

Relatório Final De Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Luta contra a *Varroa destructor*. Desenho
experimental de um estudo de eficácia de campo de
fármacos anti-varroa.**

Ana Catarina Oliveira da Silva

Orientador: Professor Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino
Co - Orientador: Doutor Mário Alberto Nunes Armada

Porto, 2021

Relatório Final De Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Luta contra a *Varroa destructor*. Desenho
experimental de um estudo de eficácia de campo de
fármacos anti-varroa.**

Ana Catarina Oliveira da Silva

Orientador: Professor Doutor Augusto Manuel Rodrigues Faustino

Co - orientador: Doutor Mário Alberto Nunes Armada

Porto, 2021

RESUMO

As abelhas são essenciais devido aos seus serviços de polinização que asseguram o equilíbrio dos ecossistemas e a segurança alimentar. Nos últimos anos tem-se vindo a registar um declínio preocupante das populações de polinizadores. As abelhas produtoras de mel, entre as quais está a abelha-europeia *Apis mellifera*, são um dos grupos de polinizadores que está sob ameaça de fatores de stress com origem antropogénica. No século passado o ácaro parasítico *Varroa destructor* efetuou a mudança de hospedeiro de *Apis cerana*, uma espécie de abelha melífera asiática, para *A. mellifera*, quando colónias desta última foram translocadas para o continente asiático.

Este trabalho aborda os pontos a ter em conta num desenho experimental de eficácia de campo de fármacos contra a varroose. De seguida, é dado um exemplo de um estudo experimental feito durante o estágio curricular, que serviu para desenvolver algumas competências práticas e simular o ambiente de estudo em apicultura. Por fim, é realizada uma análise desse estudo de campo, e da forma como o seu desenho e realização afetaram os resultados. O trabalho foi realizado num apiário situado no concelho de Barcelos, freguesia de São João de Bastuço, com o objetivo de comparar a eficácia de três apresentações farmacológicas diferentes com substância ativa amitraz, uma formamidina, na redução dos níveis de infestação por *V. destructor* de colónias de abelhas autóctones, *Apis mellifera iberiensis*. Para além disto, pretendeu-se medir os resíduos de amitraz em cera virgem, e reservas de mel.

Durante o estágio curricular, tive a oportunidade de acompanhar o apicultor e aprender sobre apicultura (o que foi essencial para perceber todo resto do trabalho experimental; descrito no anexo A), de visitar o laboratório LabApis na UTAD, de realizar a análise das amostras, e de iniciar um trabalho de pesquisa de microplásticos nas abelhas (o qual não foi concretizado devido a limitações de tempo). Para além disto, ao longo deste ano letivo tive a oportunidade de estagiar com o Dr. Nuno Santos, e participar num estudo parasitológico, na fase de recolha de amostras de fezes de cabra-montês (*Capra pyrenaica*) no Parque Natural da Peneda Gerês, e posterior análise no Departamento de Parasitologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Participei também numa fase do projeto de censo de coelhos bravos no sul de Portugal - na recolha de amostras para perceber a prevalência e incidência de doenças que afetam a população (Doença Hemorrágica Viral e Mixomatose).

PALAVRAS-CHAVE: *Apis mellifera iberiensis*; *Varroa destructor*; Amitraz; Estudo de eficácia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao professor Paulo Costa, o qual me deu o contacto da associação com quem estagiei.

De seguida, numa ordem cronológica dos eventos, agradeço ao Alberto Dias da APIMIL, por se ter disponibilizado em organizar uma equipa com a qual pude realizar o meu estágio, pela preocupação e pelo ambiente de amizade que criou na equipa.

Ao meu orientador, o professor Augusto Faustino, tenho que agradecer todo o apoio, palavras de motivação e encorajamento para seguir a minha curiosidade académica, e também por organizar um espaço no laboratório para realizar as análises de amostras.

Ao Dr. Mário Nunes Armada, tenho que agradecer o facto de se ter metido nesta “aventura” comigo e me ter transmitido o seu conhecimento na área da apicultura.

Ao Filipe, o apicultor, é devido um GRANDE OBRIGADA, pelo tempo e disponibilidade em me iniciar na apicultura e por me ter acudido quando fui picada, sempre com enorme simpatia e paciência.

Um grande agradecimento também ao professor Paulo Russo Almeida, do LabApis da UTAD, por me ter recebido e ensinado as técnicas de análise das amostras, e também pela partilha de conhecimentos científicos. À Idalina e à Isabel agradeço por me terem recebido no laboratório com enorme simpatia, desde o momento em que entrei.

À minha família tenho que agradecer pelo apoio durante esta fase e pelas boleias em horas estranhas.

Aos meus amigos e colegas, deixo um agradecimento, por toda a amizade, por ouvirem as histórias dos meus dias de apicultora.

Ao Dr. Nuno Santos também um grande agradecimento, por nos receber, a mim e às minhas colegas, sempre com espírito pedagógico e enorme simpatia.

Sem ajuda não teria conseguido realizar este estágio, numa área em que é pouco comum vermos médicos veterinários. Desde a fase de organização do estágio, assim como durante este, vivenciei um ambiente de amizade, ajuda, hospitalidade e de ensino, de todas as partes. Sinto-me afortunada por ter sido tão bem recebida e por ter constatado este ambiente de trabalho.

ABREVIATURAS

AMP Monofosfato cíclico de adenosina

APIMIL Associação de Apícola de Entre-Minho e Lima

cm² Centímetros quadrados

dm² Decímetros quadrados

DPMF N-(2,4-dimetilfenil)-N'-metilformamida

mg Miligramas

mm Milímetros

USSR União das Repúblicas Socialistas Soviéticas

GLOSSÁRIO

Abelha-ama - abelhas com idade entre 4 e 12 dias; são responsáveis por cuidar e alimentar a criação, e cuidam também da alimentação da abelha-rainha (Johnson, 2010).

Abelha campeira - abelha com mais de 21 dias de idade que recolhem no exterior os recursos necessários para a colónia (pólen, néctar, própolis e água) (Johnson, 2010).

Abelhas de “meia idade” - abelhas entre os 12 e 21 dias que realizam várias tarefas na colónia; as mais jovens são responsáveis pela construção e manutenção do ninho, e as mais velhas têm função de receber e armazenar o mel e guardar a entrada (Johnson, 2010).

Estrado sanitário - estrado colocado no fundo da colmeia onde caem os resíduos (Dietemann et al., 2013).

Obreiras - designação dada às abelhas fêmea, que não a rainha, as quais irão desempenhar diversas funções na colónia ao longo da sua vida (limpeza, construção, proteção, recolha de alimento) (Johnson, 2010).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Os polinizadores: importância das abelhas nos ecossistemas	1
1.2 <i>Varroa destructor</i> : uma nova ameaça para <i>A. mellifera</i>	2
1.3. Biologia de <i>V. destructor</i>	3
1.4. Varroose – Efeitos na saúde da colônia	4
1.6. Tratamento da varroose: considerações gerais	6
1.6.1. Moléculas.....	6
1.6.2. Dinâmica populacional de <i>A. mellifera</i> e <i>V. destructor</i>	6
1.6.4. Resíduos nos produtos apícolas e na colmeia	8
1.6.5. Toxicidade dos fármacos para as abelhas	9
1.6.6. Resistência de <i>V. destructor</i> aos acaricidas.....	10
1.6.7. Monitorização dos níveis de <i>V. destructor</i>	10
2. DESENHO EXPERIMENTAL DE UM ESTUDO DE EFICÁCIA DE CAMPO DE FÁRMACOS ANTI-VARROA	12
2.1. As colmeias	12
2.2. As colônias.....	12
2.3. Local de estudo.....	13
2.4. O tratamento	14
3. EXEMPLO DE UM ESTUDO DE EFICÁCIA DE CAMPO DE TRÊS APRESENTAÇÕES FARMACOLÓGICAS DE AMITRAZ.....	15
3.1. Introdução - O amitraz.....	15
3.2. Métodos e procedimento	16
3.3. Resultados	18
3.4 Discussão.....	19
4. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	25
ANEXO A – Atividades realizadas em apicultura	31
ANEXO B – Técnicas de determinação da taxa de infestação em abelhas adultas e criação.....	34
ANEXO C – Medição dos parâmetros de força de uma colônia	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. O ciclo reprodutivo de <i>Varroa destructor</i> dentro da célula operculada de obreira. A fêmea de <i>V. destructor</i> entra na célula antes da operculação; aproximadamente 3 dias depois é posto o primeiro ovo – macho - seguido por 4 ovos de fêmeas. Os números da seta inferior correspondem aos dias pós-operculação. Retirado e adaptado de Rosenkranz et al. (2010).....	4
Figura 2. <i>Varroa destructor</i> , fêmea adulta: à esquerda vista dorsal à lupa, no centro vista ventral à lupa (<i>V. destructor</i> cedida pelo professor Paulo António Russo Almeida, do Laboratório LabApis, Departamento de Zootecnia, UTAD); à direita – vista a olho nu no estrado sanitário (foto cedida pelo apicultor).....	4
Figura 3. Variação sazonal da população de uma colónia de <i>Apis mellifera</i> em clima temperado: número de abelhas adultas (linha tracejado), número criação de zângão (linha contínua grossa), número de criação de obreiras (linha contínua fina). Retirada e adaptada de Martin (1998).....	7
Figura 4 Dinâmica populacional de abelhas e <i>Varroa destructor</i> ao longo do ano em clima temperado do hemisfério norte: número de criação de abelha (linha continua) e número ácaros (linha a tracejado). Retirado de: OIE (2018).	8
Figura 5 Esquema da organização do apiário (visto de cima); a azul: localização das colmeias de estudo.	17
Figura 6. Introdução de alvéolo real numa colónia órfã.....	32
Figura 7. Tiras de fármaco na colmeia (Amicel®).....	32
Figura 8. Amostra de favo de criação (no campo).....	32
Figura 9. Preparação de alimentação suplementar.....	32
Figura 10. Cortes num quadro de colónia órfã para a inserção porções de favos com postura do dia de outra colónia.....	33
Figura 11. Quadro de uma colónia forte.....	33
Figura 12. Verificação dos níveis de <i>Varroa destructor</i> nas crias de zângãos.....	33
Figura 13. Recolha de amostras de favo de criação.....	33
Figura 14. Contagem de varroas em amostras de abelhas adultas.....	35
Figura 15. Contagem de varroas em amostras de criação.....	35
Figura 16. Amostra de favo de criação congelado.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os polinizadores: importância das abelhas nos ecossistemas

A polinização é a transferência de pólen entre a parte masculina e feminina das plantas, o que permite a sua fertilização e reprodução. Pode ser feita pelo vento ou água, mas a grande maioria da polinização, tanto de plantas selvagens como de cultivos agrícolas, é feita pelos animais. Os animais polinizadores são alguns vertebrados, como lagartos, aves e morcegos, ou insetos, como traças, borboletas, abelhas, moscas e vespas. Este último grupo de polinizadores é o mais importante. Cerca de 75% dos cultivos agrícolas globais para consumo humano dependem da polinização feita por insetos (Potts et al., 2016).

As abelhas são o animal polinizador de maior importância, e, por isso, muitas vezes consideradas as pedras angulares dos ecossistemas (Potts et al., 2016). O declínio da população de abelhas pode levar à redução da produção de frutos e sementes pelas plantas, o que pode resultar na interrupção das cadeias de plantas-polinizadores e, conseqüentemente, culminar em cascatas de extinção (Byrne & Fitzpatrick, 2009).

Recentemente tem-se vindo a observar um declínio evidente dos insetos polinizadores, tanto selvagens como as colónias de abelhas em apicultura. Paralelamente, ocorre o declínio das plantas que dependem da polinização feita por estes insetos. Na Europa central foi registado um declínio de 25% das colónias entre 1985 e 2005 (Potts et al., 2010). Os fatores que têm maior impacto no declínio dos polinizadores são a perda, fragmentação e destruição de habitat, o decréscimo da diversidade de recursos, a introdução de espécies invasoras, parasitas e doenças, o aumento do uso de pesticidas e da poluição ambiental e as alterações climáticas (Brown & Paxton, 2009; Potts et al., 2010).

Apesar disto, o número de colónias de abelhas em apicultura aumentou globalmente em cerca de 45% desde 1961. Por outro lado, a proporção de colheitas agrícolas tem vindo a aumentar mais rapidamente, o que pode levar a que a necessidade dos serviços dos polinizadores ultrapasse o aumento do número de colónias de abelhas. Uma grande parte da produção de frutos está potencialmente em risco devido ao declínio das colónias de apicultura e de polinizadores selvagens (Potts et al., 2010).

Na Europa existem várias subespécies endémicas de *Apis mellifera*, a abelha-europeia (De La Rúa et al., 2009). As abelhas da espécie *A. mellifera* e, em menor extensão, *Apis cerana* (originária do continente asiático) são usadas em apicultura, para a

produção de mel, e para a polinização de cultivos agrícolas e são, provavelmente, os mais importantes polinizadores agrícolas a nível mundial (Winfree, 2010).

1.2 *Varroa destructor*: uma nova ameaça para *A. mellifera*

Os ácaros de *Varroa* foram descobertos pela primeira vez há mais de 100 anos na abelha melífera asiática, *A. cerana*, na região de Java, Indonésia. Na altura foram nomeados de *Varroa jacobsoni* (Dietemann et al., 2013). Este ectoparasita mantém uma relação estável parasita-hospedeiro com *A. cerana* devido a um longo período de coevolução (Rosenkranz et al., 2010). No decurso das atividades apícolas, colónias de *A. mellifera* foram translocadas para zonas fora da sua distribuição natural e expostas a parasitas e patógenos com os quais nunca tinham contactado. Como resultado, os ácaros de *varroa* encontraram um novo hospedeiro (Dietemann et al., 2019). Na década de 1960 foi detetada, na China e antiga USSR, a presença de *varroa* na *A. mellifera* (Wilkinson & Smith, 2002). Este ácaro distribuiu-se rapidamente por quase todo o globo, sendo hoje em dia difícil encontrar uma colónia não infetada (Rosenkranz et al., 2010). *A. mellifera* não possui os mecanismos adaptativos contra este parasita, o que as torna especialmente vulneráveis. Rapidamente a varroose causou efeitos desastrosos na apicultura e nas populações selvagens de *A. mellifera* (Dietemann et al., 2019). Atualmente é considerada uma das principais causas de perda de colónias apícolas na Europa (van Dooremalen et al., 2012).

Até ao fim dos anos 1990 classificava-se o ácaro que tinha efetuado a troca de hospedeiro para *A. mellifera* como *V. jacobsoni* (OIE, 2018). As diferenças genóticas, fenotípicas e reprodutivas entre os ácaros que afetavam a *A. cerana* no continente asiático, então todos classificados como *V. jacobsoni*, foram a razão que levantou a suspeita de que se trataria de mais do que uma espécie. Anderson e Trueman (2000) demonstraram que *Varroa jacobsoni* e *Varroa destructor* são duas espécies distintas, sendo *V. destructor* a espécie que efetuou a mudança de hospedeiro para *A. mellifera*. A partir de então passou a atribuir-se à *V. destructor* os efeitos nefastos nas abelhas ocidentais (*A. mellifera*) (Anderson & Trueman, 2000). O impacto destrutivo da *V. destructor* tem sido cada vez mais aparente. A este parasita aliam-se as ameaças a *A. mellifera* crescentes nos últimos anos, resultando na mortalidade de colónias apícolas e no declínio global das populações de abelhas (Potts et al., 2010; Semkiw et al., 2013). Atualmente estão classificadas quatro espécies de varroa: *V. jacobsoni*, *V. destructor*, *Varroa underwoodi* e *Varroa rinderi* (OIE, 2018). Apenas *V. destructor* conseguiu colonizar *A. mellifera* com sucesso, até ao momento (Dietemann et al., 2012).

1.3. Biologia de *V. destructor*

V. destructor vive toda a sua vida no hospedeiro, não tendo uma fase de vida livre. O seu ciclo de vida é marcado por duas fases: uma fase forética, que corresponde ao parasitismo de abelhas adultas dentro e fora da colmeia, e uma fase de desenvolvimento e reprodução, nas células de criação de abelha (Rosenkranz et al., 2010).

A fêmea adulta de *V. destructor* entra na célula de criação de abelha antes que esta seja operculada. Posiciona-se no fundo, entre a larva de abelha e as paredes do alvéolo, e fica presa na comida larvar. Após a operculação da célula, e já tendo consumido toda a comida larvar, a fêmea de *V. destructor* começa a alimentar-se dos corpos adiposos da cria de abelha. Às 70 horas após a operculação, o parasita põe o primeiro ovo, o qual será um macho (haploide). Os ovos seguintes são fertilizados – dão origem a fêmeas - e postos em intervalos de 30 horas. Em ciclos reprodutivos normais podem ser postos até cinco ovos numa célula de obreira, e seis em células de zângãos (pois o desenvolvimento de um zângão é mais longo – 24 dias – do que o das obreiras – 21 dias). As larvas do ácaro desenvolvem-se dentro dos ovos durante as primeiras horas após a ovoposição, e de seguida passam às fases ninfais (protoninfa e deutoninfa), até atingirem a maturidade sexual. As fêmeas demoram cerca de 5,8 dias para se tornarem adultas, e os machos cerca de 6,6 dias. Durante as fases de ninfa, os parasitas não se conseguem alimentar autonomamente, portanto a fêmea progenitora perfura a cutícula da pupa de abelha e cria uma zona de alimentação para a sua descendência (Rosenkranz et al., 2010).

O macho atinge a fase adulta antes da fêmea. Assim que a primeira fêmea se torna adulta ocorre a reprodução dentro do alvéolo de criação da abelha. Quando abelha emerge do alvéolo, as fêmeas adultas de *V. destructor* (a progenitora e descendentes) emergem com ela e procuram as abelhas mais velhas para parasitar – passam, então, à fase forética. Os machos e as fêmeas não fecundadas não deixam a célula, morrendo poucas horas após a desoperculação. Na figura 1 está representada a reprodução de *V. destructor* numa célula de obreira. As fêmeas adultas de *V. destructor* durante a fase forética são

transportadas até novas células de criação, continuando, assim, o seu ciclo de vida (DGAV, 2020; Rosenkranz et al., 2010)

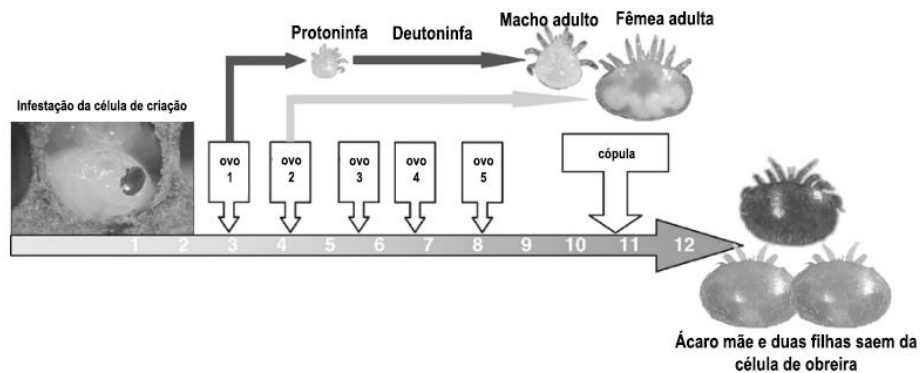


Figura 1. O ciclo reprodutivo de *Varroa destructor* dentro da célula operculada de obreira. A fêmea de *V. destructor* entra na célula antes da operculação; aproximadamente 3 dias depois é posto o primeiro ovo – macho - seguido por 4 ovos de fêmeas. Os números da seta inferior correspondem aos dias pós-operculação. Retirado e adaptado de Rosenkranz et al.(2010).

As fêmeas de *V. destructor* são grandes, com cerca de 1,5mm de largura, e de cor vermelha-acastanhada. Os machos e as fêmeas em estado de ninfa são mais pequenos e de cor branca/creme. Os ácaros de todas as fases são visíveis a olho nu (Dietemann et al., 2013).



Figura 2. *Varroa destructor*, fêmea adulta: à esquerda vista dorsal à lupa, no centro vista ventral à lupa (*V. destructor* cedida pelo professor Paulo António Russo Almeida, do Laboratório LabApis, Departamento de Zootecnia, UTAD); à direita – vista a olho nu no estrado sanitário (foto cedida pelo apicultor).

1.4. Varroose – Efeitos na saúde da colónia

A varroose é a parasitose causada pelo ácaro *V. destructor*, e tem efeitos a nível individual e da colónia. As abelhas que emergem de pupas parasitada têm o peso inferior ao normal e menor longevidade. No caso dos zângãos, que podem eclodir com um peso 11 a 19% inferior dependendo do grau de infestação, a performance de voo pode estar reduzida (Rosenkranz et al., 2010). O desenvolvimento das glândulas produtoras de alimento para a criação também é afetado, assim como as capacidades cognitivas das

abelhas (Wegener et al., 2016). As obreiras parasitadas durante o seu desenvolvimento começam as atividades no exterior mais precocemente, e têm longevidade significativamente reduzida. As abelhas campeiras parasitadas demonstram diminuição da capacidade de aprendizagem não associativa, ausências da colónia mais prolongadas e menor taxa de retorno a esta (Rosenkranz et al., 2010).

Para além dos efeitos diretos na colónia e nos indivíduos desta, *V. destructor* é vetor de vários vírus, como o Vírus das Asas Deformadas (DWV) e o vírus da Paralisia Aguda (ABPV). Uma grande parte dos danos causados pela varroose devem-se a efeitos indiretos, consequência da infeção por vírus vetorizados por *V. destructor* (Wegener et al., 2016). Antes do surgimento desta parasitose, as infeções virais não eram consideradas um problema significativo para a saúde das abelhas (Rosenkranz et al., 2010). A transmissão de vírus juntamente com a infestação pelo ácaro contribuem sinergicamente para o fenómeno de colapso das colónias (Annoscia et al., 2012). Alguns vírus, como é o caso do Vírus das Asas Deformadas, normalmente apenas causam infeções benignas em abelhas não parasitadas por *V. destructor*. No entanto, para além de atuar como vetor, a picada do ácaro parece deprimir o sistema imunitário da abelha e, assim, desencadear a replicação de vírus em estado latente no organismo da abelha parasitada (Wegener et al., 2016).

Aquando da iminência do colapso da colónia, os sinais tipicamente observados são abelhas com deformações (nas asas, por exemplo), o ninho de criação pouco uniforme, perda do comportamento social coordenado, como o comportamento higiénico, prestação de cuidados à rainha, e diminuição abrupta da população. Este desfecho pode dever-se mais às infeções virais do que ao efeito direto da parasitose por *V. destructor* (Rosenkranz et al., 2010).

Recentemente, surgiu a hipótese de que *V. destructor* se alimenta principalmente da porção lipídica das abelhas, e não da hemolinfa (como até há pouco se assumia). A hemolinfa dos insetos é pouco nutritiva para suprir as necessidades energéticas de *V. destructor*. Pelo contrário, o tecido lipídico é bastante nutritivo, e desempenha um papel importante na saúde da abelha: é um tecido essencial para a função imunitária, destoxificação de pesticidas, sobrevivência ao inverno, entre outros. Logo, o declínio na saúde das abelhas anteriormente atribuído ao consumo de hemolinfa pelas *Varroas* pode também ser explicado pela nova hipótese de que o ácaro se alimenta do tecido lipídico do hospedeiro (Ramsey et al., 2019).

A varroose é endémica em Portugal continental, e na maior parte da Europa. Sem tratamento, ou quando este é incorreto, a maioria das colónias morre dentro de um a três anos após a infestação inicial por *V. destructor*. A sua erradicação não é possível, pelo que o tratamento preventivo das colónias é obrigatório (DGAV, 2020; Semkiw et al., 2013).

Devido às condições climáticas são obrigatórios no mínimo dois tratamentos anuais em cada colónia em território nacional, e é aconselhado que se alterne todos anos o fármaco a utilizar (DGAV, 2020). Em Portugal existem vários fármacos utilizados e aprovados para o combate à varroose. Alguns são acaricidas químicos (amitraz, tau-fluvalinato, flumetrina) e outros são à base de ácidos orgânicos e óleos essenciais (ácido oxálico, ácido fórmico, timol) (DGAV, 2020).

1.6. Tratamento da varroose: considerações gerais

1.6.1. Moléculas

O tratamento preventivo é essencial, sendo que não é possível erradicar a varroose, e o uso de medicamentos é considerado o meio mais eficaz. Existem dois tipos de acaricidas anti-varroa, os sintéticos/químicos e os naturais (à base de ácidos orgânicos e óleos essenciais). Alguns dos acaricidas sintéticos mais relevantes nos últimos anos são o coumafós (um organofosfato, que foi das primeiras moléculas a ser utilizada), o tau-fluvalinato e flumetrina (piretroides), e o amitraz (formamidina). Os acaricidas naturais são o ácido fórmico, ácido oxálico, ácido láctico e timol (Rosenkranz et al., 2010).

Apesar da existência de resistências a alguns dos fármacos químicos, estes são em geral eficientes no controlo da varroose, e são também de fácil aplicação. Os fármacos à base de produtos naturais têm modo de aplicação mais complexo; a eficácia é boa, mas com resultados mais variáveis, pois depende vários fatores (as condições dentro e fora da colmeia, modo de aplicação) (Rosenkranz et al., 2010).

1.6.2. Dinâmica populacional de *A. mellifera* e *V. destructor*

As colónias de *A. mellifera* têm variações populacionais de acordo com as estações. Em climas temperados, inicia-se a criação de abelhas no fim do inverno e o pico é na primavera. Este pico leva a um aumento exponencial da população da colónia, e é nesta altura que se dá o fenómeno de enxameação (a maioria das obreiras deixam a colmeia com a rainha velha e procuram uma nova casa, e as restantes obreiras e a nova rainha ficam e reconstróem a colónia). Durante o resto da primavera e verão, até ao início do outono, a colónia dedica-se à recolha de pólen e néctar. Com a aproximação do inverno, uma época do ano difícil para a colónia, ocorrem várias mudanças a nível individual e da colónia. As abelhas têm de se preparar para a estação fria e para a escassez do alimento na natureza. Acontecem mudanças a nível do comportamento e fisiologia de cada abelha que as tornará aptas para sobreviver o inverno, e a rainha diminui progressivamente a postura. As abelhas de inverno têm características que as permitem sobreviver à estação:

os níveis de vitelogenina, proteínas da hemolinfa e tamanho das glândulas hipofaríngeas são superiores, assim como a longevidade (até cerca de 6 meses em comparação com cerca de 30 dias noutras alturas do ano) (Döke et al., 2015).

A figura 3, que se encontra abaixo, é um modelo de Martin (1999), e nela está representada a dinâmica da população de abelhas ao longo do ano, num clima temperado. A população de abelhas adultas (a linha a tracejado) tende a crescer de abril a julho (da primavera até ao verão), e diminuir de agosto a novembro (fim do verão ao início do inverno). A criação de obreiras (linha escura mais fina) e zângãos (linha escura mais grossa) apresenta uma tendência semelhante, reduzindo bastante ou cessando durante o inverno (Martin, 1998).

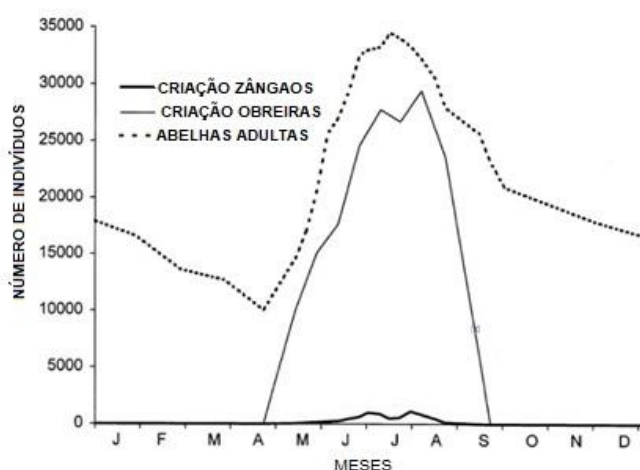


Figura 3. Variação sazonal da população de uma colónia de *Apis mellifera* em clima temperado: número de abelhas adultas (linha tracejado), número criação de zângão (linha contínua grossa), número de criação de obreiras (linha contínua fina). Retirado e adaptado de Martin (1998).

V. destructor é um parasita obrigatório da abelha, e apenas consegue sobreviver algumas horas fora do seu hospedeiro. O pico de população de *V. destructor* ocorre após o pico da população de abelhas, tal como está descrito na figura 4 (OIE, 2018).

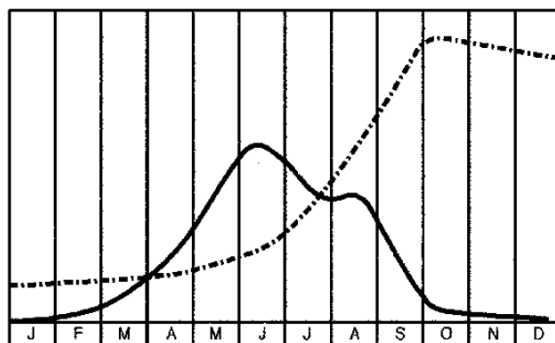


Figura 4 Dinâmica populacional de abelhas e *V. destructor* ao longo do ano em clima temperado do hemisfério norte: número de criação de abelha (linha contínua) e número ácaros (linha a tracejado). Retirado de: OIE (2018).

Conseqüentemente, quando o número criação e de abelhas começa a diminuir, o número de parasitas aumenta, e, com o tempo, o número de células de criação parasitadas aumenta também. É durante este período, de redução de criação de abelha e aumento da infestação, que as abelhas em desenvolvimento em células infetadas por *V. destructor* se tornarão abelhas de inverno (van Dooremalen et al., 2012). Ao se alimentar dos corpos adiposos, *V. destructor* prejudica as alterações fisiológicas típicas em abelhas de inverno, e, por isso, reduz a longevidade destas, afetando a sobrevivência das abelhas até à próxima primavera (Döke et al., 2015; Ramsey et al., 2019). Por esta razão é necessário efetuar um tratamento para reduzir os níveis de *V. destructor* antes da formação das abelhas que irão sobreviver ao inverno. As abelhas saudáveis que não foram parasitadas durante o seu desenvolvimento ontogénico terão maior longevidade, e, conseqüentemente, as colónias terão maior sucesso na sobrevivência à estação fria (Döke et al., 2015; Rosenkranz et al., 2010). Em clima mediterrânico pode existir criação operculada mesmo durante o inverno, o que favorece a reprodução de *V. destructor*, podendo existir surtos de varroa durante esta época do ano (Colin et al., 1997).

Na primavera é fundamental tratar preventivamente as colónias. Um nível de infestação superior a 2% (2 ácaros por cada 100 abelhas) pode levar a perdas massivas, pois, com a aproximação do pico do fluxo de néctar, a criação de abelhas aumenta, e *V. destructor* tem as condições ideais para a reprodução e crescimento populacional (Giacobino et al., 2016).

1.6.3. Resíduos nos produtos apícolas e na colmeia

O uso de acaricidas no combate a *V. destructor* deixa resíduos em vários produtos da apicultura. Dependendo da substância usada, diferentes níveis de resíduos de fármacos

podem ser encontrados no mel, própolis, pólen e na cera (Wallner, 1999). Segundo o trabalho de Bogdanov et al., 1998 a maior concentração de resíduos de fármacos encontra-se na cera dos quadros de criação, seguida pela cera dos favos de mel, alimento açucarado e mel em último. A contaminação de cera após o uso intensivo destes fármacos é rápida, e, por sua vez, após a cessação do uso do fármaco é necessário muito tempo até que os resíduos deixem de ser detectados na cera, mesmo depois do processo de reciclagem comercial (Bogdanov et al., 1998). As abelhas podem contaminar a nova cera que constroem até 18 meses após serem expostas ao tratamento - os fármacos estão espalhados pelos corpos e pernas das abelhas e contaminam assim a cera da colônia, e a cera “armazena” as substâncias lipofílicas, as quais podem passar para a nova cera e própolis. Como resíduos de acaricidas não se degradam na cera, esta pode ser uma fonte de contaminação do mel, e um local de acumulação de resíduos de fármacos após sucessivas utilizações (Lodesani et al., 2008).

Os acaricidas sintéticos são lipofílicos, logo têm grande risco de resíduos e acumulação na cera e produtos apícolas. A sua acumulação aumenta com os sucessivos tratamentos, e podem persistir na cera mesmo depois da reciclagem industrial. Pelo contrário, os acaricidas naturais são solúveis em água ou voláteis; o risco de resíduos e acumulação nos produtos apícolas é baixo, e, para além disso, são substâncias naturalmente presentes no mel (Rosenkranz et al., 2010).

1.6.4. Toxicidade dos fármacos para as abelhas

Os acaricidas são necessários no combate à varroose, mas podem também ter efeitos secundários tóxicos nas abelhas. Sendo assim, deve ser aplicada a dose mínima efetiva dos fármacos (também para diminuir a acumulação de resíduos e evitar o surgimento de resistências) (Gregorc, 2019). As abelhas podem importar químicos e poluentes do seu ambiente exterior, mas uma grande parte dos resíduos de pesticidas encontrados nas colônias são pesticidas químicos introduzidos na atividade apícola para controlar *V. destructor* (Dai et al., 2018; Wu et al., 2011).

As abelhas têm o sistema imunológico relativamente deficitário, pois expressam cerca de metade das enzimas de desintoxicação que outros insetos mais resistentes a pesticidas. Esta deficiência torna-as mais sensíveis aos fármacos pesticidas, e, conseqüentemente, a exposição a estas substâncias torna-as menos capazes de lutar contra infeções bacterianas e virais, que são outros fatores de stress ao qual estão expostas devido à varroose (Wu et al., 2011).

A exposição das abelhas-rainha a doses sub-letais de pesticidas, pela cera contaminada, pode ter conseqüências adversas na sua capacidade reprodutiva, tais como

a diminuição da postura, diminuição do peso dos ovários e aumento da rejeição dos alvéolos reais (as obreiras rejeitam as células de criação de novas rainhas). A criação também pode ser afetada e a emergência das células ser mais tardia. Isto é uma vantagem para a reprodução de *V. destructor*, a qual tem assim a possibilidade de produzir um maior número de descendentes fêmeas adultas durante o período de desenvolvimento da cria de abelha. (Wu et al., 2011). Os zângãos quando expostos a fármacos anti-varroa, podem apresentar maior mortalidade durante o seu desenvolvimento ontogénico, menor peso, esperma com menor viabilidade e menor contagem de espermatozóides (Dai et al., 2018).

Os fármacos aprovados para o combate a *V. destructor*, quando usados conforme a posologia do fabricante, não têm efeitos agudos adversos na colónia. No entanto, a acumulação de resíduos no mel, cera e pólen pode levar à exposição crónica das abelhas adultas e crias a doses sub-letais dos acaricidas, o que, por sua vez, pode afetar o metabolismo, fisiologia, comportamento e sistema neurológico das abelhas (Dai et al., 2018).

1.6.5. Resistência de *V. destructor* aos acaricidas

O desenvolvimento de resistência aos acaricidas pelas populações de *V. destructor* é um problema a nível global (Kamler et al., 2016). Cerca de uma década após a chegada de *V. destructor* à Europa já se detetavam resistências aos fármacos acaricidas, como fluvalinato, amplamente usado na altura (Milani, 1995). Hoje em dia, existem também resistências cruzadas a outros piretroides; aos organofosatos e formamidinas (amitraz) (Rosenkranz et al., 2010). Em Portugal, segundo os dados do relatório final “Eficácia actual do Apistan e do Apivar na luta contra a varroose em Portugal”, inserido no programa apícola de 2006, mais de 50% dos testes conclusivos realizados revelaram populações de varroa resistentes ao fluvalinato, e 17% dos testes conclusivos revelaram populações com resistência ao amitraz (UTAD et al., 2005).

A acumulação de resíduos de fármacos anti-varroa no ambiente da colónia pode despoletar as resistências dos ácaros a estes compostos. (Semkiw et al., 2013). O uso repetido da mesma substância ativa exerce uma forte pressão de seleção no ácaro. De forma a atrasar o surgimento de resistências, é aconselhável alternar as substâncias anti-varroa em tratamentos consecutivos (Sara et al., 2021).

1.6.6. Monitorização dos níveis de *V. destructor*

A monitorização frequente do nível de infestação das colónias é uma ação fundamental no manejo e controlo de *V. destructor*. (Norain Sajid et al., 2020) A

monitorização do nível de infestação permite perceber se é necessário ou não tratar as colónias, e quando, de modo a fazer um uso mais adequado dos fármacos e proteger a colónia de infestações massivas. Segundo Gatien e Currie (2003), é aconselhado o tratamento na primavera quando os níveis de infestação são superiores a 2%, de modo a prevenir perdas de produção de mel. No outono, deve ser efetuado tratamento quando o nível de infestação é superior a 4% (Gatien & Currie, 2003).

Para monitorizar o nível de *V. destructor* pode-se utilizar o método de contagem de ácaros mortos nos estrados sanitários, ou métodos de desalojamento dos ácaros através de lavagem de amostras de abelha adultas, ou da polvilhação da colónia com açúcar em pó seguida de contagem dos ácaros caídos nos estrados sanitários (Gregorc, 2019).

2. DESENHO EXPERIMENTAL DE UM ESTUDO DE EFICÁCIA DE CAMPO DE FÁRMACOS ANTI-VARROA

Vários fatores afetam o sucesso do tratamento contra a varroose, tais como a substância farmacológica utilizada, o período de tratamento, e o ambiente da colônia e do apiário. Para além disto, a eficácia de alguns fármacos (por exemplo, os de origem natural) depende da pressão de evaporação (pressão à qual um líquido se torna vapor e as duas fases coexistem em equilíbrio) dentro da colônia, logo a altura do ano ou a temperatura ambiente durante a aplicação do tratamento podem ter influência no sucesso do tratamento. A atividade da colônia relaciona-se com a quantidade de substância ativa que vai ser distribuída na superfície do corpo das abelhas, sendo assim, uma colônia mais populosa pode favorecer a dispersão do fármaco, levando a uma maior eficácia do tratamento. Outros fatores, como a quantidade de criação, a severidade da infestação, e a apresentação farmacológica podem também ter alguma influência. Como vários fatores ditam a eficácia dos fármacos contra a varroose, é pertinente a realização de estudos de eficácia de campo em diferentes apiários (Gracia et al., 2017).

A testagem da eficácia de campo dos fármacos contra a varroa é complexa, pois muitas variáveis de estudo não podem ser controladas. As colônias de estudo devem ser homogeneizadas quanto ao ambiente, tipo e tamanho da colmeia, nível de infestação de varroa, historial de tratamento, idade e grau de parentesco entre as rainhas, presença de criação e distribuição etária das obreiras. De seguida, estão descritos alguns procedimentos a ter em conta de modo a facilitar e otimizar os testes de eficácia de campo (Dietemann et al., 2013).

2.1. As colmeias

As colmeias usadas no estudo de eficácia devem ser todas do mesmo tipo. Devem ser instalados estrados sanitários no fundo da colmeia para contagem de varroas caídas (implementando medidas que impeçam que as formigas tenham acesso a estes, pois podem remover os ácaros e assim interferir com a contagem) (Dietemann et al., 2013).

2.2. As colônias

Nos estudos de eficácia não devem ser usadas colônias fracas ou com sinais de doença que não sejam devidos a varroose. A subespécie de abelha deve ser equalizada ou diversificada, dependendo se o objetivo é verificar a eficácia numa subespécie ou averiguar diferenças entre diferentes subespécies. Da mesma forma, a escolha das rainhas

depende do objetivo do estudo em questão: a utilização de rainhas da mesma linhagem (irmãs) diminui diferenças devido a variabilidade genética; rainhas sem grau de parentesco, e da mesma idade, podem ser utilizadas quando se quer considerar a eficácia dos fármacos em diferentes genótipos (Dietemann et al., 2013) A escolha das rainhas é importante pois o crescimento da população de varroa está relacionado com a atividade de postura, sendo que o ácaro se reproduz-se dentro das células de cria (DGAV, 2020).

A força da colónia - população de abelhas adultas, quantidade e tipo de criação - devem ser medidos e homogeneizados. A presença e o tipo de criação são importantes de acordo com o tipo de fármaco, e, mais uma vez, o objetivo do estudo (Dietemann et al., 2013). Alguns fármacos de origem natural, como o timol e o ácido oxálico não conseguem penetrar as células de criação operculadas, mas outros, como a amitraz, tau-fluvalinato e ácido fórmico, conseguem atuar nos ácaros de *V. destructor* presentes na criação operculada (Rosenkranz et al., 2010). A infestação inicial de varroa deve ser suficiente para que a contagem de ácaros caídos seja possível (superior a 300 ácaros por colónia). Deve ser utilizada cera livre de resíduos, quando possível. Caso contrário, o histórico de tratamentos anteriores deve ser igual em todas as colónias (Dietemann et al., 2013).

2.3. Local de estudo

Os apiários de estudo devem estar longe o suficiente de outros apiários, de modo a não causar distúrbios e minimizar o risco de re-infestação (Dietemann et al., 2013). A re-infestação ocorre devido à derivação de abelhas campeiras parasitadas, que, por desorientação ou com intuito de pilhar alimento, entram noutras colónias, ou através da derivação de zângãos, os quais se movem livremente entre colónias numa grande área geográfica. Este comportamento parece ser mais frequente em alturas do ano em que abundância de pólen e néctar na natureza é reduzida (outono e inverno, por exemplo). As colónias também podem importar ácaros por pilharem outras colónias ou enxames, os quais, se estiverem altamente infestados, podem ter a sua capacidade de defesa da colónia reduzida (Greatti et al., 1992).

O tipo e a disponibilidade de alimento devem ser registados, visto a abundância deste influenciar o comportamento de derivação e pilhagem. Se o estudo for realizado em apiários diferentes, as disponibilidade e tipo de alimento, assim como as condições climáticas devem ser semelhantes. Quando isso não é possível, o número da amostra deve ser ajustado de modo a colmatar estas diferenças (aumentar o número de apiários) (Dietemann et al., 2013).

A distância entre as colónias de controlo e as colónias tratadas deve ser suficiente para prevenir a contaminação cruzada através da derivação ou pilhagem por abelhas campeiras ou zângãos (Dietemann et al., 2013).

2.4. O tratamento

Devem ser definidos o período de tratamento, número e intervalo entre tratamentos. Preferencialmente, devem ser feitos realizados quando a temperatura exterior é superior a 5 °C. (Dietemann et al., 2013) A temperatura exterior não tem impacto direto na libertação da substância ativa, mas tem impacto na atividade das abelhas, o que conseqüentemente, influencia a libertação da substância ativa e a sua propagação pelo corpo das abelhas (Semkiw et al., 2013).

É também necessário incluir um grupo de colónias de controlo não tratadas, de modo a estabelecer se o efeito na redução de *V. destructor* se deve ao tratamento em estudo, e para fazer comparações da mortalidade dos ácaros em colónias não tratadas e as tratadas (Dietemann et al., 2013).

3. EXEMPLO DE UM ESTUDO DE EFICÁCIA DE CAMPO DE TRÊS APRESENTAÇÕES FARMACOLÓGICAS DE AMITRAZ

Este trabalho experimental foi realizado sabendo-se que não reuniria as condições ideais para o objetivo: determinar a eficácias das três apresentações farmacológicas de amitraz em diminuir o nível de infestação por *V. destructor*. No contexto em que foi realizado, não existiam condições de o fazer da forma mais correta, nem à escala necessária. No entanto, o objetivo da sua realização foi simular um ambiente de estudo em apicultura e iniciar a aluna na parte prática deste setor. As componentes do desenho experimental e da sua execução vão ser detalhadas abaixo, e a forma como influenciaram os resultados vai ser analisada na discussão.

3.1. Introdução - O amitraz

O amitraz, uma formamidina, é uma das substâncias usadas em vários países europeus no combate à *V. destructor*, inclusive em Portugal (Semkiw et al., 2013). O amitraz bloqueia os recetores da octopamina. Nos insectos, a octopamina e os recetores de octopamina, análogos à dopamina e sistema dopaminérgico nos mamíferos, estão acoplados a um segundo mensageiro que eleva o AMP cíclico (monofosfato cíclico de adenosina), resultando em neuroexcitação (Casida & Durkin, 2013). Como consequência do bloqueio destes recetores, os ácaros de varroa ficam paralisados e caem no fundo da colmeia, acabando por morrer de fome (Semkiw et al., 2013).

O amitraz é lipofílico, mas muito instável no mel e na cera, acabando por se degradar. Alguns seus produtos de degradação podem persistir na cera após a reciclagem comercial. O DPMF (N-(2,4-dimetilfenil)-N'-metilformamidina) produto de degradação do amitraz, tem propriedades acaricidas e inseticidas, e toxicidade aguda para os mamíferos superior ao próprio amitraz (Korta et al., 2001, 2003).

Em Portugal, até ao momento, estão autorizados três fármacos com princípio ativo amitraz para o combate à varroose: Amicel[®], Apitraz[®] e Apivar[®] (DGAV, 2019). Cada tratamento com um destes fármacos contém 500 mg de amitraz. O Amicel[®] é uma solução que deve ser colocada em tiras de celulose 6 a 12 horas antes de as aplicar na colónia. Inicialmente é colocada uma tira, e ao 12^o dia é colocada a segunda tira. Aos 30 dias a contar do início do tratamento são removidas as duas tiras (DGAV, 2020). O tratamento com Apitraz[®] consiste na colocação de duas tiras por colónia, que devem ser retiradas após 6 semanas (DGAV, 2018). O Apivar[®] é um tratamento sob a forma de tiras plásticas rígidas. Devem ser colocadas de duas tiras na zona de criação, e retiradas após 6

semanas, se a quantidade de crias for baixa ou se se aproximar a altura de fluxo de produção de mel, ou então após 10 semanas (DGAV, 2020).

O modo de atuação farmacocinética destas apresentações farmacológicas é pelo contacto das abelhas com as tiras de fármaco. A abelha fica revestida com a substância ativa que, por sua vez, impregna a cutícula externa de *V. destructor*, e exerce assim a sua atividade acaricida. Para que o tratamento seja bem-sucedido, a dose de substância ativa presente nas abelhas adultas é muito importante. A temperatura exterior não tem impacto direto na libertação da substância ativa, mas tem impacto na atividade das abelhas. Sendo assim, não só a quantidade de amitraz presente nas tiras tem importância, mas também as condições atmosféricas. (Semkiw et. al., 2013).

3.2. Métodos e procedimento

O estudo foi realizado num apiário localizado na zona de São João de Bastuços, Barcelos. Por motivos de privacidade do apicultor não será exposto neste trabalho o número do apiário nem as coordenadas da localização do mesmo. Na região do apiário, a floração de eucalipto é abundante durante os meses de janeiro e fevereiro. No presente ano, devido às condições climáticas (chuva e frio), não houve fluxo de néctar dessa floração.

Foram utilizadas 12 colónias do apiário, que no total aloja entre 80 e 100. As colmeias do apiário são do tipo Lusitana, e as abelhas são da subespécie *Apis mellifera iberiensis*. As colónias foram escolhidas segundo a experiência do apicultor em conjunto com o técnico da APIMIL. Os critérios tidos em conta na homogeneização das colónias foram o número de quadros com criação operculada, número de quadros com reservas de mel e população total de abelhas adultas, através de inspeção visual. A localização das colónias no apiário foi no fim de uma das filas, de modo a estarem juntas e facilitar a organização de trabalho do apicultor (na figura 5 é apresentado um esquema da organização do apiário para posteriormente se perceber na discussão se poderá ter influenciado os resultados).

As 12 colónias foram divididas em 4 grupos de estudo (cada um com 3 colónias): 3 grupos de tratamento com um fármaco diferente, e num deles não foi realizado qualquer tratamento anti-varroa (grupo de controlo). A cada grupo foi dado o nome do fármaco utilizado: Apitraz[®], Amicel[®] e Apivar[®]; o grupo sem tratamento chama-se Controlo. Sendo assim, três colónias foram tratadas com Amicel[®], três com Apitraz[®], três com Apivar[®] e três não receberam nenhum tratamento. Dentro de cada grupo de estudo foi atribuído um número a cada colónia, de 1 a 3. Nas colónias número 1 de cada grupo foi adicionada um

quadro de cera moldada incompleta, aos 1 e 15 dias após a aplicação de tratamento, para a medição de resíduos de amitraz.

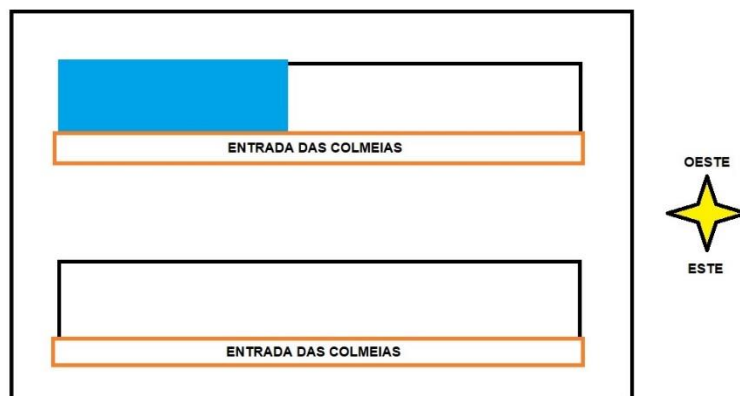


Figura 5 Esquema da organização do apiário (visto de cima); a azul: localização das colônias de estudo.

As amostras recolhidas em cada colónia foram de dois tipos: amostra de favo de criação de obreiras operculada (cerca 12cm², preenchidos de criação operculada); e amostra de abelhas adultas (cerca de 50 abelhas adultas da zona rampa da entrada da colmeia ou do interior da tampa, dependendo de onde se agregassem mais abelhas).

No dia 19 de novembro de 2020 foram escolhidas as colónias e realizado o primeiro momento do trabalho. Foram recolhidas amostras (favos de criação e abelhas adultas) de todas as colónias e foi efetuado o primeiro tratamento (temperatura ambiental entre 16°C e 20°C). Foi feita suplementação alimentar igual em todas as colmeias. O segundo momento de recolha de amostras estava planeado para o dia 14 de janeiro de 2021 (8 semanas após a primeira aplicação dos fármacos). Não foi realizado pois não existia criação operculada àquela data. A 26 de fevereiro de 2021 foi efetuada novamente a recolha de amostras de todas as colónias (favo de criação e abelhas adultas), e realizou-se o segundo tratamento (temperatura ambiente era cerca de 21°C). Todas as colónias receberam suplementação alimentar. No dia 27 de fevereiro de 2021 foram adicionados quadros de cera moldada incompleta às colmeias número 1 de cada grupo de estudo. No dia 15 de março de 2021 foi colocada a segunda tira de tratamento de Amicel[®] (por lapso, não foi registada a temperatura ambiental). Foram recolhidas amostras de todas as colónias (favo de criação e abelhas adultas), exceto do grupo AMICEL (pois a colocação de tratamento ainda não estava terminada), e procedeu-se à colocação de quadros de cera moldada incompleta em todas as colmeias, à exceção das do grupo AMICEL. A temperatura ambiental era cerca de 20°C. No dia 27 de março de 2021 foram colhidas

amostras do grupo de estudo AMICEL, e procedeu-se à colocação de um quadro de cera moldada incompleta nas colmeias número 1 de cada um destes grupos.

As amostras foram congeladas posteriormente à sua recolha. Foram analisadas ao mesmo tempo no final do estágio curricular. As técnicas de determinação do nível de infestação nas amostras estão descritas no anexo B. Estas foram explicadas pelo professor Paulo António Russo Almeida, durante uma visita ao laboratório LabApis, Departamento de Zootecnia, UTAD, para o efeito.

3.3. Resultados

Foi encontrado 1 ácaro de *V. destructor* na amostra de abelhas AMICEL 1 recolhida a 26 de fevereiro. Nas restantes amostras não foi encontrado nenhum. Os resultados da contagem estão detalhados na tabela 1 (estão descritos o número de crias desoperculadas/abelhas adultas e ácaros encontrados em cada amostra). Durante a inspeção visual das colónias (nos momentos de escolha das colónias, de colocação de fármacos e recolha de amostras) também não foram visualizadas varroas nas abelhas adultas.

Na colmeia CONTROLO 3 não foram recolhidas amostras de favos de criação a partir de 26 de fevereiro de 2021, pois verificou-se que a abelha-rainha tinha morrido, e a colónia não tinha criação à data.

Tabela 1. Resultados da pesquisa de *Varroa destructor*.

DATA DE RECOLHA	TIPO DE AMOSTRA		AMICEL			APITRAZ			APIVAR			CONTROLO			
			1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
19 NOVEMBRO 2020	ABELHAS	<i>V. DESTRUCTOR</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		<i>APIS MELLIFERA</i>	106	153	127	56	141	108	132	144	161	136	102	52	
	FAVO	C. INFESTADAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		CRIAS	333	143	101	284	231	106	102	263	201	284	183	164	
26 FEVEREIRO 2021	ABELHAS	<i>V. DESTRUCTOR</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		<i>APIS MELLIFERA</i>	87	149	120	218	244	77	122	132	204	291	88		
	FAVO	C. INFESTADAS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		CRIAS	222	192	273	253	274	296	228	260	150	209	231		
15 MARÇO 2021	ABELHAS	<i>V. DESTRUCTOR</i>	/	/	/	0	0	0	0	0	0	0	0		
		<i>APIS MELLIFERA</i>	/	/	/	120	94	120	99	104	152	200	117		
	FAVO	C. INFESTADAS	/	/	/	0	0	0	0	0	0	0	0		
		CRIAS	/	/	/	250	216	291	273	179	263	259	361		
27 DE MARÇO 2021	ABELHAS	<i>V. DESTRUCTOR</i>	0	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/		
		<i>APIS MELLIFERA</i>	103	125	165	/	/	/	/	/	/	/	/		
	FAVO	C. INFESTADAS	0	0	0	/	/	/	/	/	/	/	/		
		CRIAS	137	230	127	/	/	/	/	/	/	/	/		

3.4 Discussão

Os resultados obtidos na análise das amostras não permitem tirar conclusões. Não é possível comparar a redução do nível de *V. destructor* antes e após a aplicação das diferentes apresentações farmacológicas.

No desenho deste estudo foram cometidos alguns lapsos que prejudicaram possibilidade de tirar conclusões, de acordo com o objetivo do trabalho. Existiram alguns fatores que não puderam ser controlados. A APIMIL, não sendo detentora de colmeias em nome da associação, teve que utilizar as de um apicultor associado e, por esta razão, as atividades do estudo tiveram que ser realizadas mediante a boa-vontade, disponibilidade e ritmo de trabalho do detentor das colmeias. Por conseguinte, o número de colónias utilizadas, assim como a sua localização foi condicionada. A presença de um grupo de controlo afastado dos grupos de tratamento não se verificou, como seria ideal para evitar a contaminação por derivação de abelhas (Dietemann et al., 2013). Teria sido possível colocar o grupo de controlo noutra extremidade do apiário, no entanto, seria efetuado na mesma um tratamento contra a varroose nas colónias adjacentes, pelo que o problema da contaminação se manteria.

O número de colónias de estudo por tratamento foi insuficiente. Em apicultura, idealmente são necessárias 30 observações independentes por tratamento (Pirk et al., 2013) Este foi um dos fatores que não foi possível controlar, dadas as condições em que o estudo foi efetuado.

O grau de parentesco das abelhas-rainha ou idade não foi controlado. Apesar de o apicultor ir repondo as abelhas-rainha com descendentes criadas nos seus apiários, este grau de parentesco entre as rainhas das colónias de estudo, nem a idade, podem ser assegurados (Dietemann et al., 2013).

A quantidade de criação inicial das colónias deve ser medida com mais rigor, e deve ser também calculada e equalizada a proporção de criação operculada e não operculada. Para além disto, outros parâmetros da “força” das colónias devem ser medidos para assegurar que estas sejam homogêneas no início do trabalho experimental, tais como o número da população de abelhas adultas e o número de células com reservas de mel e pólen (Delaplane et al., 2013). Neste trabalho, a população inicial de abelhas, criação operculada, assim como as reservas de pólen e mel foram tidas em conta. No entanto, a sua medição foi feita por inspeção visual e, embora exista um elevado grau de experiência por quem o fez, são métodos pouco objetivos, que devem ser realizados com mais rigor num próximo trabalho. Como já foi referido no subcapítulo 1.3., *V. destructor* reproduz-se dentro das células de crias, logo há uma dependência entre o número de células de criação

e a reprodução do ácaro (DGAV, 2020). Para além disto, o tamanho da população de abelhas pode influenciar a dispersão do amitraz e, conseqüentemente, a eficácia do tratamento (Gracia et al., 2017). Daí a necessidade de medir estes parâmetros com rigor.

Na testagem da eficácia de fármacos no campo, a utilização de estrados sanitários para contar o número de ácaros que caem mortos é uma ferramenta crucial (Dietemann et al., 2013). Quando a população de *V. destructor* da colónia é inferior a 100 indivíduos, os ácaros podem não ser detetados nas amostras de abelhas e criação, pelo que o único método de estimar a sua mortalidade é pela contagem de ácaros que caem nos estrados sanitários, e este número correlaciona-se bem com o número da população existente na colónia (Gregorc, 2019). Não foram realizadas contagens de ácaros caídos nos estrados sanitários no início – no período de pré-tratamento, para estabelecer um número de ácaros iniciais - nem ao longo do trabalho, por lapso no desenho experimental, pois as colmeias utilizadas incluem estrados (Dietemann et al., 2013). Um baixo nível de infestação inicial pode explicar a ausência de *V. destructor* nas amostras recolhidas antes do tratamento de outono, e, por conseguinte, nas seguintes amostras. A ausência de varroas no grupo de controlo faz suspeitar de que a infestação inicial seria muito baixa. Para além dos erros cometidos na recolha de amostras, explicados a seguir, poderá ser esta uma das causas da ausência do ácaro.

As colmeias usadas neste trabalho experimental estavam inseridas num apiário com mais colmeias. Para evitar o risco de re-infestação todo o apiário deveria ter sido tratado no mesmo dia (Greatti et al., 1992). No entanto, isso não foi possível, pois a carga de trabalhos era muita – colmeias do apiário foram tratadas durante a mesma semana, aproximadamente. Nos trabalhos futuros este fator tem de ser levado em conta, especialmente em alturas do ano em que a quantidade de néctar e pólen na natureza é reduzida e, por isso, o comportamento de pilhagem entre colónias é mais frequente (Messan et al., 2017). Também terá de ser levada em conta a proximidade a outros apiários, pois o fenómeno de re-infestação entre apiários também ocorre, especialmente através dos zângãos (Currie & Jay, 1991). Para minimizar o fenómeno de derivação por desorientação entre colmeias dever-se-ia ter colocado marcos nas frentes das colmeias (pedras, ramos de árvores) que permitissem as abelhas orientarem-se melhor. O arranjo linear das colmeias também não é bom para o objetivo deste trabalho, pois existe a tendência de acumulação de abelhas no fim das filas. O arranjo circular das colmeias seria uma alternativa (Delaplane et al., 2013).

Na recolha de amostras ocorreram também alguns erros. O número de abelhas recolhidas foi pequeno, e, embora tenham sido recolhidas mais abelhas que o objetivo (50), em nenhuma das amostras se conseguiu recolher 300, que seria o número indicado para

a técnica de determinação do nível de infestação de *V. destructor*. As abelhas foram recolhidas na tampa na colmeia ou na zona da rampa de entrada, e deveriam ter sido recolhidas sobre os favos de criação não operculados (Dietemann et al., 2013). Logo após emergirem da célula de criação, agarradas à abelha recém-emergida, as fêmeas de *V. destructor* transferem-se preferencialmente para as abelhas-ama, as quais se encontram sobre os favos a cuidar da criação, e entram nas células momentos antes de estas serem operculadas (Kuenen & Calderone, 1997). Isto é, provavelmente, um mecanismo de *V. destructor* para aumentar o seu sucesso reprodutivo (Rosenkranz et al., 2010). Sendo assim, faria sentido recolher as abelhas diretamente sobre favos com criação não operculada, existe o risco acrescido de se recolher a rainha por acidente. Este erro deveu-se ao mau planeamento inicial do trabalho, e poderá ter sido o fator que mais influencia teve no facto de não se ter encontrado varroas nas amostras de abelhas adultas. Quanto às amostras de favos, é aconselhado a recolha de pelo menos 200 células de criação operculadas, de diferentes localizações (Dietemann et al., 2013). Na maioria das amostras de criação este número foi obtido, tal como está detalhado na tabela 1, no entanto, foi recolhido um favo de um único local. O reduzido número de abelhas adultas recolhidas e o *timing* de recolha (explicado em baixo) poderão também ter influenciado os resultados.

O amitraz tem ainda uma eficácia satisfatória, já demonstrada, a baixar os níveis de *V. destructor*, apesar de se registarem algumas resistências a esta substância ativa (Lorisa et al., 2001; Rinkevich, 2020; Rosenkranz et al., 2010; Semkiw et al., 2013). As farmacêuticas dos fármacos usados neste trabalho reportam eficácia superior a 95% nos seus produtos, o que, sendo verídico, os torna eficazes contra a varroa (Dietemann et al., 2013). No caso do apiário em questão, o tratamento do ano anterior foi feito com timol e ácido fórmico. As populações de ácaros de *V. destructor* que nunca estiveram em contacto com fármacos químicos (em apicultura em modo biológico, por exemplo) parecem ser mais suscetíveis a estes, pois não sofreram o efeito de pressão de seleção após vários tratamentos consecutivos com a mesma substância ativa de origem química (Almecija et al., 2020). Pode-se suspeitar que as populações de *V. destructor* fossem mais suscetíveis ao amitraz, e que por esta razão, a população dos ácaros ser bastante reduzida após os tratamentos deste trabalho experimental, ao ponto de a probabilidade de encontrar ácaros nas amostras ser baixa.

O *timing* de recolha de amostras não foi o mais correto. Segundo os dados das farmacêuticas, a grande parte de *V. destructor* morre nas primeiras duas semanas de tratamento. Para além disto, outros trabalhos reportam resultados semelhantes, com uma grande maioria dos ácaros a morrerem nas primeiras três semanas de um período de tratamento de oito semanas (Lorisa et al., 2001; Semkiw et al., 2013). Por esta razão, de

forma a melhor perceber a dinâmica da redução da população de *V. destructor*, teria sido útil a recolha de amostras entre as duas e três semanas após a primeira aplicação dos fármacos. Às oito semanas de tratamento – admitindo a hipótese de que as populações de *V. destructor* das colónias deste trabalho são suscetíveis ao amitraz - o número de ácaros já seria bastante reduzido, pelo que a probabilidade de encontrar varroas nas amostras recolhidas poderia ser reduzida - poderá ser uma das razões da ausência de varroa nas amostras recolhidas após o primeiro tratamento. Ausência de ácaros nas amostras recolhidas após o segundo tratamento poderá também estar relacionada com o facto de a população de ácaros ser reduzida – devido ao tratamento e ao facto de ser ainda o início da primavera, quando a população de varroa é pequena.

A colónia CONTROLO 3 encontrava-se sem abelha-rainha, pelo que não tinha criação à data da recolha de amostras. Não foi possível determinar a razão da morte da abelha-rainha. Pode-se suspeitar, baseado na experiência do apicultor, que o manuseio dos quadros e colocação das tiras podem ter causado danos físicos à rainha, como esmagamento, e serem a causa de morte. A perda da colónia pode ter-se devido também à dificuldade em aguentar o inverno, embora a varroose como causa pareça pouco provável pois durante a recolha de amostras em novembro não foram verificados fatores de alarme que fizessem prever tal desfecho.

A determinação dos resíduos de amitraz em cera virgem e respetivas reservas de mel não foi realizada, pois as abelhas construíram favos de criação de zângão nesses quadros, contrariamente ao pretendido. Poder-se-ia ter efetuado mesmo assim a análise dos resíduos na cera, mas devido à carga de outros trabalhos no apiário, e com a aproximação da época de enxameação, esta não foi realizada.

4. CONCLUSÃO

No trabalho experimental não foram obtidos resultados que possibilitassem tirar conclusões, tendo em conta o objetivo. No entanto, foi possível aprender, ganhar a experiência e conhecimento quanto ao desenho de um trabalho de eficácia de fármacos em apicultura. Segundo o que foi discutido no subcapítulo anterior, as principais explicações para os resultados obtidos no estudo de eficácia poderão ser: uma população inicial de *V. destructor* muito reduzida, a qual deveria ter sido calculada no início; recolha de amostras de abelhas adultas de forma errada; a recolha células de criação da mesma localização, não atendendo à sua dispersão espacial; *timing* de recolha pouco correto, principalmente após o primeiro tratamento; suscetibilidade da população de *V. destructor* do apiário ao amitraz, resultando numa redução de varroa para níveis muito baixos (logo uma probabilidade ainda menor de a encontrar nas amostras); número reduzido de colónias por tratamento. Para além disto, outros parâmetros do desenho experimental, nomeadamente a localização e disposição no apiário, não foram corretos. Estes últimos parâmetros não terão influenciado o trabalho porque não foram obtidos os resultados, mas foram abordados na discussão de modo a se compreender as implicações que poderiam vir a ter num estudo deste tipo.

As abelhas têm vindo a sofrer um declínio populacional preocupante nas últimas décadas. Não existe uma única causa definitiva, múltiplas causas para este declínio têm sido apontadas, maioritariamente fruto da atividade humana (Brown & Paxton, 2009; Potts et al., 2010). As perdas recentes de colónias na Europa, e no resto do mundo, parecem estar relacionadas, em grande parte, com a mudança de hospedeiro de *V. destructor*, para a *A. mellifera*. No entanto, é importante salientar que vários fatores estão envolvidos e atuam de forma sinérgica (Rosenkranz et al., 2010). O parasita *V. destructor* espalhou-se por quase todo o globo e tem vindo a causar danos na saúde das colónias. *V. destructor* não é apenas uma ameaça à apicultura, mas também aos polinizadores selvagens. A sua chegada à Europa e América do Norte causou uma alta mortalidade nas colónias de *A. mellifera*, sobrevivendo em maior grau as colónias de apicultura. As colónias selvagens, por não terem mecanismos de defesa e não serem tratadas, ficaram mais vulneráveis a *V. destructor*, logo a mortalidade nestas foi muito superior. Para além disto, alguns vírus típicos das abelhas melíferas podem infetar múltiplas espécies de polinizadores selvagens, muito para além do género *Apis*. Um exemplo é o Vírus das Asas Deformadas, o qual está também bastante associado à varroose (Potts et al., 2016).

Os esforços de conservação de *A. mellifera*, uma espécie polinizadora de grande importância, e as outras espécies selvagens com as quais possa contactar, passa por

estudar e conhecer uma das grandes ameaças à sua sobrevivência: *V. destructor* (Potts et al., 2016). O tratamento preventivo da varroose é obrigatório devido à alta patogenicidade de *V. destructor*, o qual após a infestação inicial se reproduz e difunde rapidamente (Semkiw et al., 2013). Os fármacos acaricidas podem ter efeitos tóxicos nas abelhas, acumular-se na colmeia e ambiente, e a sua utilização indevida pode propiciar o aparecimento de resistências, deixando as abelhas mais vulneráveis a *V. destructor*. Sendo assim, é importante fazer-se um uso prudente destes fármacos (Gregorc, 2019). Como existem vários fatores que podem influenciar a eficácia dos tratamentos contra a varroose, é pertinente realizar estudos de eficácia em vários apiários, em diferentes partes do globo e sob diferentes condições climáticas (Gracia et al., 2017). A motivação de realizar este estudo experimental e da escrita deste relatório adveio dos factos enunciados neste parágrafo. A medicina veterinária pode ter um papel crucial no crescimento do setor apícola numa direção cada vez mais sustentável, de modo a salvaguardar não só a saúde das abelhas, mas também de todo o ecossistema.

O parasita *V. destructor* pode exacerbar os problemas de polinização do futuro (Rosenkranz et al., 2010). É preciso atuar para reverter a tendência de declínio dos polinizadores, e para tal são necessários esforços de vários setores. Os apicultores são os vigilantes ativos da natureza, e normalmente os primeiros a perceber alterações agudas na saúde das populações de abelhas. A ciência e estudo dos fatores de stress e ameaças aos polinizadores são essenciais, tanto para encontrar medidas de conservação, como para melhor aconselhar na formulação de políticas baseadas na avaliação de risco. As decisões políticas quanto ao uso do território e pesticidas devem ter em conta a conservação das abelhas - as abelhas são essenciais para um planeta saudável (Brown & Paxton, 2009; Potts et al., 2010, 2016).

REFERÊNCIAS

- Almecija, G., Poirot, B., Cochard, P., & Suppo, C. (2020). Inventory of Varroa destructor susceptibility to amitraz and tau-fluvalinate in France. *Experimental and Applied Acarology*, 82(1).
- Anderson, D. L., & Trueman, J. W. H. (2000). Varroa jacobsoni (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*, 24(3).
- Annoscia, D., Del Piccolo, F., & Nazzi, F. (2012). How does the mite Varroa destructor kill the honeybee Apis mellifera? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees. *Journal of Insect Physiology*, 58(12).
- Bogdanov, S., Kilchenmann, V., & Imdorf, A. (1998). Acaricide residues in some bee products. *Journal of Apicultural Research*, 37(2).
- Brown, M. J. F., & Paxton, R. J. (2009). The conservation of bees: A global perspective. *Apidologie*, 40(3).
- Byrne, A., & Fitzpatrick, Ú. (2009). Bee conservation policy at the global, regional and national levels. *Apidologie*, 40(3).
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58.
- Colin, M. E., Vandame, R., Jourdan, P., & Di Pasquale, S. (1997). Fluvalinate resistance of Varroa jacobsoni Oudemans (Acari: Varroidae) in Mediterranean apiaries of France. *Apidologie*, 28(6).
- Currie, R. W., & Jay, S. C. (1991). Drifting behaviour of drone honey bees (Apis mellifera L.) in commercial apiaries. *Journal of Apicultural Research*, 30(2).
- Dai, P., Jack, C. J., Mortensen, A. N., Bustamante, T. A., & Ellis, J. D. (2018). Chronic toxicity of amitraz, coumaphos and fluvalinate to Apis mellifera L. larvae reared in vitro. *Scientific Reports*, 8(1).

- Dainat, B., Dietemann, V., Imdorf, A., & Charrière, J. D. (2020). A scientific note on the 'Liebefeld Method' to estimate honey bee colony strength: its history, use, and translation. *Apidologie*, 51(3).
- De La Rúa, P., Jaffé, R., Dall'Olio, R., Muñoz, I., & Serrano, J. (2009). Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*, 40(3).
- Delaplane, K. S., Van Der Steen, J., & Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of *Apis mellifera* colonies. *Journal of Apicultural Research*, 52(1).
- Dietemann, V., Beaufort, A., Page, P., Yañez, O., Buawangpong, N., Chantawannakul, P., & Neumann, P. (2019). Population genetics of ectoparasitic mites *Varroa* spp. in Eastern and Western honey bees. *Parasitology*, 146(11).
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D. L., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., & Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1).
- Dietemann, V., Pflugfelder, J., Anderson, D., Charrière, J. D., Chejanovsky, N., Dainat, B., De Miranda, J., Delaplane, K., Dillier, F. X., Fuch, S., Gallmann, P., Gauthier, L., Imdorf, A., Koeniger, N., Kralj, J., Meikle, W., Pettis, J., Rosenkranz, P., Sammataro, D., Neumann, P. (2012). *Varroa destructor*: Research avenues towards sustainable control. *Journal of Apicultural Research*, 51(1).
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV] (2019), Doenças das abelhas - Lista de Medicamentos de Uso Veterinário Autorizado para Abelhas. Consultado em: <https://www.dgav.pt/animais/conteudo/animais-de-producao/abelhas/saude-animal/doencas-das-abelhas/>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV] (2020), MedVet - Amicel Varroa solução para tiras para colmeias. Consultado em: <https://medvet.dgav.pt/products/1197-01-18rfvpt-amicel-varroa-solucao-para-tiras-para-colmeia-3683>
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV] (2018), MedVet - Apitraz 500mg tiras

para colmeias de abelhas. Consultado em https://medvet.dgav.pt/products/667-01-13dfvpt-apitraz-500-mg-tiras-para-colmeias-de-abelhas-9949?titular_id=627&categ_id=3

Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV] (2020), MedVet – Apivar 500 mg,tiras parasitárias para abelhas melíferas. Consultado em: <https://medvet.dgav.pt/products/apivar-500-mg-tiras-antiparasitarias-para-abelhas-meliferas-3613>

Direção Geral de Alimentação e Veterinária [DGAV] (2020). Plano de luta contra a varroose. *Programa Apícola 2020*.

Döke, M. A., Frazier, M., & Grozinger, C. M. (2015). Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science*, 10.

Gatien, P., & Currie, R. (2003). Timing of acaricide treatments for control of low-level populations. *Canadian Entomologist*.

Giacobino, A., Molineri, A., Bulacio Cagnolo, N., Merke, J., Orellano, E., Bertozzi, E., Masciangelo, G., Pietronave, H., Pacini, A., Salto, C., & Signorini, M. (2016). Key management practices to prevent high infestation levels of *Varroa destructor* in honey bee colonies at the beginning of the honey yield season. *Preventive Veterinary Medicine*, 131.

Gracia, M. J., Moreno, C., Ferrer, M., Sanz, A., Peribáñez, M. Á., & Estrada, R. (2017). Field efficacy of acaricides against *Varroa destructor*. *PLoS ONE*, 12(2).

Greatti, M., Milani, N., & Nazzi, F. (1992). Reinfestation of an acaricide-treated apiary by *Varroa jacobsoni* Oud. *Experimental and Applied Acarology*, 16(4).

Gregorc, A. (2019). Diagnosis of *Varroa Mite* (*Varroa destructor*) and Sustainable Control in Honey Bee (*Apis mellifera*) Colonies—A Review. *MDPI, diversity*.

Johnson, B. R. (2010). Division of labor in honeybees: Form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 64(3).

- Kamler, M., Nesvorna, M., Stara, J., Erban, T., & Hubert, J. (2016). Comparison of tau-fluvalinate, acrinathrin, and amitraz effects on susceptible and resistant populations of *Varroa destructor* in a vial test. *Experimental and Applied Acarology*, 69(1).
- Imdorf, A., Buehlmann, G., Gerig, L., Kilchenmann, V., Wille, H. (1987) "Überprüfung der Schätz Methode zur Ermittlung der Brutfläche und der Anzahl Arbeiterinnen in freifliegenden Bienenvölkern" *Apidologie* 18 (2).
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., & Bogdanov, S. (2003). Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. *Analytica Chimica Acta*, 475(1–2).
- Korta, E., Bakkali, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., Kilchenmann, V., & Bogdanov, S. (2001). Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(12).
- Kuenen, L. P. S., & Calderone, N. W. (1997). Transfers of *Varroa* mites from newly emerged bees: Preferences for age- and function-specific adult bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior*, 10(2).
- Lodesani, M., Costa, C., Serra, G., Colombo, R., & Sabatini, A. G. (2008). Acaricide residues in beeswax after conversion to organic beekeeping methods. *Apidologie*, 39(3).
- Lorisa, I. F., Attaa, A. S., Araub, V. L. G., Elisb, M. M., Abrasb, P. C., & Loulc, N. A. (2001). Effectiveness, persistence, and residue of amitraz plastic strips in the apiary control of *Varroa destructor*. *Apidologie*, 32, 577–585.
- Martin, S. (1998). A population model for the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Ecological Modelling*, 109(3).
- Messan, K., DeGrandi-Hoffman, G., Castillo-Chavez, C., & Kang, Y. (2017). Migration Effects on Population Dynamics of the Honeybee-mite Interactions. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 12(2).

- Milani, N. (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud to pyrethroids: a laboratory assay. *Apidologie*, 26(5).
- Norain Sajid, Z., Aziz, M. A., Bodlah, I., Rana, R. M., Ghramh, H. A., & Khan, K. A. (2020). Efficacy assessment of soft and hard acaricides against *Varroa destructor* mite infesting honey bee (*Apis mellifera*) colonies, through sugar roll method. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(1).
- Pirk, C. W. W., De Miranda, J. R., Kramer, M., Murray, T. E., Nazzi, F., Shutler, D., Van Der Steen, J. J. M., & Van Dooremalen, C. (2013). Statistical guidelines for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4).
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., & Kunin, W. E. (2010). Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6).
- Potts, S. G., Imperatriz-Fonseca, V., Ngo, H. T., Aizen, M. A., Biesmeijer, J. C., Breeze, T. D., Dicks, L. V., Garibaldi, L. A., Hill, R., Settele, J., & Vanbergen, A. J. (2016). Safeguarding pollinators and their values to human well-being. *Nature*, 540(7632).
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & Van Engelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(5).
- Rinkevich, F. D. (2020). Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the *Varroa* Mite, *Varroa destructor*, within commercial beekeeping operations. *PLoS ONE*, 15(1).
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1).
- Sara, C., Mar, Ó., Calatayud, F., Momp, A., Segura, I., Sim, E., & Gonz, J. (2021). Large-Scale Monitoring of Resistance to Coumaphos, Amitraz and Pyrethroids in *Varroa destructor*. *MDPI, insects*

Semkiw, P., Skubida, P., & Pohorecka, K. (2013). The amitraz strips efficacy in control of varroa destructor after many years application of amitraz in apiaries. *Journal of Apicultural Science*, 57(1).

Universidade Trás-os-Montes e Alto-Douro (UTAD), Instituto Politécnico de Bragança, Universidade de Évora (2006) Eficácia Atual do Apistan e do Apivar na luta contra a varroose em Portugal, Relatório Final, *Programa Apícola 2006*.

van Dooremalen, C., Gerritsen, L., Cornelissen, B., van der Steen, J. J. M., van Langevelde, F., & Blacquièrre, T. (2012). Winter survival of individual honey bees and honey bee colonies depends on level of varroa destructor infestation. *PLoS ONE*, 7(4).

Wallner, K. (1999). Varroacides and their residues in bee products. *Apidologie*, 30(2–3), 235–248.

Wegener, J., Ruhnke, H., Scheller, K., Mispagel, S., Knollmann, U., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2016). Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of Insect Physiology*, 91–92.

Wilkinson, D., & Smith, G. C. (2002). A model of the mite parasite, Varroa destructor, on honeybees (*Apis mellifera*) to investigate parameters important to mite population growth. *Ecological Modelling*, 148(3).

Winfrey, R. (2010). The conservation and restoration of wild bees. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195.

World Organization for Animal Health [OIE] (2018). Varroosis of honey bees (infestation of honey bees with *Varroa spp.*). *Terrestrial Manual*

Wu, J. Y., Anelli, C. M., & Sheppard, W. S. (2011). Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE*, 6(2).

ANEXO A – Atividades realizadas em apicultura

Durante este estágio curricular tive a oportunidade de desenvolver este pequeno de estudo de eficácia de fármacos usados contra a varroose. Participei em todas as fases da realização do trabalho experimental, desde a aplicação dos fármacos, à recolha de amostras e posterior análise. Este trabalho foi um trabalho de equipa realizado por mim, pelo técnico da APIMIL, o Samuel, pelo Dr. Mário Armada, e pelo apicultor, sendo que as tarefas de recolha de amostras exigem sempre a presença de mais do que uma pessoa. A análise de amostras foi realizada por mim, no laboratório do ICBAS, de modo a ter as ferramentas essenciais (lupa) para efetuar a técnica de contagem das varroas com o maior rigor possível.

Para além do trabalho experimental, realizei atividades apícolas em conjunto com o apicultor. Esta parte do estágio foi essencial, pois eu não tinha conhecimentos anteriores na prática de apicultura, e permitiu-me perceber todo o restante trabalho experimental e obter conhecimentos para trabalhos futuros na área da apicultura. Acompanhei e participei em todo o maneio efetuado em dois apiários que albergam cerca de 80 a 100 colónias cada. Em conjunto com o apicultor, e o Dr. Mário Armada, realizamos os tratamentos anti-varroa, aplicação de alimentação suplementar, o maneio de colónias órfãs (através da introdução de quadros com postura do dia de outras colónias, introdução de células reais, e introdução de recortes de favos com postura do dia de outras colónia), técnicas de multiplicação de colónias (desdobramentos, desdobramentos para dois núcleos), trocas de ceras, técnicas de troca de rainha e produção de novas rainhas (colocação de grades excluidoras, técnica de *picking* de larvas com 3 dias, incubação artificial de alvéolos reais, transferência de rainhas recém-emergidas). Acompanhamos também estas colónias ao longo destes processos e verificámos a sua evolução, e fizemos também inspeções visuais periódicas para averiguar o estado das colónias de ambos os apiários (para deteção de anomalias, como a falta de rainha, indícios de presença de doenças, como a varroose ou nosemose, desenvolvimento da colónia). Importa salientar que as colónias pertenciam a um apicultor que têm como profissão a atividade apícola, pelo que o maneio em situações mais sensíveis para a colónia, como o manuseamento de rainhas, era efetuado na totalidade pelo apicultor. Em baixo estão algumas fotografias de algumas atividades realizadas, sendo que nem sempre a captação de fotografias durante os trabalhos foi fácil e/ou possível.



Figura 6. Introdução de alvéolo real numa colónia órfã.



Figura 7. Tiras de fármaco (Amicel®) na colmeia.



Figura 8. Amostra de favo de criação (no campo).



Figura 9. Preparação de alimentação suplementar.



Figura 10. Cortes num quadro de colónia órfã para a inserção porções de favos com postura do dia de outra colónia.



Figura 12. Verificação dos níveis de *V. destructor* nas crias de zângãos.



Figura 11. Quadro de uma colónia forte.



Figura 13. Recolha de amostras de favo de criação.

ANEXO B – Técnicas de determinação da taxa de infestação em abelhas adultas e criação

Taxa de infestação nas abelhas adultas – Técnica de lavagem com água com sabão (Dietemann et al., 2013):

1. Num frasco com cerca de 300 abelhas adultas adicionar água com algumas gotas de sabão até o volume de água cobrir as abelhas.
2. Agitar o frasco durante 20 segundos, no mínimo, para desalojar os ácaros de *V. destructor* das abelhas.
3. Passar o conteúdo do frasco por um crivo (abertura da malha de 3-4mm) de modo a reter todas as abelhas. O conteúdo (o líquido) deve ser recolhido nouro recipiente.
4. Verificar se ficou alguma varroa nas paredes do primeiro frasco.
5. Passar o líquido (água com sabão) por um segundo crivo (abertura da malha inferior a 0,5mm).
6. Contar o número de ácaros presos no segundo crivo.
7. Contar o número total de abelhas adultas da amostra.
8. Proceder ao cálculo da taxa de infestação (dividir o número de ácaros encontrados pelo número de abelhas adultas, e multiplicar por 100).

Taxa de infestação na criação (Dietemann et al., 2013):

1. Recolher cerca de 200 células de criação operculadas. Recolher de diferentes localizações é vantajoso pois tem em conta a distribuição espacial irregular da varroa.
2. Desopercular as células e verificar a infestação por varroa (visualização do ácaro ou dos dejetos – material branco com aparência de borracha no fundo das células).
3. Contar o número total de células desoperculadas e número de células infestadas.
4. Dividir o número de células infestadas pelo número total de células desoperculadas para obter a proporção de células infestadas.
5. Multiplicar o valor obtido no ponto anterior por 100 para obter a taxa de infestação da criação em ácaros por cada 100 células.



Figura 14. Contagem de varroas em amostras de abelhas adultas.



Figura 16. Amostra de favo de criação congelado.



Figura 15. Contagem de varroas em amostras de criação.

ANEXO C – Medição dos parâmetros de força de uma colónia

Medição da quantidade de criação:

Pode ser feita através da utilização de grelhas com divisões em cm^2 . Estas grelhas são postas sobre as zonas de criação e visualmente conta-se a área ocupada com criação. A área de criação pode ser convertida em número de células de criação através da multiplicação da área contada pelo número médio de células em cada cm^2 (este valor difere de acordo com a geografia e a genética das abelhas). Por exemplo, na Europa, numa colmeia do tipo Langstroth, existem cerca de 4 células de criação de obreira por cm^2 (Delaplane et al., 2013).

Medição da quantidade de abelhas adultas:

Pode ser feita através de um método semelhante ao da contagem de números de células de criação (utilizando grelhas). Sabendo a densidade de abelhas por área (cm^2), pode-se fazer uma estimativa, até visual, do número de abelhas adultas numa colónia. Estes valores também variam de acordo com o tipo de colmeia e a subespécie de abelha, e estão discriminados para diferentes regiões e diferentes tipos de colmeias no trabalho de Deplane et al. (2013).

Método de Liebefeld:

Este método permite uma estimativa visual do tamanho da colónia, tanto o número de abelhas adultas como de criação. Utilizando valores já estipulados do número de abelhas/criação por dm^2 , consegue-se fazer-se esta estimativa, com precisão, dependendo da experiência de quem a for realizar (Dainat et al., 2020). Segundo este método, contam-se as superfícies dos quadros preenchidos com abelhas, tendo em conta dispersão das abelhas (se estão aglomeradas e cobrem todo o quadro; se estão dispersas calcula-se que proporção do quadro estaria coberta se as abelhas estivessem aglomeradas – meio, um quarto) e multiplica-se pelo valor estipulado para o tipo de colmeia (Imdorf et al., 1987). Na tabela 2 estão especificados alguns valores estipulados para a medição da força da colónia em diferentes tipos de colmeias.

Tabela 2. Valores de referência para calcular o número de população de obreiras adultas nos quadros de diferentes tipos de colmeias. Retirado e adaptado de Dainat et al.(2020).

Tipo de Quadro	Área (dm ²) por face de um quadro do ninho	Área (dm ²) por face de um quadro de meia-alça de mel	Número de obreiras por face de um quadro de ninho
Colmeia "Suiça"	8,5	4	1200
Colmeia Dadant	11	5,5	1400
Colmeia standard alemã	7	7	900
Colmeia Langstroth	8,5	4,5	1100

Este método (e os supramencionados) deve ser realizado a cada três semanas, que é o período de desenvolvimento das obreiras, e deve ser calibrado de acordo com o tipo de colmeia usada (Dainat et al., 2020). É um método que exige alguma experiência na realização. O artigo traduzido para inglês pode ser consultado em: <https://zenodo.org/record/3341580#.YPsmXo5Kjb0>.