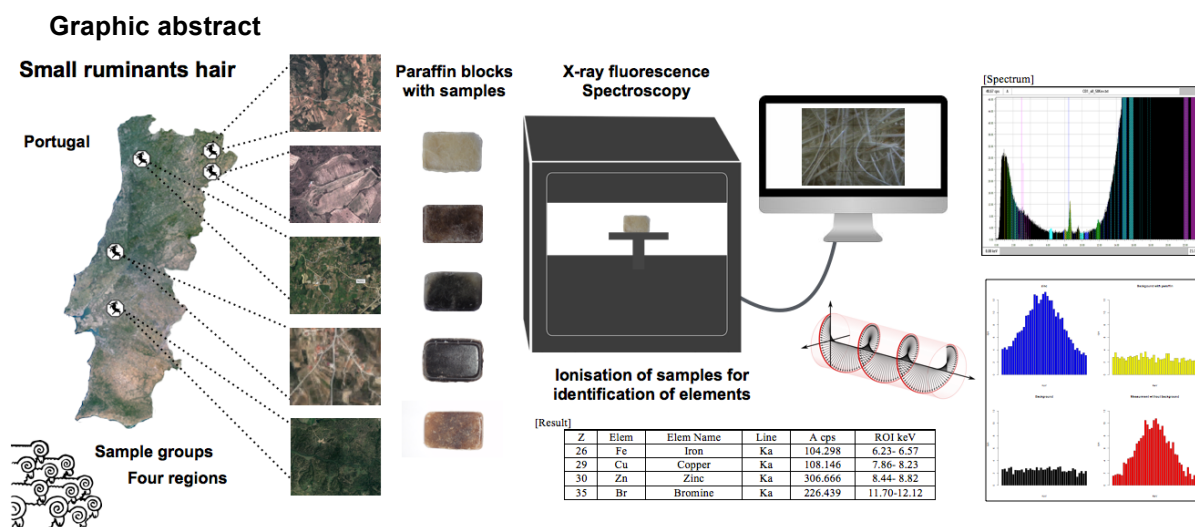
1- Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes, Campus Universitário – Bloco B, Lordemão, 3020-210 Coimbra, Portugal

*mendescosta@icloud.com

**jcabecas@gmail.com

***timateus@gmail.com

Atomic study using hair as an environment bio-indicator for monitorization of Ecosystems



Abstract

An accumulative tendency of contaminants in environment has been magnified by human actions that come mostly from industrial activities and miner exploration activities, leading to pollution of soils and water with heavy metals of difficult degradation. One sample that can be used to monitor environment and animal interactions is hair. This biologic tissue has the capacity to accumulate heavy metals from physiologic, metabolic and molecular interactions that come from diet and respiration in animals. The aim of our study was to evaluate the presence of heavy metals in wool from sheep explored in outdoor livestock production. We collected samples from four different regions of Portugal and from each local we obtained a minimum of ten samples, one sample per animal. Every farm had a different type of natural conditions and anthropogenic activities or history. Samples collected were first submitted to a clean phase to remove external contaminants and dust that resulted from environment contamination. Secondly, it was done a preparation with paraffin inclusion for each sample. This was done to maximize hair compaction and to eliminate free space. Analysis was done by X-Ray fluorescence spectroscopy with a machine SEA6000VX that permitted us to assess heavy metals qualitative identification by ionization of elements and recognition of energetic transitions giving form to unique signatures. Samples were submitted to one electromagnetic wave of 50 KeV for ionization of heavy metals with higher ionization energy. Our results showed an ubiquitous presence of Zinc in all samples within groups from different areas, with Copper as the second most abundant heavy metal found and also present in all regions where samples were collected. Iron was found in fewer samples from three different regions and bromine in two samples that we decide to collect from two goats in Beira Litoral taking into account the history from the local where they graze.

Highlights

- Evaluation of heavy metals in wool from sheep raised in outdoor livestock production
- Study comprehend four regions of Portugal with different natural and anthropogenic conditions
- Unique signature for each element by ionization and recognition of energetic transitions
- Use of hair for monitoring interactions within ecosystems indicated presence of zinc, copper, iron and bromine
- Copper and Bromine found in samples suggest a possibility of an environmental contamination with heavy metals

Key words: Zinc; Copper; Iron; Bromine; Ecosystem; Hair; Ruminants

1. Introduction

An ecosystem is made of a complex combination of interactions between different organism populations and their environment components which results in a functional unity with variable dimension (Garcia, Zerbi, Aliaume, Do Chi, & Lasserre, 2003). This functional unity, as Marcogliese (2005) referred, can be seen by the scientific community as controversial, because we have to consider the impact of anthropogenic activities that can affect homeostatic changes, distinct or consistent integrations of components that are combined in time and how their pre-determined development may be modified. All variables make difficult to understand over long periods of time how the ecosystem develops and maintain its own order to prevent erosion and to control appearance of diseases (Horwitz & Wilcox, 2005).

An important kind of component that integrate an ecosystem are elements. Heavy metals are a class of elements with relatively high density compared to water (Tchounwou, Yedjou, Patlolla, & Sutton, 2012) and their transfer in the environment depends mostly of their bioavailability. If water is contaminated then the uptake by plants can cause detrimental effect to grazing livestock and thus affect ecosystems (Iqbal et al., 2015). These heavy metals can be found in variable quantities within geosphere and be used continuously by different constituents in ecosphere. Elements as zinc, chromium and copper are heavy metals that can be of benefit to animals, contributing as functional elements in biologic and complex interactions (Lofty, Ezz, & Hassan, 2013). Other elements like cadmium and lead are non-essential to biologic organisms with accumulation in their tissues by incapacity of regulation and use for biologic functions and interactions (McLean, Koller, Rodger, & MacFarlane, 2009). These non-essential elements are constituents of nature and their presence in soils is normal, yet their concentration in tissues of animals and other kind of organism are not, and above all, their presence in human food chain can be problematic for public health, with hepatotoxic and nephrotoxic effects that can result in histopathological abnormalities and biologic dysfunction (Pereira, Pereira, Ribeiro, & Gonçalves, 2006).

Non-essential heavy metals are able to interact with essential trace or non-trace elements at level of absorption and also during the metabolism causing adverse effect in neurologic, reproductive, renal and hematologic systems after being absorbed and accumulated in cells and tissues of animals (D'Souza, Menezes, & Venkatesh, 2003).

Heavy metals like cadmium and lead are abundant in environment, but until today there isn't any proof of a significant biologic benefit for physiological mechanisms in animals. The origin of these heavy metals can come from nature or by human actions - so called anthropogenic activities. Some of those anthropogenic activities can be: carbon and mineral oil combustion, vehicle and industrial emissions, water contamination from industries, urban sewers and soil exploration, which contributes also for degradation of environment (Patra et al., 2007). High concentrations of heavy metals in tissues, as a result of long exposition over time, can increase adverse effects in animals' health, including human in the top of the trophic chain. For example, physiological alterations associated with high levels of exposure to cadmium in kidneys can

include granular degradations of proximal tubules that may result in necrosis and glomerular endothelial proliferation of epithelium (Larter et al., 2016).

An accumulative tendency in environment has been magnified by human actions that come mostly from industrial activities and mineral exploration activities, leading to pollution of soils and water with heavy metals of difficult degradation. This can not be interpreted lightly as these contaminants can give rise to lesions in nervous system and other organs that can contribute with growth delays in children, cancer development and death (Akpor & Muchie, 2010).

There are non-destructive methods that can be used with abiotic samples on the qualitative and quantitative evaluation of contaminants. Abiotic samples can't give specific information about how contaminants present within an animal, but just about the environment where they live. Choosing an ideal bio-indicator needs to have into account the capacity to efficiently accumulate contaminants from the environment where animals are integrated as also not to suffer functional alterations at a molecular or physiologic state that can change information within it (Vidal-Martínez, Pech, Sures, Purucker & Poulin, 2010).

One sample that can be used to monitor environment and animal interactions is hair. This biologic tissue has the capacity to accumulate heavy metals from physiologic, metabolic and molecular interactions that come from diet and respiration in animals. Endogenous origins in hair happen by incorporation of elements into their proteins over the formation time resulting in a firm and irreversible fixation (Sobańska, 2005).

Hair of mammals is a non-destructive sample easy to obtain with keratin as a protein rich in sulfidril and thiol groups, giving hair the affinity to link with different heavy metals that can appear from interactions with environment. The process of hair growth allows elements such as cadmium, lead, mercury, zinc to fix to keratin. This happens after elements absorption from tissue walls of pulmonary system or gastro-intestinal tract and successive bio-availability in blood circulation and distribution in body. The endogenous incorporation of elements in hair occurs via skin pores. An exogenous origin of elements can also occur by contact with soil and air and infiltration happens in sebaceous glands or from sweat to hair protein (Hernández-Moreno et al., 2013).

Non-essential heavy metals are known for their bio-accumulation and bio-magnification in trophic chain. The term bio-accumulation for contaminants refers to their accumulation over time inside live organisms where an origin can arise from other living organism or by contact with soil, water, air and diet. The term bio-magnification refers to a progressive development of some heavy metals over successive trophic levels (i.e. levels related to concentration and ratio between tissues from a predator comparing to tissues of a prey) depending how they are regulated and used within body (Lodén & Solonen, 2013). Other parameters need to enter into consideration then studying the impact of heavy metals, such as: age (younger animals are more metabolic active than adults), gender (females have more predisposition than males, because of getting pregnant and the need to eat more during some times of the year and to take care of their breeding), dimension of animal, kind of diet, type of metabolism (i.e. ruminant or carnivore) (Abbasi, Jaspers, Chaudhry, Ali & Malik, 2015).

Individual gender has an important role in genetic, physiology, morphology and behaviour of an animal. Reproductive state of females can express higher levels of heavy metals in tissues than compared to males. Age can reflect the quantity of some contaminants accumulated in the organism. Those contaminants can be higher as the animal get's older (consequence of long time exposure). But this rule is not the same for all heavy metals and for zinc, lead, cadmium and copper, higher levels can be presented in hair of younger animals between one and two years of age compared to adults (Hermoso de Mendoza García, Soler Rodríguez, García-Fernández, Llaneza, & Pérez-López, 2011).

Different geographic region is a parameter that can help to verify differences between element presentations. Also acquiring information about the history of places where samples can be obtained is important as anthropogenic actions like utilization of pesticides, miner activities, industrial activities, traffic roads, and others near sites where animals graze can influence heavy metals distribution in their bodies.

The aim of this study was to evaluate heavy metals in wool from sheep explored in outdoor livestock production. Sheep wool, as a type o hair, is also metabolically dead after it have left epidermis. Wool has been chosen as bio-indicator because, as referred by D'Havé et al. (2006), it is a non-destructive biologic sample, it's easy to get and the stress caused to an animal during samples collect is minimum, also it allows us to do successive assessments and to analyze different characteristics between different individuals within a population.

2. Material and methods

2.1. Study area

We collected samples from four different regions of Portugal (Figure 1) and from each local we obtained a minimum of ten samples, one sample per animal. Every farm had a different type of natural conditions and anthropogenic activities or history.

The different parameters of these locations were as above described:

- **AL group** - Alentejo (38.6830699, -8.3068762) had a history of use of pesticides in the past and have a high traffic road crossing near the fields where animals graze.
- **CB group** - Beira Litoral (40.30404, -8.41994) - samples were collected from small farms where animals graze or food is collected from pastures near an industrial zone with a concrete plant within a range of 3 to 3,5 Km from grazing lands.
- **TMAD group 1** (in the top of the map) - This location where samples were collected in Trás-os-Montes e Alto Douro (41.518290, -6.444767) does not have any significant anthropogenic activities or history of them.
- **TMAD group 2** - Trás-os-Montes e Alto Douro second location (41.510640, -6.265432) have a mine for exploration of Tungsten (W) functioning near pastures where animals graze.

- **M group** - Minho (41.793896, -8.540058) have intensive agriculture ongoing nearby the grazing sheep.

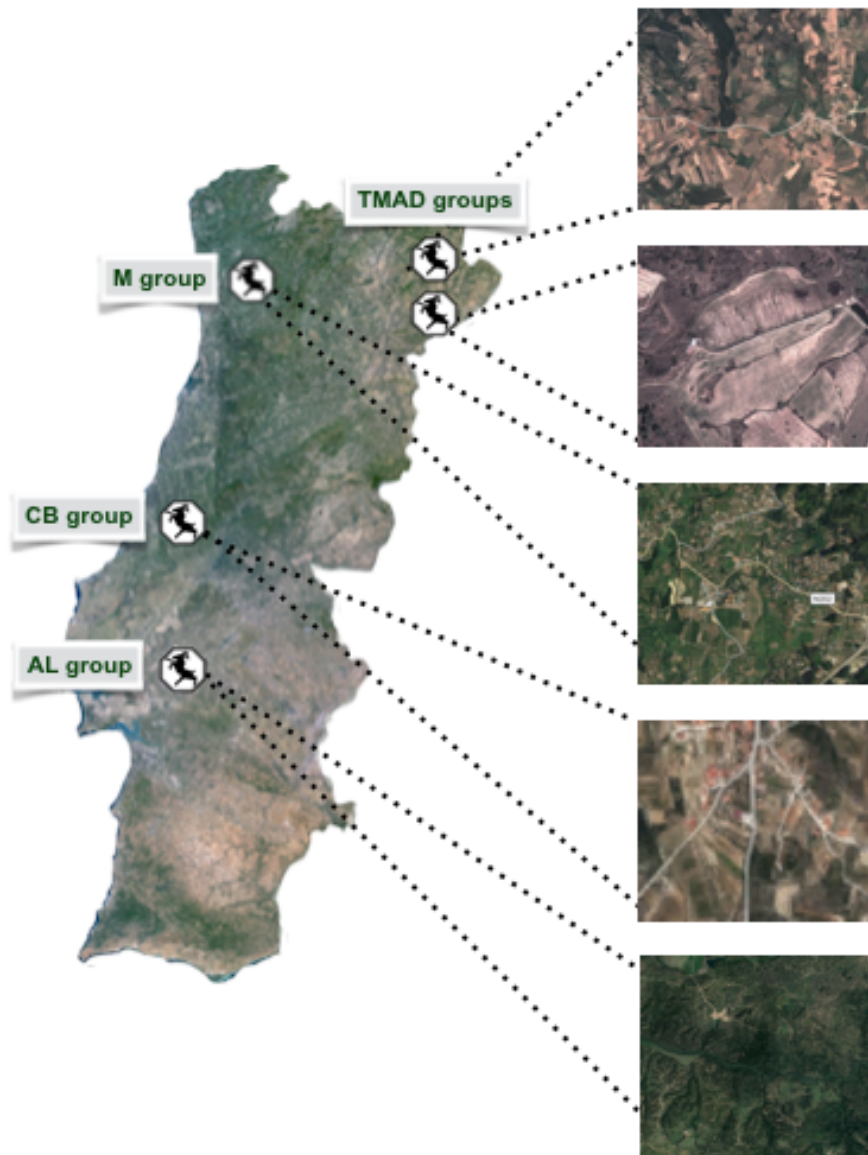


Figure 1 – Locations in Portugal where samples were obtained

2.2. Study sample

Sheep raised outdoor were chosen because of their close contact with environment and for possible interactions with heavy metals by inhalation of air particles or ingestion from their diet. Every year these sheep are subjected to a wool cut between May and July. We proposed to study wool with 6 to 8 months old to identify and measure heavy metals that may have contacted with our subjects between these months as also to evaluate if there is a relation between some essential heavy metals with non-essential ones from a perspective of animal health and Public Health. Bio-indicators sampling has been done in animals with selected

parameters to assure more concise results for analysis. Parameters selected for this study were animal gender for females, age between 1 and 2 years old, location (different region selection), taking into account history of anthropogenic activities of each place.

2.2.1. Sampling

All samples were obtained in the tail region with a scissor with round tips and a small portion of wool was obtained, being cutted near the skin. The samples of wool were collected to obtain all portions of hair – from near the skin (young portion) to the more distal portion (older portion of hair) – so we could gather all the possible information from each sample. After getting wool from animals, each sample from each individual was saved in a conservation bag with identification of gender, age and last wool cut.

2.2.2. Preparation of samples

Samples collected were first submitted to a clean phase to remove external contaminants and dust that resulted from environment contamination. The procedures performed were based on the methods applied by Beernaert, Scheirs, Leirs, Blust, & Verhagen, (2007), McLean, Koller, Rodger, & MacFarlane (2009), and Patra et al. (2007) and adapted has we describe them below.

1. Each sample was washed using a solvent with neutral pH to help removing dirtiness and other small contaminants external to the tissue;
2. Manually we removed all solid materials that were seized in wool;
3. Samples were washed with acetone to ensure the removal of all external contaminants;
4. Next we immersed and washed those samples in deionized water to ensure they were clean and remove acetone that could have been absorbed;
5. Wool has dried in paper to absorb water and stored at 40°C for 60 minutes in a laboratory stove;
6. After samples being dried they were brushed.
7. Afterwards a small amount of 0.5g of each sample was collected after being weighed.
8. The weighed samples were saved in sterile containers and stored in a laboratory freezer at -12°C.

The second phase of preparation was paraffin inclusion. This was done to maximize hair compaction and to eliminate free space. It was done to ensure a better analysis by X-Ray fluorescence spectroscopy (XFS). This method was based on Silva (2014) proceedings and adapted for hair. Each sample was placed in recipients with soft paraffin in a laboratory stove for about 48 hours at 60°C. Each day air particles were removed from recipients with hair and

soft paraffin. After mostly air particles disappeared from samples they were included in hard paraffin to create the paraffin blocks with compacted hair.

2.3. X-ray Fluorescence Spectroscopy (XFS)

According to Silva & Trindade (2014), samples absorption of XFS can identify elements by variation of energetic transitions. An energetic transition results from ionization of an element. This ionization creates an energetic unstable ion which releases electrons, generally from layers near the core of the atom, creating an intern gap. This intern gap will induce an electronic re-organization with discharge of photons to compensate the so called electromagnetic transitions. These transitions are recognized as specific energetic spectrums of an element making possible to obtain an unique signature for each element and their identification.

The paraffin blocks that contained compacted hair were submitted to one electromagnetic wave with 50 Kev (tube energy) energy to identify heavy elements. Other conditions that we used for our analysis were time measurement of 60 seconds, collimation of 3.0x3.0mm, filter for lead, and 1000 uA for tube current. The XFS machine used in this experiment was a SEA6000VX.

Before the analysis of the samples we took a measure of the background noise and another measure with a paraffin block without samples prior to samples analysis, saving the information obtained to a document for future use in interpretation of results. We used the background noise values for subtraction with isolated element values obtained from each sample with the same analysis conditions. Background noise with just a paraffin block was used to compare with the isolated graphics obtained for each element and background noise of that element.

3. Results and Discussion

XFS can be used for monitoring environmental contaminants with non-destruction of tissue samples. It helps to assess elements distribution and accumulation in tissues. Elemental analyses can indicate dietary habits and environmental influences on mineral accumulation as also the relative contribution of food sources (Buddhachat, Klinhom, Siengdee, & Brown, 2016). Our study selected a bio-indicator with capacity to bio-accumulate essential and non-essential metals that can bio-magnificate within water bodies by incorporation, deposition or assimilation, and thus contaminating tissues and organs of multicellular organism (Vahid, Alavi, & Zilouei, 2014). Analysis of body tissues can be useful to estimate exposure of heavy metals and potential health problems for grazing livestock (Smith, Dagleish, & Abrahams, 2010). The elements concentrations in hair are generally higher than blood or urine which makes analysis easier. Hair collection is non-invasive and the resulting material can be stored at room temperature for long periods with no measurable change in their composition (Hawkins & Ragnarsdóttir, 2009).

Identification of elements from each geographical region groups is shown in table 1.

Table 1 - Number of identified elements per sample group

	Zinc (Zn)	Copper (Cu)	Iron (Fe)
Alentejo	10 / 10	3 / 10	6 / 10
Trás-os-Montes e Alto Douro	20 / 20	8 / 20	0 / 20
Minho	10 / 10	9 / 10	2 / 10
Beira Litoral	18 / 18	1 / 18	7 / 18

3.1. Zinc (Zn)

Zinc was identified in all sampled regions (100%) and in all samples (100%).

Zinc is a metallic chemical element being the 24th most abundant element in the earth's crust and an ubiquitous one in cells. Zinc belongs to the family of transition metals, which have low ionization energies or positively charged forms. Cadmium and mercury share their way of transport in mammalian cells along with zinc by active or facilitated diffusion and this mode of transport has been described as "ion mimicry" (Bonaventura, Benedetti, Albarede, & Miossec, 2014). After zinc being absorbed in animal's organism is used as a co-factor for metallo-enzymes and can be involved in wound healing through participation in basal cell mitosis and differentiation (A.K. Olaifa and S.T. Fadasin, 2016), as also antioxidant defense system and humoral and cell-mediated immune responses (Nagalakshmi, Sridhar, & Parashuramulu, 2015). Sheep and goats are animals living and feeding for the greatest part of the year outdoor and thus the concentration of heavy metals in this species can reflect the environmental load. Diet can affect nutritional condition, morphology, behaviour and the manner in which an individual interacts with its environment (Rysava, McGill, Matthiopoulos, & Hopcraft, 2016). Sheep are efficient at absorbing trace elements and as a consequence they can accumulate potentially toxic quantities in their liver. This element can be obtained from natural forages, contaminated water and soil, and in certain amounts can lead to toxic effects and poisoning. Although for zinc, toxicity is low, as farm animals exhibit considerable tolerance to high intakes of zinc (Papachristodoulou & Stamoulis, 2015).

XFS used for analysis demonstrate that can accurately identify elements within hair such as zinc that appeared in all test groups as an essential element abundant in sheep wool. Examples of Graphics demonstrating the identified elements in this study with information obtained from analysis by XFS are presented in annex 1.

3.2. Copper (Cu)

Copper has identified in all sampled regions (100%) and in 21 (36%) of the overall samples. Minho was the region with the higher frequency (9/10), which may be related with the intensive agriculture practice in this region (Wuana & Okieimen, 2011). Copper is a trace element used as a co-factor for redox enzymes that participate in iron metabolism, immune functions and antioxidant defense mechanisms (Bost, Houdart, Oberli, & Kalonji, 2016). The mobilization of copper to infectious sites can have significant biological functions in wound healing homeostasis (Mirastschijski, Martin, Jorgensen, Sampson, & Ågren, 2013). It can bind to either albumin or histidine and be transported through the bloodstream to tissues or for storage in liver. The liver represents the predominant storage organ for copper (Hoon Shim and Z. Leah Harris, 2003), where in sheep approximately 55% can get deposited (Grosskopf et al., 2017). It has an ability to produce reactive oxygen species (ROS) as a redox active metal and this generation is considered to be the main mechanism of metal toxicity (Gavric et al, 2017). Copper and other metals can exert toxic effects by producing ROS and promoting oxidative stress. Also, copper can interfere with sodium metabolism by interacting with osmoregulatory enzymes like Na/K ATPase and carbonic anhydrase that act like key enzymes (Hygum et al., 2017).

It's important to mention that zinc and copper are not degradable in soil and water and can pose environmental contamination. Accumulation of these elements in water supply chain can contribute for induction of antimicrobial resistance as they have antimicrobial properties (Dębski, 2016).

3.3. Iron (Fe)

Iron was found in Alentejo, Trás-os-Montes e Alto Douro and Beira Litoral groups in 15 (26%) samples and it is an essential trace element used for synthesis of hemoglobin and myoglobin (Ay et al., 2015). In eukaryotes and prokaryotes, the level of non-heme iron proteins is relatively uniform. Fe-S proteins (with sulfide acting as a ligand to Iron) are ubiquitous in cells and play many roles including electron transfer, catalysis and iron regulation. Iron-sulfur clusters are associated with enzymes involved in DNA processing. The bioavailability of Fe can be affected by plant ingestion – for example tannins - and elevated Fe levels can play a role in neurodegeneration (Chellan & Sadler, 2015). Also, ingestion of soil rich in this mineral can play a role in this bio-availability in mammals body (Abrahams, 2012).

Iron deficiency anemia can result from blood loss, most commonly from gastrointestinal bleeding or from menstrual periods or cold intolerance (Deloughery, 2016).

3.4. Bromine (Br)

During our study we had the chance to collect some hair from two goats (one of these animals was sick with neurologic signs that suggested encephalomyelitis) and because of the history of these animals grazing near a scrap metal we analyse those samples. Results showed presence of zinc and bromine in both animals, and iron just in the animal that was sick. These results are also included in table 1 illustrated before in Beira Litoral region.

Bromine can be found in nature bound to metals in the form of inorganic salts. It is an ubiquitous non-metal trace element present in biosphere where this distribution can be magnified with anthropogenic activities like mining, industrial emissions, use of fertilizers and pesticides in agriculture, pre-planting fumigation of soils and post-harvest fumigation of agricultural products, use of chemical disinfectants in potable water (Ceko et al., 2015), production of flame retardants, gasoline additives, dyes, photographic chemicals, bleaching agents, and manufacture of medicinal compounds (Lam, Vetal, Matalon, & Aggarwal, 2016).

In mammals, bromine is commonly extracellular and it was proven that it can act as an essential trace-element as a cofactor for peroxidase-mediated crosslink formation or be used by per-oxidase to catalyze formation of sulfilimine crosslinks in the collagen IV matrix. Also, it has been suggested that dietary bromine deficiency can suppress tissue growth and increase lethality in goats, whereas high-serum bromine can result in neurologic and dermatologic complications. These findings suggest that an optimal bromine concentration might exist and is regulated in vivo (Mccall, Cummings, Bhave, Vanacore, & Page-mccaw, 2014).

It was proven, using pigs as an animal model, that skin exposed to bromine vapor in small periods of time induced chemical toxicity after cutaneous burns. The chemical toxicity caused differences in gene expression patterns and affected biologic functions and responses in dermal tissues. Affected cutaneous tissues to bromine exposure presented pathologic alterations as brownish discoloration, tissue necrosis, blister formation, slow-healing ulcers, and dermoepidermal junction damage (Rogers et al., 2011). However, toxicity can also result after long exposition periods from bromine accumulation in cells. Bromine derivatives after being accumulated in cells can induce cytotoxic effects like apoptosis and oxidative stress. Oxidative stress results by production of ROS causing oxidative lesions on DNA that can lead to fragmentation and initiation of a mutagenic chain of reactions (José, Antunes, & Cardoso, 2015).

4. Conclusions

Zinc presence in hair of ruminants can be ubiquitous as observed in results of all samples within groups from different areas. Copper is the second most abundant heavy metal that we found and still was found in all regions that where samples were collected. This origin could be by high intake from diet with this storage in liver, getting distributed through blood circulation to other parts of body after long periods of accumulation.

Iron is an element very important to synthesis of heme group so this presence in hair can appear from high concentration of it in blood cells and their interaction with peripheral tissues.

With regard to our results with sheep and goat samples we suggest that more studies with small ruminants should be conducted. Goats can be a good animal model for ecotoxicology studies.

XFS is an useful tool for bio-monitorization of contaminants with hair, but still it's needed some other strategy to correlate results and obtain more information about those contaminants in other parts of body and to be certain if their concentration level can impact animal and human health. However for qualitative analyses and a first step in monitoring studies, the XFS is an ideal method because it's very practical and easy to work, also we can obtain results with a lot of different bio-indicator samples.

5. Acknowledgments

This work was supported by Escola Universitária Vasco da Gama, a Health and Science University situated in Coimbra, Portugal. We thank to Dr. Zita Ruano for the wool samples that she collected in Trás-os-Montes e Alto Douro and to Dr. Carlos Cruz and Dr. Mário Rui Amaro for helping us collecting samples in Beira Litoral. Access to TAIL-UC facility funded under QREN-Mais Centro project ICT_2009_02_012_1890 is gratefully acknowledged.

Bibliographic references

Abbasi, N. A., Jaspers, V. L. B., Chaudhry, M. J. I., Ali, S., & Malik, R. N. (2015). Influence of taxa, trophic level, and location on bioaccumulation of toxic metals in bird's feathers: A preliminary biomonitoring study using multiple bird species from Pakistan. *Chemosphere*, 120, 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.054>

Abrahams, P. W. (2012). Applied Geochemistry Involuntary soil ingestion and geophagia: A source and sink of mineral nutrients and potentially harmful elements to consumers of earth materials. *Applied Geochemistry*, 27(5), 954–968. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2011.05.003>

Akpor, O. B., & Muchie, M. (2010). Remediation of heavy metals in drinking water and wastewater treatment systems: Processes and applications. *International Journal*, 5(12), 1807–1817.

Ana Rita Barroso E Silva (2014). Avaliação Morfológica e Elemental num modelo experimental de intoxicação com metais pesados. Dissertação de Mestrado em Química Forense da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/27319/1/Tese%20Ana%20Rita%20Silva.pdf>

Ay, T., Gökçay, G., Cantez, M. S., Durmaz, Ö., İş, H., & Ömer, B. (2015). Copper, zinc and iron levels in infants and their mothers during the first year of life: a prospective study, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12887-015-0474-9>

Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., & Kalonji, E. (2016). Journal of Trace Elements in Medicine and Biology Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues, 35, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.02.006>

Buddhachat, K., Klinhom, S., Siengdee, P., & Brown, J. L. (2016). Elemental Analysis of Bone, Teeth, Horn and Antler in Different Animal Species Using Non- Invasive Handheld X-Ray Fluorescence, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155458>

Bonaventura, P., Benedetti, G., Albarede, F., & Miossec, P. (2014). *Autoimmunity Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.11.008>

Ceko, M. J., Hummitzsch, K., Hatzirodos, N., Bonner, W., James, S. A., Kirby, J. K., Harris, H. H. (2015). Distribution and speciation of bromine in mammalian tissue and fluids by X-ray fluorescence imaging and X-ray absorption spectroscopy. *Metallomics*. <https://doi.org/10.1039/C4MT00338A>

Chellan, P., & Sadler, P. J. (2015). The elements of life and medicines. *Philosophical Transitions A Research Society A*, 373: 20140182. <https://doi.org/10.1098/rsta.2014.0182>

Dębski, B. (2016). Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials, 19(4), 917–924. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0113>

Deloughery, T. G. (2016). Iron Deficiency Anemia. *Medical Clinics of NA*. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.09.004>

D'Havé, H., Scheirs, J., Mubiana, V. K., Verhagen, R., Blust, R., & De Coen, W. (2006). Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): II. Hair and spines as indicators of endogenous metal and As concentrations. *Environmental Pollution*, 142(3), 438–448. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.021>

Gamberg, M., Palmer, M., & Roach, P. (2005). Temporal and geographic trends in trace element concentrations in moose from Yukon, Canada. *Science of the Total Environment*, 351–352, 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.033>

Garcia, S., Zerbi, A., Aliaume, C., Do Chi, T., & Lasserre, G. (2003). The ecosystem approach to fisheries. *FAO Fisheries Technical Paper*, 443, 71. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2010.00358.x>

Gavrić, J., Anđelković, M., Tomović, Prokić, L. M., Despotović, S., Gavrilović, B., Radovanović, T., Borković-Mitić, S., Pavlović, S., Saičić, Z. (2017). Oxidative stress biomarkers, cholinesterase activity and biotransformation enzymes in the liver of dice snake (*Natrix tessellata* Laurenti) during pre-hibernation and post-hibernation: A possible correlation with heavy metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138, 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.12.036>

Grosskopf, H. M., Grosskopf, R. K., Biazus, A. H., Leal, M. L. R., Bottari, N. B., Alves, M. S., Schetinger, ;M. R. C., Morsch, V. M., Machado, G., Baldissera, M. D., Da Silva, A. S. (2017). Experimental Parasitology Supplementation with copper edetate in control of *Haemonchus contortus* of sheep, and it's effect on cholinesterase's and superoxide dismutase activities. *Experimental Parasitology*, 173, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.011>

Hawkins, D. P., & Ragnarsdóttir, K. V. (2009). Science of the Total Environment The Cu, Mn and Zn concentration of sheep wool: Influence of washing procedures, age and colour of matrix. *Science of the Total Environment*, The, 407(13), 4140–4148. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.02.020>

Hermoso de Mendoza García, M., Soler Rodríguez, F., García-Fernández, E., Llaneza, L., & Pérez-López, M. (2011). Diferencias del sexo y de la edad en el contenido de metales pesados (Cd, Cu, Pb y Zn) en pelos de lobo ibérico (*Canis lupus signatus*) del Norte de España. *Revista de Toxicología*, 28(2), 140–146.

Hernández-Moreno, D., De La Casa Resino, I., Fidalgo, L. E., Llaneza, L., Soler Rodríguez, F., Pérez-López, M., & López-Beceiro, A. (2013). Noninvasive heavy metal pollution assessment by means of Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) hair from Galicia (NW Spain): A comparison with invasive samples. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(12), 10421–10430. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3341-x>

Horwitz, P., & Wilcox, B. A. (2005). Parasites, ecosystems and sustainability: An ecological and complex systems perspective. *International Journal for Parasitology*, 35(7), 725–732. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.03.002>

Hygum, T. L., Fobian, D., Kamilari, M., Jørgensen, A., Schiøtt, M., Grosell, Møbjerg, N. M. (2017). Comparative Investigation of Copper Tolerance and Identification of Putative Tolerance Related Genes in Tardigrades, 8 (February). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00095>

Iqbal, Z., Ahmad, K., Ashraf, I., Gondal, S., Sher, M., Hayat, Z., Laudadio, V., Tufarelli, V. (2015). Bioconcentration of some macrominerals in soil , forage and buffalo hair continuum: A case study on pasture irrigated with sewage water. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(3), 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.11.016>

Javanbakht, V., Alavi, S.A., & Zilouei, H. (2014). Mechanisms of heavy metal removal using microorganisms as biosorbent, 1775–1787. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.718>

José, S. S., Antunes, A. M. M., & Cardoso, A. S. (2015). Monitorização da presença de hidrocarbonetos halogenados aromáticos policíclicos, resultantes dos processos de desinfecção de águas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Boletim Epidemiológico. Nº12, 2ª série, 12–15.

Lam, A., Vetal, N., Matalon, S., & Aggarwal, S. (2016). Role of heme in bromine-induced lung injury, 1–6. <https://doi.org/10.1111/nyas.13086>

Larter, N. C., Macdonald, C. R., Elkin, B. T., Wang, X., Harms, N. J., Gamberg, M., & Muir, D.C. G. (2016). Cadmium and other elements in tissues from four ungulate species from the Mackenzie Mountain region of the Northwest Territories, Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 132, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.05.018>

Lodenus, M., & Solonen, T. (2013). The use of feathers of birds of prey as indicators of metal pollution. *Ecotoxicology*, 22(9), 1319–1334. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1128-z>

Lofly, W. M., Ezz, A. M., & Hassan, A. A. M. (2013). Bioaccumulation of some heavy metals in the liver flukes *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Iranian Journal of Parasitology*, 8(4), 552–558.

Marcogliese, D. J. (2005). Parasites of the superorganism: Are they indicators of ecosystem health? *International Journal for Parasitology*, 35(7), 705–716. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.01.015>

McLean, C. M., Koller, C. E., Rodger, J. C., & MacFarlane, G. R. (2009). Mammalian hair as an accumulative bioindicator of metal bioavailability in Australian terrestrial environments. *Science of the Total Environment*, 407(11), 3588–3596. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.01.038>

Mccall, A. S., Cummings, C. F., Bhave, G., Vanacore, R., & Page-mccaw, A. (2014). Bromine Is an Essential Trace Element for Assembly of Collagen IV Scaffolds in Tissue Development and Architecture. *Cell*, 157(6), 1380–1392. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.009>

Mirastschijski, U., Martin, A., Jorgensen, L. N., Sampson, B., & Ågren, M. S. (2013). Zinc , Copper , and Selenium Tissue Levels and Their Relation to Subcutaneous Abscess , Minor Surgery , and Wound Healing in Humans, 76–83. <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9658-z>

Nagalakshmi, D., Sridhar, K., & Parashuramulu, S. (2015). Replacement of inorganic zinc with lower levels of organic zinc (zinc nicotinate) on performance, hematological and serum biochemical constituents, antioxidants status, and immune responses in rats, 8. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.1156-1162>

Olaifa, A.K., & Fadason, S.T. (2016). Studies on Zinc and Copper Ion in Relation to Wound Healing in Male and Female West African Dwarf Goats Studies on Zinc and Copper Ion in Relation to Wound Healing in Male and Female West African Dwarf Goats. *Niger. J. Physiol. Sci.* 31, 171-176.

Papachristodoulou, C., & Stamoulis, K. (2015). Liver Concentrations of Copper, Zinc, Iron and Molybdenum in Sheep and Goats from Northern Greece, Determined by Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometry. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1496-6>

Patra, R. C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., Nandi, D., Shekhar, P., Roy, S., Ali, S. L. (2007). Tail hair as an indicator of environmental exposure of cows to lead and cadmium in

different industrial areas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(1), 127–131.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.01.005>

Pereira, R., Pereira, M. L., Ribeiro, R., & Gonçalves, F. (2006). Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environmental Pollution*, 139(3), 561–575.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.04.038>

Rogers, J. V, Price, J. A., Wendling, M. Q. S., Perry, M. R., Reid, F. M., Kiser, R. C., & Graham, J. S. (2011). An Assessment of Transcriptional Changes in Porcine Skin Exposed to Bromine Vapor. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25(4), 252–262.

Rysava, K., McGill, R. A. R., Matthiopoulos, J., & Hopcraft, J. G. C. (2016). Re-constructing nutritional history of Serengeti wildebeest from stable isotopes in tail hair: seasonal starvation patterns in an obligate grazer. *Rapid communications in Mass Spectrometry*, 30(13), 1461–1468. <https://doi.org/10.1002/rcm.7572>

Silva, R., Trindade, A. (2014); Fluorescência de Raio-X. *Revista Portuguesa de Terapêutica Integrada* (2), Junho. ISSN: 2183-4970

Smith, K. M., Dagleish, M. P., & Abrahams, P. W. (2010). The intake of lead and associated metals by sheep grazing mining-contaminated flood plain pastures in mid-Wales, UK : II. Metal concentrations in blood and wool. *Science of the Total Environment*, 408(5), 1035–1042.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.023>

Sobańska, M. A. (2005). Wild boar hair (*Sus scrofa*) as a non-invasive indicator of mercury pollution. *Science of the Total Environment*, 339(1–3), 81–88.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.07.018>

Stoev, S. D., Grozeva, N., Simeonov, R., Borisov, I., Hubenov, H., Nikolov, Y., Tsaneva, M., Lazarova, S. (2003). Experimental cadmium poisoning in sheep. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 55(4), 309–14. <https://doi.org/10.1078/0940-2993-00333>

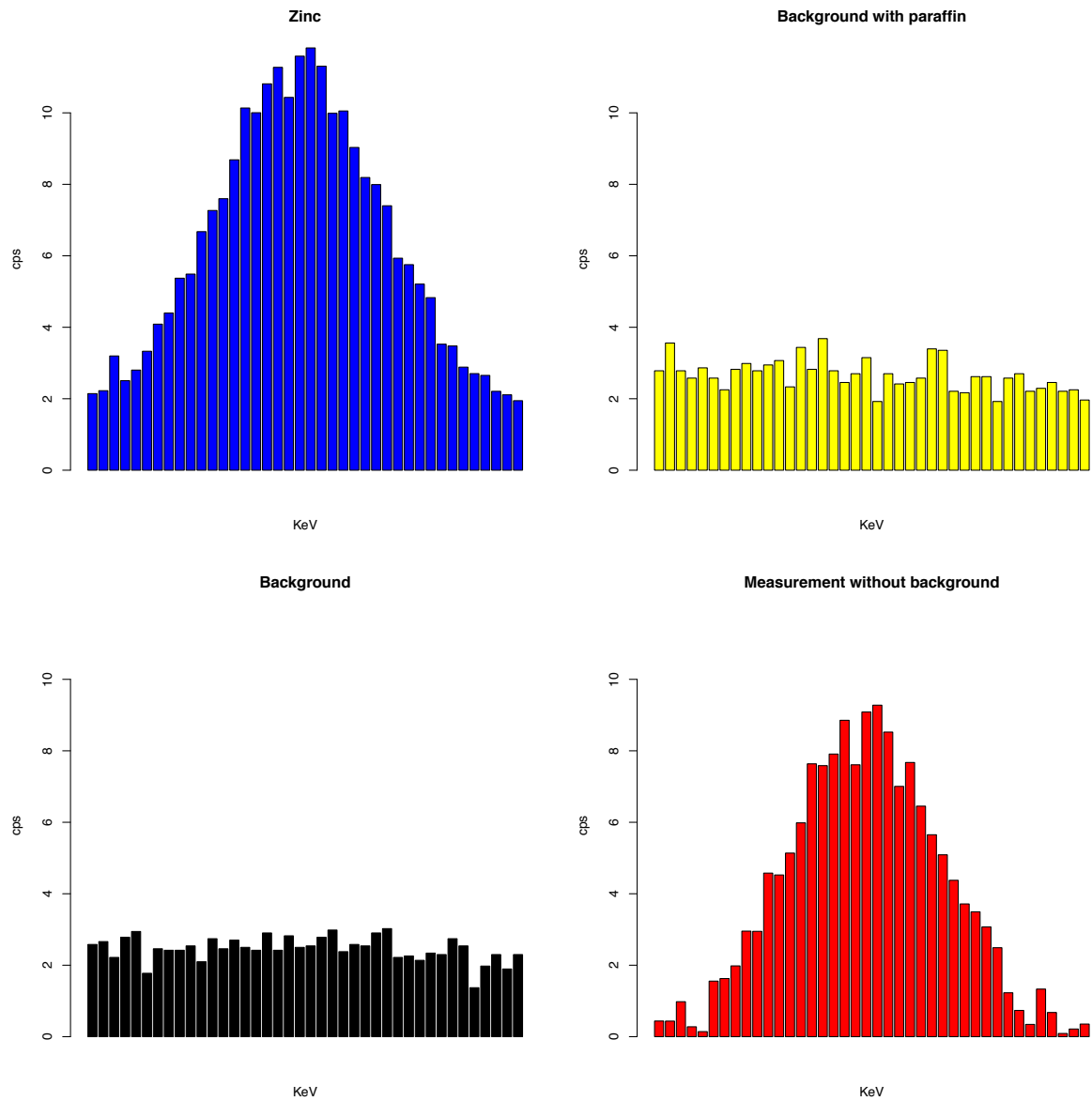
Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 111, 1–30.
<https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4>

Vidal-Martínez, V. M., Pech, D., Sures, B., Purucker, S. T., & Poulin, R. (2010). Can parasites really reveal environmental impact?. *Trends in Parasitology*, 26(1), 44–51.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.11.001>

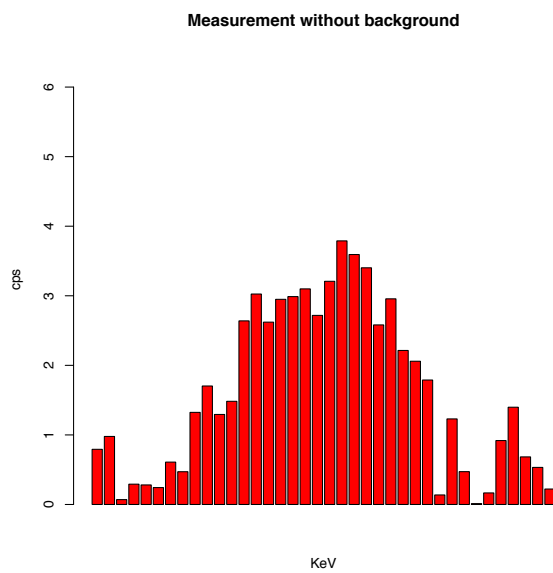
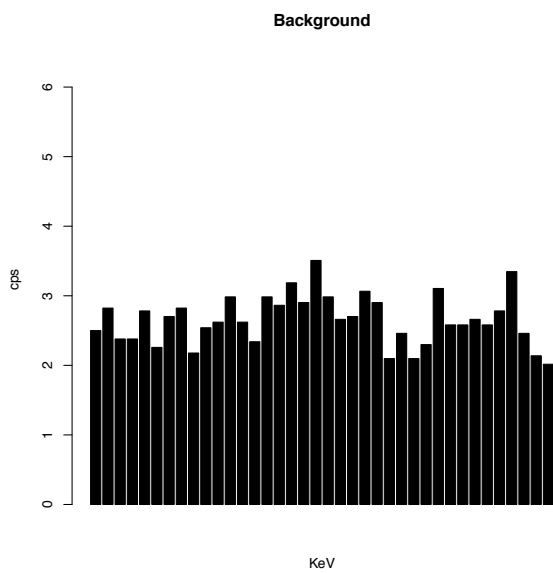
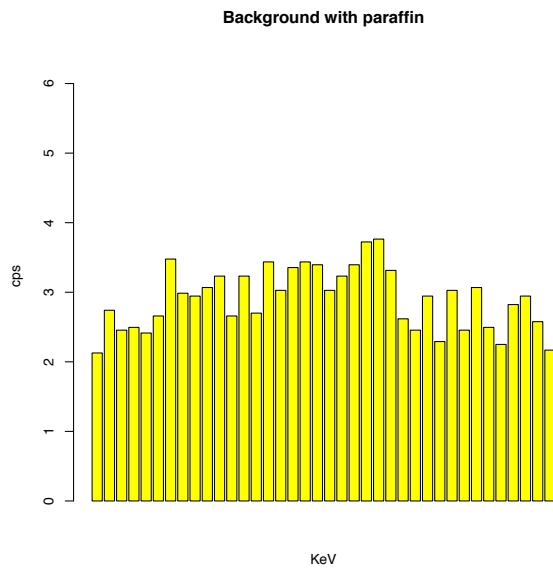
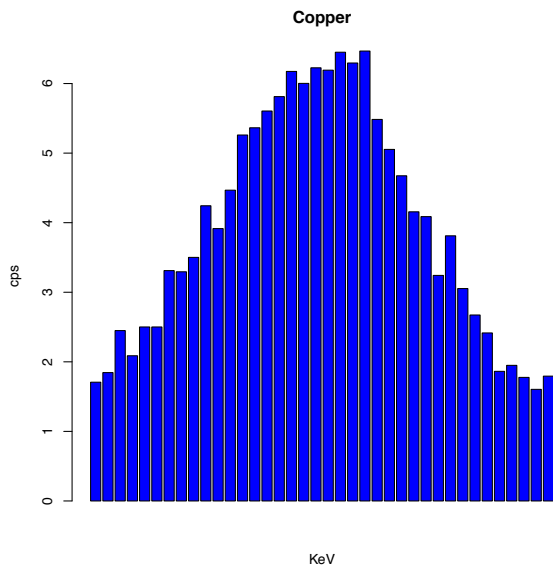
Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils : A Review of Sources , Chemistry , Risks and Best Available Strategies for Remediation, 2011. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>

Anexos

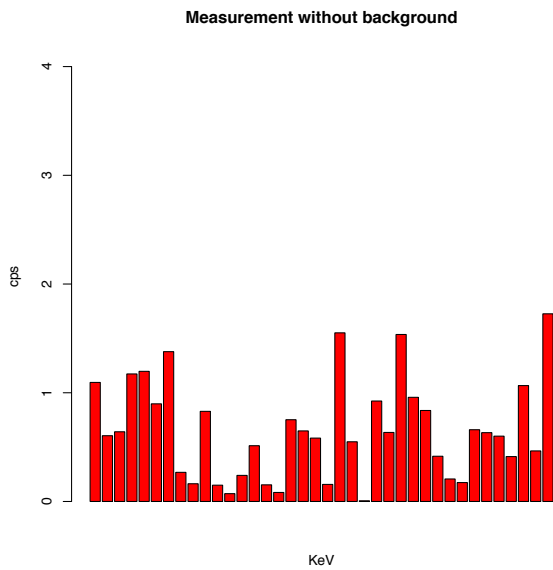
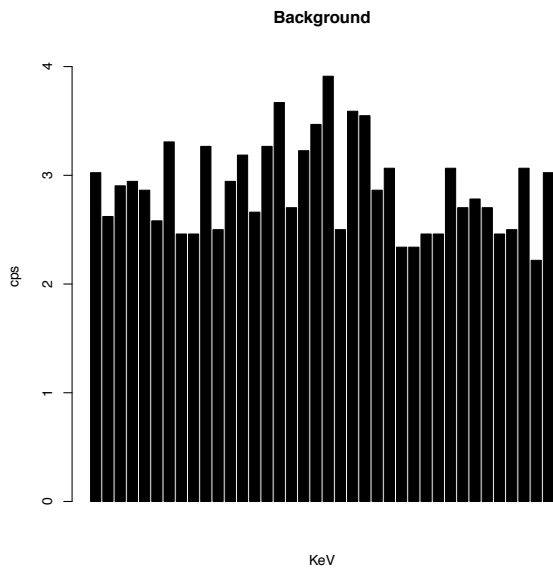
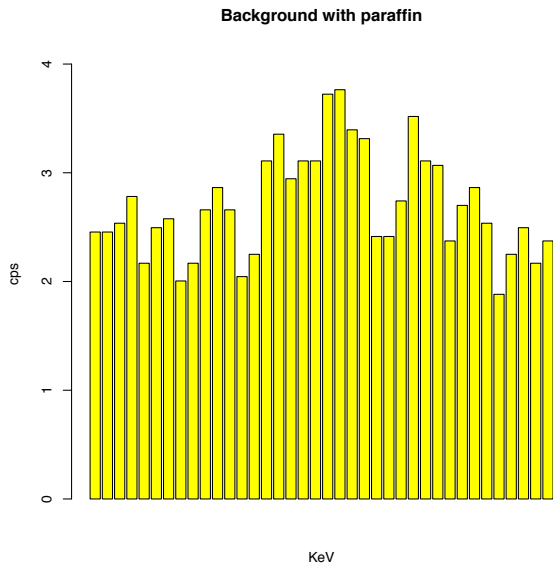
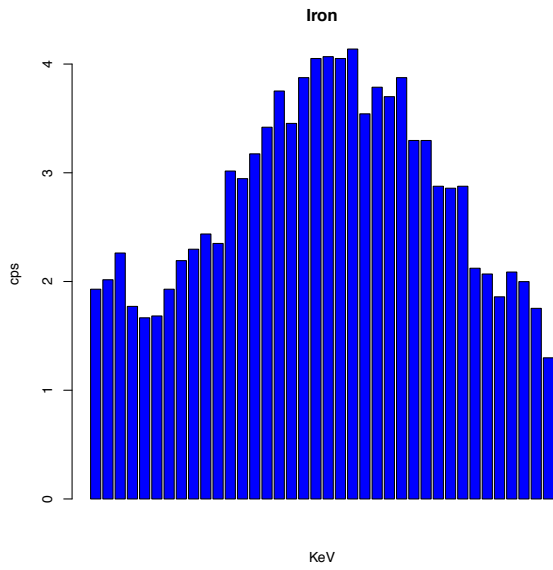
Annex 1 – Examples of elements identification by XFS assessments



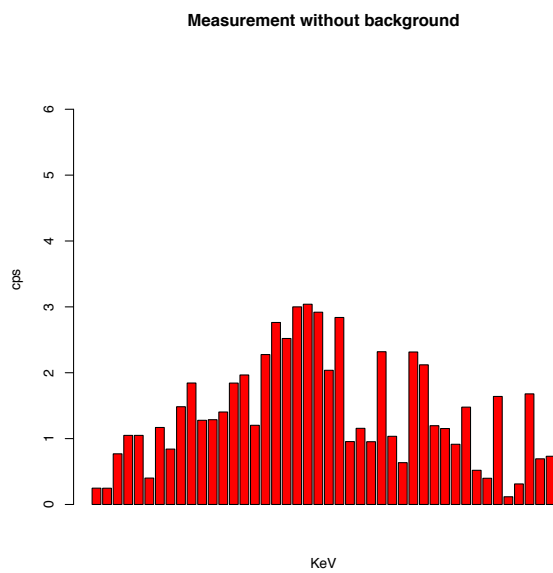
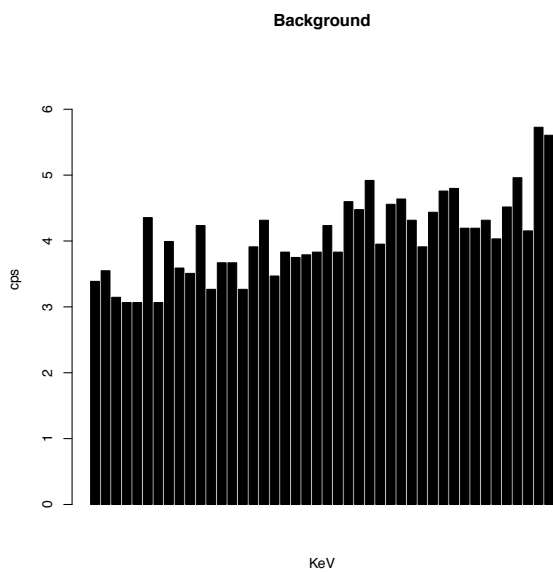
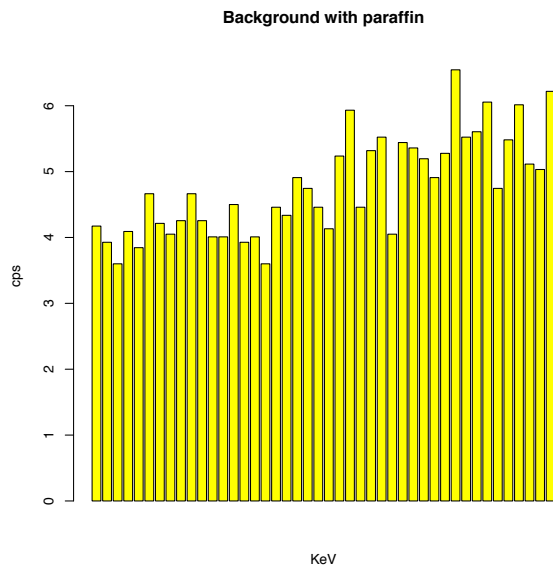
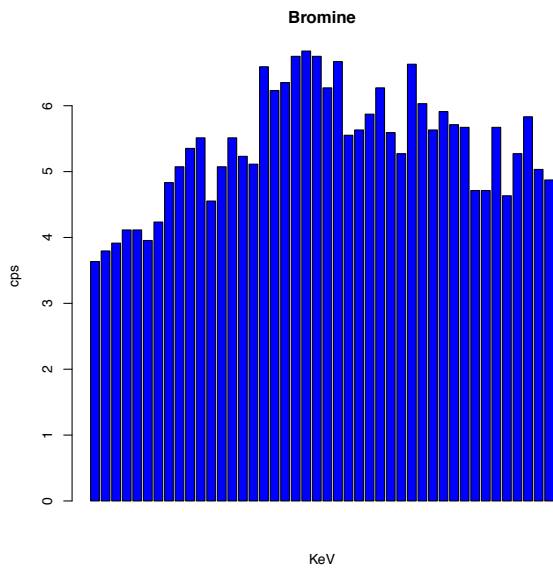
Graphic 1 – Example of zinc identification by XFS assessment



Graphic 2 – Example of copper identification by XFS assessment



Graphic 3 – Example of iron identification by XFS assessment



Graphic 4 – Example of bromine identification by XFS assessment

Anexo 2 - Relatório de actividades do Estágio curricular

O estágio curricular decorrido entre 1 de Setembro e 31 de Dezembro de 2016 foi realizado na área de Higiene Animal, tendo possibilitado o contacto com áreas como a Parasitologia, Toxicologia, Epidemiologia e Saúde Pública. Durante o período de estágio foram realizadas diversas actividades de índole técnico-científico, relacionadas com bio-indicadores para a monitorização de ecossistemas (anexo 1). Destas actividades resultaram algumas publicações, nomeadamente:

- Costa, M., Jarmela, P., Sançana, A.P., Halak, A., Rocha, H., Mateus, T. L. (2016). Importância da polinização na agricultura. *Agrotec – revista técnico-científica*. 20: 39-41 (Anexo 2).
- Costa, M., Ruano, Z.M., Cabeças, J.R., Mateus, T.L. (2016). Parasitas gastrointestinais em ovinos produzidos em modo de produção biológico numa herdade do Alentejo. *OVICAPRI - II Simpósio de Ovinos e Caprinos*, 18 de Novembro, Vila Real, Portugal (comunicação em póster) (anexo 3).
- Costa, M., Cabeças, J. R., Mateus, T. L. (2016). Biodiversidade (também) parasitária em suínos de produção biológica no Minho e no Alentejo. *Encontro de Formação da Ordem dos Médicos Veterinários*, 26 e 27 de Novembro, Lisboa, Portugal (comunicação em póster) (anexo 4).
- Costa, M., Mateus, T.L., Santos, A.S., Halak, A. (2016). Peso da Rainha à emergência como fator de seleção de *Apis mellifera*. *Agrotec – revista técnico-científica*. 21: 72-75 (anexo 5).

Anexo 2 – pp 2 de 2

O contacto prático com diferentes componentes que integram a área de Produção Animal Biológica realizou-se na Herdade do Freixo do Meio, situada em Foros de Vale Figueira na região do Alentejo, tendo sido recolhidos bio-indicadores para actividades no âmbito de investigação e desenvolvimento, e realizadas nos laboratórios da Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG) e TAIL-UC - Trace Analysis and Imaging Laboratory do Departamento de Biofísica da Universidade de Coimbra, situados em Coimbra.

No laboratório de Parasitologia da EUVG realizaram-se análises coprológicas de amostras recolhidas na Herdade do Freixo do Meio para elaboração de relatórios parasitológicos (anexo 6) para identificação de formas parasitárias e avaliação da carga parasitária de parasitas gastro-intestinais em ovinos e bovinos, assim como avaliação de contaminação ambiental em parques de suínos e bandos de aves como perús, galinhas poedeiras, frangos de carne e gansos. As análises coprológicas foram efectuadas pelos métodos McMaster para quantificação da carga parasitária ou contaminação ambiental consoante o tipo de colheita de fezes obtida (se amostra de colheita directa – ovinos e bovinos – ou se recolhida do ambiente – suínos e aves), Willis (técnica de flutuação para formas mais leves) e Sedimentação Natural (formas mais pesadas).

Nos laboratórios da Escola Universitária Vasco da Gama realizaram-se procedimentos, previamente estudados, para preparação de amostras de pêlo. A preparação das amostras de pêlo foi desenvolvida para possibilitar uma análise no departamento de Biofísica da Universidade de Coimbra. O tipo de análise realizada com pêlo foi Espectroscopia de Fluorescência de Raio-X para identificação e quantificação relativa de elementos, nomeadamente metais pesados essenciais e não-essenciais possibilitando um estudo de quais destes contaminantes poderiam estar presentes em populações de pequenos ruminantes criados em modelo de produção animal em regime extensivo em diferentes regiões país – Trás-os-Montes e Alto Douro, Minho, Beira Litoral e Alentejo. O estudo teve como objectivo avaliar quais as interacções dos animais com o ecossistema em que estão integrados utilizando o pêlo como bio-indicador de metais pesados e outro tipo de elementos, tentando estudar a relação entre os elementos presentes e o impacto na saúde animal e humana.

Anexo 3 - A Importância da Polinização na Agricultura

A importância da polinização na agricultura

Miguel Costa^{1*}, Pedro Jarmela¹, Ana Paula Sançana², André Halak², Humberto Rocha¹, Teresa Letra Mateus^{1,3,4}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal

² Lousãmel, Cooperativa Agrícola dos Apicultores da Lousã e Concelhos Limítrofes, Lousã, Portugal

³ Escola Agrária de Ponte de Lima, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

⁴ EpiUnit, Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, Porto, Portugal

* mendescosta@icloud.com

Resumo

A polinização por vectores é um serviço valioso para o ecossistema permitindo o transporte de pólen de flor para flor através de agentes polinizadores bióticos. Aproximadamente 90% das espécies de flores em todo o mundo estão dependentes desta polinização para a reprodução e manutenção da variabilidade genética. Os insectos polinizadores podem ser vistos como os principais responsáveis pela obtenção de vários tipos de culturas agrícolas, contribuindo para o aumento da diversidade genética da flora e aumento da produção. A gestão agro-ambiental dos territórios explorados na produção agrícola pode beneficiar com implementação de sistemas de polinização e elaboração de estratégias tendo em vista as interações entre seres vivos e os campos cultivados. O objectivo deste artigo é rever alguns exemplos relativos à introdução de algumas espécies de aves e sobretudo de colmeias com abelhas *Apis mellifera* capazes de promover uma eficaz polinização de campos agrícolas, nomeadamente pomares, de uma forma sustentável e ecológica.

Palavra-chave: *Apis mellifera*, alelopatia, insecto, polinização, sustentabilidade

A alelopatia na agricultura

Hoje em dia admite-se que o crescimento de culturas agrícolas em rotação ajuda a manter a fertilidade do solo, assim como as suas propriedades físicas, e permite também prevenir o desenvolvimento de doenças e pestes. No entanto, na agricultura convencional geralmente recorre-se a modelos de rotação curtos ou monoculturas com utilização de fertilizantes e pesticidas artificiais que permitem manter as funções normais do solo sem recorrer a um modelo de longa rotação (Bennett et al., 2012). Recentemente, tem sido alvo de atenção o crescente declínio na produção agrícola por perda da capacidade de produção dos solos quer por factores bióticos quer abióticos quando o mesmo tipo de colheitas são repetidas em terrenos com o modelo de rotação curta ou em monoculturas. Este tipo de modelos são usados em diversos locais do mundo, tendo resultado num

Anexo 3 - pp 2 de 6

crescimento e desenvolvimento pobre das plantações, retardando a altura das colheitas e diminuindo o rendimento produtivo (Bennett et al., 2012). Uma das respostas para a necessidade actual de utilização e intensificação dos solos para produção de alimentos é a alelopatia - utilizada na agricultura em tempos ancestrais. A alelopatia é um fenómeno biológico caracterizado pela produção por parte de um organismo de biocompostos que podem influenciar o crescimento, a sobrevivência, o desenvolvimento e reprodução de outros organismos. Estes compostos biológicos são conhecidos como aleloquímicos e podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais sobre os organismos alvo. A alelopatia é um dos modos de interacção entre plantas receptoras e dadoras e pode exercer efeitos positivos sobre a manutenção agrícola como, por exemplo, no controle de ervas daninhas, protecção das plantações ou re-estabelecimento das produções, ou mesmo efeitos negativos como autotoxicidade, fragilidade do solo e invasão biológica. De forma a desenvolver e manter uma agricultura sustentável é essencial explorar os diversos sistemas de cultivo que podem tirar partido das influências estimulantes e inibitórias da alelopatia das plantas por forma a regular o crescimento e desenvolvimento e a evitar a autotoxicidade (Cheng et al., 2015) - tipo intra-específico de alelopatia que pode resultar na inibição do crescimento de espécimes de plantas da mesma espécie por libertação de toxinas para o ambiente envolvente ou mesmo ser responsável pela degradação dos solos (Singh et al., 2010).

A polinização e os animais polinizadores

A polinização por vectores é um serviço valioso para o ecossistema permitindo o transporte de pólen de flor para flor através de agentes polinizadores bióticos como aves, abelhas, borboletas, vespas, e outros seres vivos que visitam flores como fonte de alimento ou que contactam com a mesma por proximidade com o habitat natural. Esta polinização também pode ser feita por agentes abióticos como o vento ou a chuva (Russo et al., 2015; Dicks et al., 2015; Graystock et al., 2016). Aproximadamente 90 % das espécies de flores em todo o mundo estão dependentes da polinização biótica para reprodução e manutenção da variabilidade genética (Menz et al., 2012). Os insectos polinizadores podem ser vistos como os principais responsáveis pela obtenção de vários tipos de cultura agrícolas, contribuindo para o aumento da diversidade genética da flora, desenvolvimento de sementes, aumento da produção e melhoramento das propriedades físicas dos alimentos (Russo et al., 2015; Dicks et al., 2015; Graystock et al., 2016).

Vantagens da implementação de sistemas de polinização

A gestão agro-ambiental dos territórios explorados na produção agrícola pode beneficiar com implementação de sistemas de polinização e elaboração de estratégias tendo em vista as interações entre seres vivos e os campos cultivados para aumentar a produção de alimentos para consumo humano (Graystock et al., 2016). A título de exemplo, desde 2013 em Inglaterra, têm sido elaboradas estratégias agro-ambientais com polinizadores selvagens com o objectivo de trazer melhor estabilidade ecológica e beneficiar a produção agrícola (Dicks et al., 2015).

A restauração das plantações deve ter em conta flora específica que atraia os polinizadores que se pretende introduzir no ecossistema e que proporcione condições favoráveis para a sua manutenção e sobrevivência. A falha na compreensão, manutenção e introdução dos correctos polinizadores pode levar ao declínio ou colapso da restauração ecológica, sendo fundamental a existência de polinização mediada por animais ou insectos para garantir maior resiliência na restauração das plantações (Menz et al., 2012).

A introdução e manutenção de determinadas espécies de aves pode ser um método eficaz de polinização de campos agrícolas como, por exemplo, pomares. *Bombus* spp. são polinizadores ecologicamente e economicamente importantes, sendo actualmente criadas colónias para importações e exportações em escala global. *Bombus* são considerados polinizadores mais eficientes para determinado tipo de espécies de plantas, sendo algumas espécies de *Bombus* criadas especificamente para a polinização de determinadas variedades de cultivos de frutos e vegetais (Graystock et al., 2016).

A introdução de colmeias com abelhas *Apis mellifera* é o método mais fácil de criar um sistema sustentável de polinização dado que as abelhas são polinizadores de localização central, isto porque as abelhas operárias deslocam-se do ninho para se alimentarem e recolherem néctar e pólen (rico em açúcares e proteínas, respectivamente) de acordo com as necessidades da colónia numa distância limitada ao redor do local em que a colmeia se encontra localizada (Dicks et al., 2015).

As abelhas enquanto agentes polinizadores

O declínio das populações de abelhas nos últimos anos tem sido alvo de discussão, tendo sido abordados diversos factores de stress que podem ter contribuído para a perda das populações autóctones de cada país ou introduzidas na comunidade Europeia. Até ao momento ainda existe pouca informação sobre o que poderá estar a contribuir mais para o declínio tão acentuado das populações de abelhas, todavia pensa-se que o fenómeno surge não de um único factor de stress mas de vários factores de stress combinados que resultam numa perda de diversidade e vitalidade genética. Dentro destes factores de stress combinados estão as doenças e os agentes patogénicos que têm vindo a aumentar por força das alterações climáticas e trocas inter-comunitários, tendo-se adaptado ao clima, hoje em dia, modificado (Requier et al., 2015), assim como ao uso de pesticidas

Anexo 3 – pp 4 de 6

como, por exemplo, os neonicotinóides (clotianidina, tiametoxam e imidaclopride) usados na produção intensiva (Lynn Dicks, 2013), e mesmo à redução de habitats semi-naturais que resultam na pobreza de diferentes recursos florais disponíveis para as necessidades das colónias de abelhas por desflorestação, incêndios entre outros (Requier et al., 2015).

A polinização é um serviço que pode ser integrado na prática agrícola e trazer enormes benefícios para a produção, no entanto para que seja introduzido necessita de um estudo prévio da flora autóctone predominante no local e do tipo de plantações exploradas pelo produtor (Barfield et al., 2015). Na implementação de um apiário é essencial ter em consideração um número de colmeias previamente calculado para os serviços de polinização e a diversidade e quantidade de recursos alimentares para as colónias de abelhas (Dicks et al., 2015).

O néctar é a fonte de energia principal para as abelhas adultas e é armazenado sob a forma de mel nas colmeias. O pólen é consumido pelas abelhas adultas e larvas - sendo essencial existir maior recolha de pólen pelas abelhas operárias nas alturas de maior criação. Os capta-pólen retêm cerca de 5 a 10 % de todo o pólen recolhido para a colmeia e podem ser um excelente indicador de que flores com pólen estão as abelhas a visitar, assim como qual a contribuição no serviço de polinização, divergindo este com as estações do ano, a altura de floração, e o nível de criação nas colmeias (Requier et al., 2015). O pólen (fonte de lípidos, vitaminas, minerais e principalmente de proteína) é apenas armazenado na colmeia pela abelhas operárias nas quantidades necessárias para manter as larvas e a produção, dado ser um alimento indispensável para a criação de novas células da colmeia, no entanto dispensável para as células adultas (Requier et al., 2015).

As interacções entre diferentes espécies de abelhas pode beneficiar a polinização em determinadas áreas de floração por meio de efeitos sinérgicos e complementares ou pode resultar em detrimento para as plantas de interesse através de efeitos de competição que reduzem as visitas pelos polinizadores mais eficazes. Existem interacções específicas que podem influenciar o rendimento das abelhas em flores e que podem actuar como condutores na regulação do encontro e reunião dos visitantes nas flores. Por exemplo, se uma abelha do género *Bombus* (polinizador com maior dimensão corporal e capacidade superior de extracção de néctar e transporte de pólen) visitar determinada flor poderá aumentar o intervalo entre visitas a essa flor em comparação a uma visita por parte de uma abelha *Apis mellifera*, porque esgota as reservas nutricionais que a flor pode oferecer. Numa área que haja *Bombus* spp. e *Apis mellifera*, e ambos com populações elevadas poderá resultar um fenómeno de migração ou um de adaptação. As plantas poderão ter preferência pelo polinizador de maior dimensão se este realizar o transporte de maior quantidade de pólen, além disso quando a flor recebe uma visita por parte de um vector polinizante são libertados componentes químicos na flor com o objectivo de marcação territorial e que podem ser interpretados negativamente pelo visitante seguinte. Caso surja uma diminuição da competição por *Apis mellifera* por dado tipo de flores pode ocorrer uma adaptação com utilização de outros recursos florais menos apreciados. Neste caso, conseguimos ter dois insectos polinizadores - *Bombus* e *Apis mellifera* - e aumentar a diversidade de polinização da área onde co-habitam. Por outro lado, poderá resultar uma

Anexo 3 – pp 5 de 6

perda da população local de *Apis mellifera* por enxameação em busca de um local mais propício para habitar (Xie et al., 2016).

Considerações finais

Na elaboração de sistemas de interação entre polinização e agricultura ecológica torna-se importante a recolha de informações de quais são os polinizadores selvagens que existem no local onde se pretende iniciar uma actividade agrícola, tal como a sua variação espacial ao longo dos terrenos agrícolas, e como desempenham o seu papel antes que se opte por implementar um sistema de polinização doméstico. Os benefícios económicos poderão ser mais facilmente atingidos quando colocadas colmeias em locais onde existe uma população ligeira a moderada de outros insectos polinizadores, de forma a obter maior eficiência e evitar competição por recursos.

Referências bibliográficas

Barfield, A., Bergstrom, J., Ferreira, S., Covich, A., Delaplane, K. 2015. An Economic Valuation of Biotic Pollination Services in Georgia. *J. Econ. Entomol.* **108** (2): 388–398.

Bennett, A., Bending, G., Chandler, D., Hilton, S., Mills, P. 2012. Meeting the demand for crop production: the challenge of yield decline in crops grown in short rotations. *Biol. Rev.* **87**: 52–71.

Cheng F. and Cheng Z. 2015. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Front. Plant Sci.* **6**: 1020.

Dicks, L. 2013. Bees, lies and evidence-based policy. *Nature* **494**: 283.

Dicks, L., Baude, M., Roberts, S., Phillips, J., Green, M., Carvell, C. 2015. How much flower-rich habitat is enough for wild pollinators? Answering a key policy question with incomplete knowledge. *Ecological Entomology* **40** (Suppl. 1): 22–35.

Graystock, P., Jone, J.C., Pamminger, T., Parkinson, J.F., Norman, V., Blane, E.J., Rothstein, L., Wäckers, F., Goulson, D., Hughes, W.O.H. 2016. Hygienic food to reduce pathogen risk to bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology* **136**: 68–73.

Menz, M., Philips, R., Winfree, R., Kremen, C., Aizen, M., Johnson, S., Dixon, K. 2011. Reconnecting plants and pollinators: challenges in the restoration of pollination mutualisms. *Trends in Plant Science.* **16** (1): 4-12.

Anexo 3 – pp 6 de 6

Requier, F., Odoux, JF., Tamic, T., Moreau, N., Henry, M., Decourtye, A., Bretagnolle, V. 2015. Honey bee diet in intensive farmland habitats reveals an unexpectedly high flower richness and a major role of weeds. *Ecological Applications*, **25**(4): 881–890.

Russo, L., Park, M., Gibbs, J., Danforth, B. 2015. The challenge of accurately documenting bee species richness in agroecosystems: bee diversity in eastern apple orchards. *Ecology and Evolution* **5**(17): 3531–3540.

Singh, H. P., Batish, D., Kohli, R. K. 1999. Autotoxicity: Concept, Organisms, and Ecological Significance; *Critical Reviews in Plant Sciences*; **18** (6): 757-772.

Xie Z, Pan D, Teichroew J, An J. 2016. The Potential Influence of Bumble Bee Visitation on Foraging Behaviors and Assemblages of Honey Bees on Squash Flowers in Highland Agricultural Ecosystems. *PLoS ONE*. **11**(1): e0144590.

Anexo 4 - Parasitas gastrointestinais em ovinos produzidos em modo de produção biológico numa herdade do Alentejo

Parasitas gastrointestinais em ovinos produzidos em modo de produção biológico numa herdade do Alentejo

Miguel Costa^{1*}, Zita Martins Ruano¹, José Ricardo Cabeças¹, Teresa Letra Mateus^{1,2,3,4}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra

² Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Refóios do Lima

³ Centro de Estudos em Ciência Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real

⁴ EPIunit, Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, Porto

*mendescosta@icloud.com

Palavras-chave: Estrongilídeos, Modo de Produção Biológico, Ovinos, Parasitas

A produção de ovinos é uma actividade pecuária que assume uma importante função no desenvolvimento social, económico e ambiental do Alentejo. Frequentemente encontram-se animais e pastores, assumindo o pastoreio um papel essencial no mosaico paisagístico desta região. A produção destes animais em modo de produção biológico (MPB) pretende salvaguardar a saúde ambiental, contudo, as restrições ao uso de desparasitantes poderá elevar o grau de parasitismo destes animais. Ora o parasitismo gastrointestinal pode constituir um forte constrangimento para a produção animal, ao causar diminuição do peso vivo e ao aumentar a susceptibilidade a outras doenças. Assim, o objectivo deste estudo foi o de efectuar um levantamento do tipo e grau de parasitismo gastrointestinal em ovinos produzidos em MPB numa herdade do Alentejo. Para o efeito foram recolhidas durante os meses de Setembro e Outubro 45 amostras de fezes directamente da âmpola rectal destes animais. As amostras foram analisadas por métodos coprológicos qualitativos (flutuação e sedimentação natural) e quantitativos (McMaster, número de ovos/oocistos por grama – OPG - de fezes). Foram identificadas 7 formas parasitárias distintas: estrongilídeos (45/45), *Eimeria* spp. (28/45), *Nematodirus* spp. (22/45), *Moniezia expansa* (14/45), *Strongyloides* spp. (10/45), *Trichuris* spp. e *Eimeria intricata* (1/45). A média de OPG de fezes na totalidade das amostras foi reduzida, apontando para valores de parasitismo leve, apenas com a excepção de 8 amostras com parasitismo moderado, o que são resultados encorajadores considerando que estes animais estão a maior parte do tempo em pastoreio, e portanto expostos a diversas formas parasitárias quer de animais domésticos, quer de silvestres. Os resultados mostram uma grande biodiversidade parasitária, mas uma carga parasitária relativamente baixa, o que sugere alguma capacidade de adaptação do parasita e uma resiliência destes ovinos, tal como é pretendido em sistemas de produção agro-pecuários sustentáveis.

Anexo 5 - Biodiversidade (também) parasitária em suínos de produção biológica no Minho e no Alentejo

BIODIVERSIDADE (TAMBÉM) PARASITÁRIA EM SUÍNOS DE PRODUÇÃO BIOLÓGICA NO MINHO E NO ALENTEJO

Costa, M.¹, Cabeças, J. R.¹, Mateus, T. L.^{1,2,3,4}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra

² Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Refóios do Lima

³ Centro de Estudos em Ciência Animal e Veterinária, Universidade de Trás-os-montes e Alto Douro, Vila Real

⁴ EPLunit, Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, Porto

As infecções por parasitas gastrointestinais são frequentes em suínos em todos os regimes de produção, assim como a sua influência negativa na saúde e no peso vivo dos animais. O modo de produção biológico (MPB) tem crescido em Portugal e as restrições ao uso de fármacos, aliado ao facto de estes animais serem produzidos em regime extensivo, incentivou este estudo, cujo objectivo geral foi fazer um levantamento da diversidade e carga parasitária em suínos criados em MPB em Portugal.

Foram recolhidas amostras de fezes em cinco explorações, que foram devidamente rotuladas e armazenadas até serem analisadas no laboratório (técnicas de análise qualitativa - flutuação e sedimentação - e quantitativa).

Das 45 amostras analisadas, em 29 (64,4%) foram identificadas formas parasitárias, variando a percentagem de amostras positivas por exploração entre 37,5% e 100%. Uma grande diversidade de formas parasitárias foram identificadas: *Balantidium coli* (22/45, 48,9%), Strongylida (21/45; 46,6%), *Ascaris suum* (21/45; 46,6%), Coccidia (8/45, 17,8%), *Trichuris suis* (4/45; 8,9%) e *Ascarops strongylina* (3/45; 6,7%). A Tabela 1 apresenta a média e o desvio padrão do número de ovos/oocistos por grama (OPG) de fezes de cada forma parasitária encontrada por exploração.

Tabela 1 – Média e desvio padrão do número de OPG de fezes por forma parasitária por exploração

	<i>Balantidium coli</i>		<i>Ascaris suum</i>		Strongylida		Coccidia		<i>Trichuris suis</i>		<i>Ascarops strongylina</i>	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Alentejo (n=13)	150	133	3900	3356	800	5795	3575	10627	300	0	1750	1202
Minho 1 (n=8)	400	468	2000	1178	350	141	2200	2546	0	0	0	0
Minho 2 (n=8)	0	0	375	304	50	0	200	0	50	0	0	0
Minho 3 (n=8)	550	614	375	304	50	0	200	0	0	0	0	0
Minho 4 (n=8)	700	212	100	484	50	0	0	0	0	0	0	0

Os resultados evidenciam uma provável elevada contaminação ambiental com formas parasitárias que além do impacto negativo que têm na saúde animal e ambiental, tem também impacto na saúde pública pelo potencial zoonótico de algumas (*Balantidium coli*, *Ascaris suum* e *Ascarops strongylina*).

Anexo 6 - Peso da Rainha à Emergência como fator de seleção de *Apis Mellifera*

PESO DA RAINHA À EMERGÊNCIA COMO FATOR DE SELEÇÃO DE APIS MELLIFERA

Miguel Costa^{1*}, Teresa Letra Mateus¹, Ana Sofia Santos^{1, 4}, André Halak^{1,2,3}

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, Coimbra, Portugal

² Escola Agrária de Ponte de Lima, Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal

³ EpiUnit, Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto, Porto, Portugal

⁴ CITAB-UTAD – Center for Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences, Vila Real, PA Box 1013, 5001-801 Vila Real, Portugal

⁵ Lousamel, Cooperativa Agrícola dos Apicultores da Lousã e Concelhos Limítrofes, Lousã, Portugal

* mendescosta@icloud.com

Um programa de melhoramento genético em *Apis mellifera* pode ser interpretado como um modelo complexo devido à diversidade da estrutura genética interna de uma colónia de abelhas. Em *Apis mellifera* a apreciação da qualidade de uma determinada estirpe é marcadamente mais difícil do que para outras espécies domésticas exploradas na produção animal, isto porque a peculiaridade de uma colónia de abelhas é expressa por uma combinação de diferentes

atividades da abelha rainha e das abelhas operárias (Bienefeld et al., 2006). A capacidade reprodutiva da abelha rainha é a principal característica que a diferencia das abelhas operárias, e que pode determinar a sua permanência na colónia. Existem inúmeras causas de mortalidade de abelhas rainhas, como por exemplo, agentes patogénicos - fungos, ácaros, bactérias -, no entanto, à medida que as rainhas vão envelhecendo podem começar a manifestar sinais que as abelhas operárias identificam e que podem resultar na sua substituição por uma reprodutora jovem. Os sinais podem ser a quebra no potencial de postura de ovos, a diminuição da ovopostura propriamente dita e o número de espermatozoides armazenados na espermateca. Estes sinais não estão diretamente relacionados com a longevidade da abelha rainha que poderá ir até aos 7 a 8 anos de idade, todavia estão relacionados com a sobrevivência da colónia resultando assim um ciclo de vida da abelha rainha muitas vezes mais reduzido, entre 1 a 3 anos (Page et al., 2001).

Anatomicamente, a abelha rainha possui um corpo de maior dimensão, nomeadamente a região do abdómen, em comparação ao das operárias, e por conseguinte um peso vivo superior (Figura 1). Esta diferença resulta da adaptação para a produção e deposição de ovos e desenvolvimento da espermateca, ovários e ovariolos no caso da abelha rainha (Page et al., 2001; Leimar et al., 2012).

Segundo Woyke (1971) citado por Kahya et al. (2008) o peso vivo da abelha rainha à emergência pode ser correlacionado com o número de ovariolos e com o tamanho da espermateca. De acordo com um estudo realizado por estes últimos autores analisando 3 grupos experimentais de abelhas rainhas com pesos diferentes, verificou-se que o peso vivo à emergência estava correlacionado com o

Anexo 6 – pp 2 de 5

tamanho da espermateca, e que existem reprodutoras que fazem segundos voos de acasalamento para preencher todo o espaço livre da espermateca.

Akyol et al. (2008) afirma que a *performance* e a produtividade das colônias de abelhas pode ser aumentada por abelhas rainhas com maior peso vivo à emergência pelo facto de estas conseguirem armazenar mais espermatozóides e desta forma adquirirem maior potencial de postura para ovos fertilizados e, consecutivamente, sobreviverem durante mais tempo na colónia. No entanto, o peso vivo e a qualidade das abelhas rainhas à emergência depende do genótipo e dos fatores ambientais envolventes, e o seu potencial reprodutivo é também influenciado pela diversidade genética resultante dos zangões que a fecundam.

Assim, autores como Jackson et al. (2011) afirmam que o tamanho dos ovários e o número de ovariolos não estão correlacionados com o peso vivo das abelhas rainhas e que esse aumento pode ocorrer numa fase mais tardia ao longo da vida da reprodutora, todavia através de resultados obtidos de dois casos isolados do seu trabalho experimental, este grupo de investigadores sugere que abelhas rainhas com mais ovariolos podem conduzir mais recursos energéticos para a sua descendência ao contrário de abelhas rainhas com menos ovariolos por ovário. Delaney et al. (2010) constataram que o peso vivo de abelhas rainhas preparadas já para a ovopostura estava positivamente correlacionado com níveis aumentados de vitelogenina, e com fundamento em Kocher et al. (2008) afirmam que esta tem um papel no desenvolvimento de óocitos e supõe-se que o seu aumento seja estimulado pelo acasalamento. Além disso, Seehus et al. (2006) afirmam que a vitelogenina, glicolipoproteína sintetizada nos ácidos gordos, possui também uma função antioxidante que se presume ter um papel no aumento da longevidade das abelhas.

As características reprodutivas e os parâmetros qualitativos são o ponto de partida a analisar num programa de melhoramento genético. Os dados obtidos quer de abelhas rainhas quer das suas descendentes devem ser recolhidos para que seja exequível uma seleção (Halak, 2012).

A título de exemplo, um parâmetro qualitativo poderá ser a higiene comportamental das abelhas operárias que é um fator importante para avaliar a tolerância das colônias a agentes patogénicos. A remoção da criação infetada ou doente de alvéolos dos favos da colmeia e a reposição com novas crias é um dos métodos utilizados pelas abelhas operárias na higienização da colmeia (Pires, 2005). A análise de informações relativas às abelhas rainha mediante conhecimentos metodológicos de avaliações genéticas e de avanços na área da tecnologia possibilitam estabelecer o progresso genético e avaliar a produção, contudo ao se selecionar certas características de interesse como o comprimento e largura abdominal e o peso vivo à emergência em rainhas (Figuras 2 e 3), não é possível desconsiderar as outras características indispensáveis para o correto funcionamento da eussocialidade das colônias (Halak, 2012).

Referências Bibliográficas

Akyol, E., Yeninar, H., Ka anoglu, O. (2008). Live Weight of Queen Honey Bees (*Apis mellifera L.*) Predicts Re- productive Characteristics; Journal of Kansas Entomo- logical Society 81(2): 92-100

Bienefeld, K., Ehrhardt, K., Reinhardt, F. (2007). Genetic evaluation in the honey bee considering queen and worker effects - A BLUP - Animal Model Approach; Apidologie 38: 77-85

Delaney, D.A., Keller, J.J., Caren, J.R., Tarpy, D.R. (2011). Genetic and physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera L.*); Apidologie. 42: 1-13

Halak, A. L. (2012). "Parâmetros e Correlações Genéticas e Fenotípicas para Peso e Medidas Morfométricas em Rainhas *Apis mellifera* Africanizadas. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Tese de Doutorado.

Kahya, Y.; Gençer, H. V.; Woyke, J. (2008). Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasiana*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. Journal of Apicultural Research and Bee World 47(2): 118-125

Kocher S.D., Richard F.J., Tarpy D.R., Grozinger C.M. (2008). Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*); BMC Genomics 9: 32

Jackson J.T., Tarpy D.R., Fahrbach S.E. (2011). Histological estimates of ovariole number in honey bee queens, *Apis mellifera*, reveal lack of correlation with other queen quality measures. Journal of Insect Science 11:82 available online: insectscience.org/11.82

Leimar, O., Hartfelder, K., D. Laubichler, M.; Page JR, R.; Development and evolution of caste dimorphism in honeybees - a modeling approach; Ecology and Evolution 2(12): 3098-3109

Page Jr. R.; Peng, C. Y.-S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera L.*; Experimental Gerontology 36: 695-711

Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G.V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 962–967

Pires, S.M.A. (2005). Contribuição para o estudo do comportamento higiênico associado ao ácaro *Varroa destructor* em colônias de abelhas melíferas portuguesas. Tese de Doutorado em Ciência Animal. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real



Figura 1 - Abelha rainha marcada

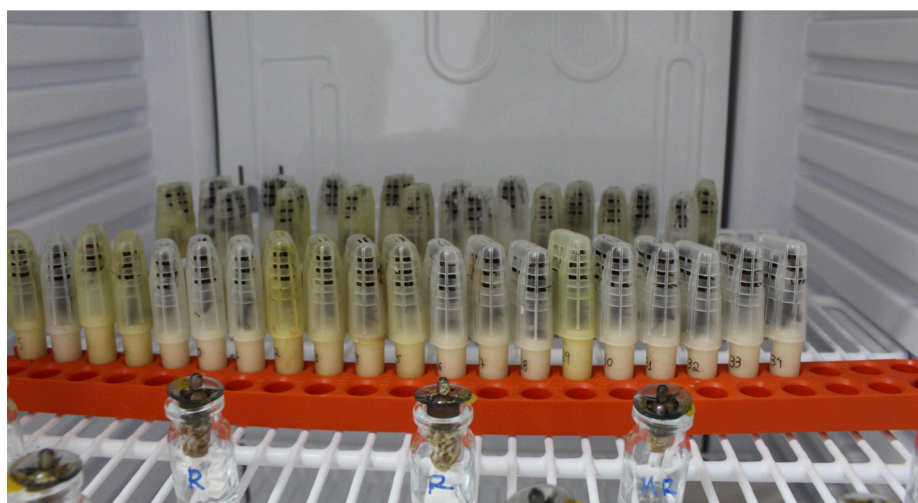


Figura 2 – Abelhas rainhas em frascos para incubação (à frente) e abelhas rainhas em gaiolas de transporte com abelhas operárias e “candy” (alimento) (atrás na foto)



Figura 3 – Preparação de frascos para etapa de criação de rainhas na incubadora



Figura 4 – Abelha rainha marcada