

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Estudo Sanitário de um Apiário da Região Centro Portugal - identificação,
monitorização e controlo dos principais agentes etiológicos.

Dinis António Dias da Silva

ORIENTADOR(A):

Dra. Maria José Lisboa Valério da Silva

COORIENTADOR(A):

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Estudo Sanitário de um Apiário da Região Centro Portugal - identificação,
monitorização e controlo dos principais agentes etiológicos.

Dinis António Dias da Silva

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor José Augusto Farraia e Silva
Meireles

VOGAIS:

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz
Dra. Maria José Lisboa Valério da Silva

ORIENTADOR(A):

Dra. Maria José Lisboa Valério da Silva

COORIENTADOR(A):

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2021

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Dinis António Dias da Silva

Título da Tese ou Dissertação: Estudo Sanitário de um Apiário da Região Centro Portugal – identificação, monitorização e controlo dos principais agentes etiológicos.

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento:

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- ~~É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.~~
- ~~DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.~~

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 17 de fevereiro de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:

Dinis António Dias da Silva

Agradecimentos

Primeiro que tudo tenho de agradecer aos meus pais por todo o apoio incondicional e motivação que me deram desde o primeiro ano de estudante até ao último, sem eles não teria sido possível chegar até aqui.

Obrigado ao meu irmão David, que apesar da distância sempre me ajudou em tudo o que precisei, incentivando-me a ser cada vez melhor.

Obrigado Rita, por me apoiares nas minhas decisões, por me teres acompanhado nestes últimos anos e espero que me possas acompanhar agora também na minha vida profissional.

Agradeço também à Professora Doutora Isabel Fonseca, pela excelente profissional que tive a oportunidade de conhecer. Muito obrigado por toda a orientação, disponibilidade, incentivo e conhecimentos que me facultou durante todo o processo quer de estágio quer de escrita da dissertação. Sem a sua ajuda incansável não teria sido possível terminar este percurso.

Agradeço também à Doutora Maria José Valério por todos os conselhos e conhecimentos que me transmitiu durante todo o estágio e até hoje. Muito obrigado pela sua disponibilidade e ajuda. Foi um privilégio conhecê-la.

Agradeço à FMV por todas as vivências que me proporcionou e por todas as amizades que construí enquanto estudante. Quero agradecer também ao INIAV por ter disponibilizado todo o material necessário à realização deste trabalho.

Por fim, quero agradecer aos meus amigos que me acompanharam neste percurso, pelos grandes momentos passados, noitadas de estudo e convívio. Foram anos incríveis.

Resumo

O conhecimento do estado sanitário das colmeias e dos apiários é uma ferramenta chave para o apicultor obter uma redução na mortalidade anual e consequentemente um aumento do sucesso da exploração apícola. Os objetivos deste trabalho basearam-se na realização de 3 estudos sanitários num apiário da região centro de Portugal, durante a época de maior mortalidade (início do outono, inverno e início da primavera) de forma a obter informação sobre o real estado sanitário das colmeias, pesquisando os principais agentes etiológicos no território nacional: a) *Varroa destructor*; b) *Nosema* spp.; c) *Ascospira apis*; d) *Senotainia tricuspis* e e) *Paenibacillus larvae*. No decurso deste estudo fez-se a aplicação de 4 acaricidas homologados contra a varroose (Apivar®, Thymovar®, Apilife-Var® e Apiguard®) de forma a comparar a sua eficácia. Para tal, foram utilizadas 20 colmeias, criadas na primavera que antecedeu o início do estudo, sujeitas ao mesmo manejo e provenientes da mesma colónia-mãe de forma a reduzir possíveis fatores causadores de erros. Após o segundo estudo sanitário foram criados 5 grupos para efetuar a aplicação e comparação dos métodos e controlo sendo que nos grupos 1 a 4 foram aplicados de acaricidas e o grupo 5 usado como grupo controlo.

No outono, observou-se que todas as colmeias estavam afetadas por *S. tricuspis* (média 12,12%) e que 60% continham *V. destructor*, com taxas de infestação médias inferiores a 1. No inverno, o único parasita encontrado foi *V. destructor*, com 100% das colmeias afetadas e com taxas médias de infestação de 3,75% nas abelhas adultas e 8,6% nos favos de criação. No início da primavera, 15% das colmeias apresentavam *Nosema* spp. e 90% das colmeias *V. destructor*, sendo que os grupos (1 a 4) sujeitos à aplicação de métodos de controlo apresentaram uma infestação média por colmeia de 2,45% nas abelhas e de 3,22% nos favos. A avaliação da eficácia dos métodos de controlo contra a varroose mostrou que o Apilife-Var® foi o fármaco mais eficaz seguido do Apivar®, Thymovar® e do Apiguard®.

Palavras-chave: Abelha, Apicultura, *Senotainia tricuspis*, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., Portugal.

Abstract

The knowledge of the health status of hives and apiaries is a really important tool for the beekeeper in order to obtain a reduction in annual mortality and consequently an increase in the success of beekeeping. The objective of this work consisted in the realization of 3 health studies in an apiary in the central region of Portugal during the season of higher mortality (early Autumn, Winter, and early Spring) in order to obtain information on the real health status of the hives by researching the main etiological agents in the national territory: a) *Varroa destructor*; b) *Nosema* spp.; c) *Ascosfera apis*; d) *Senotainia tricuspis* and e) *Paenibacillus larvae*. During the course of this study, 4 approved acaricides against varroose (Apivar®, Thymovar®, Apilife-Var® and Apiguard®) were applied to compare their effectiveness. For this purpose, 20 hives were used, all of them created in the spring before the beginning of the study, subjected to the same management and descending from the same mother colony, in order to reduce possible factors that would cause evaluation errors. After the second health study, 5 groups were created to carry out the application and comparison of the control methods. From group 1 to 4 were applied acaricides and group 5 was used as a control group.

In autumn, it was observed that all hives were affected by *S. tricuspis* (average 12.12%) and that 60% contained *V. destructor*, with average infestation rates below 1%. In winter, the only parasite found was *V. destructor*, with 100% of hives affected and with an average infestation rates of 3.75% in adult bees and 8.6% in breeding combs. In early spring, 15% of hives had *Nosema* spp. and 90% of hives had *V. destructor*, being that groups (1 to 4) in which were applied varroa control methods having a mean hive infestation of 2.45% in adult bees and 3.22% in breeding combs. The evaluation of the effectiveness of control methods against varroosis showed that Apilife-Var® was the most effective drug followed by Apivar®, Thymovar® and Apiguard®.

Keywords: Bee, Beekeeping, *Senotainia tricuspis*, *Varroa destructor*, *Nosema* spp., Portugal

Índice

Parte I – Atividades Desenvolvidas no Estágio Curricular	1
Parte II – Revisão Bibliográfica	3
1. <i>Apis mellifera</i>	3
1.1. A abelha e a Apicultura	3
1.2. Biologia e Ciclo de Vida	3
1.3. Os produtos da Colmeia.....	6
2. As doenças da Colmeia	9
2.1. Varroose	9
2.1.1. Agente etiológico e distribuição geográfica	9
2.1.2. Morfologia de <i>Varroa destructor</i>	10
2.1.3. Biologia e ciclo de vida.....	11
2.1.4. Patogenicidade e sinais clínicos.....	14
2.1.5. Diagnóstico e Monitorização da taxa de infestação.....	15
2.1.6. Métodos de Controlo.....	17
2.1.7. Aplicação dos Métodos de Controlo.....	18
2.2. Nosemose.....	20
2.2.1. Agente etiológico e distribuição geográfica	20
2.2.2. Biologia e Ciclo de Vida	21
2.2.3. Patogenicidade e Sinais Clínicos	21
2.2.4. Diagnóstico	22
2.2.5. Métodos de controlo.....	22
2.3. Ascosferiose	23
2.3.1. Agente etiológico e distribuição geográfica	23
2.3.2. Biologia e ciclo de Vida	23
2.3.3. Patogenicidade e Sinais Clínicos	23
2.3.4. Métodos de Controlo.....	24
2.4. Senotainiose	24
2.4.1. Agente etiológico e distribuição geográfica	24

2.4.2.	Biologia e ciclo de Vida	25
2.4.3.	Métodos de Controlo.....	25
2.5.	Loque Americana	25
2.5.1.	Agente etiológico e distribuição geográfica	25
2.5.2.	Biologia e ciclo de vida.....	25
2.5.3.	Patogenia e Sinais Clínicos.....	26
2.5.4.	Diagnóstico e tratamento	26
1.	Objetivos	28
2.	Materiais e Métodos.....	28
2.1.	Descrição do apiário em estudo	28
2.2.	Critério de seleção das colmeias.....	29
2.3.	Estudo Sanitário.....	30
2.3.1.	Metodologia utilizada na recolha no campo:.....	30
2.3.2.	Análise laboratorial das amostras colhidas:.....	31
2.3.2.1.	Pesquisa de <i>V. destructor</i>	31
2.3.2.2.	Pesquisa de <i>N. ceranae</i>	32
2.3.2.3.	Pesquisa de <i>S. tricuspis</i>	32
2.3.2.4.	Pesquisa de <i>Ascosphaera apis</i>	33
2.3.2.5.	Pesquisa de <i>Paenibacillus larvae</i>	33
2.4.	Aplicação de 4 medicamentos utilizados como métodos de controlo da varroose	34
2.4.1.	Caracterização dos grupos de colmeias a incluir no ensaio dos 4 medicamentos contra a varroose	34
2.4.2.	Aplicação dos métodos de controlo.....	35
2.5.	Dados meteorológicos.....	36
3.	Resultados	36
3.1.	Estudos Sanitários	36
3.1.1.	Primeiro estudo sanitário.....	36
3.1.1.1.	Parâmetros meteorológicos	36
3.1.1.2.	Agentes patogénicos.....	36

3.1.2.	Segundo estudo sanitário.....	37
3.1.2.1.	Parâmetros meteorológicos	37
3.1.2.2.	Agentes patogénicos	38
3.1.3.	Terceiro estudo sanitário.....	38
3.1.3.1.	Parâmetros meteorológicos	38
3.1.3.2.	Agentes patogénicos	39
3.2.	Evolução dos agentes etiológicos das doenças apícolas ao longo dos 3 estudos sanitários.....	40
3.2.1.	Senotainiose	40
3.2.2.	Evolução da Nosemose	40
3.2.3.	Evolução de Loque Americana e Ascosferiose	40
3.2.4.	Evolução da Varroose.....	41
3.2.4.1.	Evolução de <i>V. destructor</i> nas amostras de abelhas adultas.....	41
3.2.4.2.	Evolução de <i>V. destructor</i> em favos de criação.....	42
3.3.	Avaliação da eficácia dos métodos de controlo contra a Varroose.....	43
3.3.1.	Grupo 1 – Aplicação de Apivar®:.....	43
3.3.1.1.	Eficácia nas abelhas adultas	43
3.3.1.2.	Eficácia nos favos de criação	44
3.3.2.	Grupo 2 – Aplicação de Thymovar®	45
3.3.2.1.	Eficácia nas abelhas adultas	45
3.3.2.2.	Eficácia nos favos de criação	45
3.3.3.	Grupo 3 – Aplicação de Api-LifeVar®.....	46
3.3.3.1.	Eficácia nas abelhas adultas	46
3.3.3.2.	Eficácia nos favos de criação	47
3.3.4.	Grupo 4 – Aplicação de Apiguard®.....	47
3.3.4.1.	Eficácia em abelhas adultas	47
3.3.4.2.	Eficácia em favos de criação	48
3.3.5.	Grupo 5 – Controlo - Sem Aplicação de substâncias ativas	49
3.3.5.1.	Evolução nas abelhas adultas	49

3.3.5.2. Evolução nos favos de criação	50
4. Discussão	51
4.1. Estudos Sanitários	51
4.2. Evolução das doenças ao longo do período de estudo	52
4.3. Avaliação da eficácia dos métodos de controlo contra a Varroose	55
5. Conclusões	60
6. Bibliografia	61

Lista de Figuras

Figura 1: Em cima: Almofariz com macerado de abdómens de abelha para pesquisa de <i>Nosema</i> spp. Em baixo: Placas de Petri com cortes torácicos de abelha para pesquisa de <i>S. tricuspis</i> . (fotografia do autor)	2
Figura 2: Representação da metamorfose de (esquerda para direita) Zangão, Abelha Obreira e Abelha Rainha. (adaptado de blogs.evergreen.edu/terroir-zack/life-cycle-of-the-honey-bee/)	4
Figura 3: Esquema da Anatomia da Abelha Obreira (adaptado de Fao.org/3/t0104e/T0104E02.htm)	5
Figura 4: Esquema de abdómen da Abelha rainha. (adaptado de //carrsconsulting.com/honeybee/normal/anatomybee.htm).....	6
Figura 5: Apiário com colmeias compostas por ninhos e variado número de alças (fotografia do autor)	7
Figura 6: Colmeias com captas-pólen colocados, durante a extração de pólen (fotografia do autor)	8
Figura 7: Mapa da dispersão mundial de <i>V. destructor</i> (Adaptado de beehealth.bayer.us/bayer-news-and-resources/publications).....	9
Figura 8: Fase reprodutiva de <i>V. destructor</i> (adaptado de https://beehealth.bayer.us/bayer-news-and-resources/publications).....	11
Figura 9: Filamento (larva filante) – sinal de loque americana (adaptado de mieldealaga.com/enfermedades/loque_america.html)	26
Figura 10: Vista de satélite do apiário (adaptado de googlemaps.com)	28
Figura 11: Amostras de abelhas e favo de criação (fotografia do autor)	30
Figura 12: Aspeto da lavagem de abelhas para pesquisa de <i>V. destructor</i> (fotografia do autor)	31
Figura 13: Amostra de favo de criação desoperculado para pesquisa de <i>V. destructor</i> . (fotografia do autor)	32
Figura 14: Maceração de abdómens de <i>A. mellifera</i> para pesquisa de agentes de Nosemose (fotografia do autor)	32
Figura 15: Lâminas contendo tórax esmagados de <i>A. mellifera</i> para pesquisa de <i>S. tricuspis</i> . (fotografia do autor)	33
Figura 16: Aplicação de Apivar® (fotografia do autor).....	35
Figura 17: Aplicação de Thymovar® (fotografia do autor)	35
Figura 18: Aplicação de Apilife-Var® (fotografia do autor)	35
Figura 19: Aplicação de Apiguard® (fotografia do autor).....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais espécies de plantas presentes na área envolvente ao apiário em estudo (adaptad de jb.utad.pt)	29
Tabela 2: Agentes etiológicos observados no 1º estudo efetuado no outono (10 de outubro) de 2017 em 20 colmeias	37
Tabela 3: Agentes etiológicos observados no 1º estudo efetuado no inverno (26 de janeiro) de 2018 em 20 colmeias	38
Tabela 4: Agentes etiológicos observados no 1º estudo efetuado na primavera (02 de maio) de 2018 em 20 colmeias	39
Tabela 5: Evolução da percentagem média, máximos e mínimos de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas por grupos de colmeias desde 26/01/2018 a 02/05/2018	42
Tabela 6: Evolução da percentagem média, máximos e mínimos de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação por grupos de colmeias desde 26/01/2018 a 02/05/2018	43
Tabela 7: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	43
Tabela 8: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	44
Tabela 9: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	45
Tabela 10: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	46
Tabela 11: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	47
Tabela 12: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	47
Tabela 13: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	48
Tabela 14: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	48
Tabela 15: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	49
Tabela 16: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	50

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Evolução da percentagem de infestação por <i>S. tricuspis</i> nas abelhas adultas desde 10 de outubro 2017 a 02 de maio de 2018	40
Gráfico 2: Evolução da percentagem de infestação por <i>V. destructor</i> nas abelhas adultas desde 10 de outubro 2017 a 02 de maio de 2018	41
Gráfico 3: Evolução da percentagem de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação desde 10 de outubro 2017 a 02 de maio de 2018	42
Gráfico 4: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	44
Gráfico 5: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	44
Gráfico 6: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	45
Gráfico 7: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	46
Gráfico 8: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	47
Gráfico 9: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018	47
Gráfico 10: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	48
Gráfico 11: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	49
Gráfico 12: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em abelhas adultas sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	50
Gráfico 13: Variação da % de infestação por <i>V. destructor</i> em favos de criação sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018.....	50

Lista de Abreviaturas

® - Marca Registada

INIAV- Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

PCR - *Polymerase chain reaction* (reação da polimerase em cadeia)

DGAV - Direcção-Geral de Alimentação e Veterinária

OIE – The World Organization for Animal Health

Parte I – Atividades Desenvolvidas no Estágio Curricular

1. Estágio realizado no Posto Apícola do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV)

O estágio curricular que serviu de base à realização deste trabalho decorreu no Laboratório do Posto Apícola Nacional no Pólo da Tapada da Ajuda do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, desde o dia 25 de setembro de 2017 até ao dia 08 de junho de 2018, perfazendo um total de 500 horas, sob a orientação da Dra. Maria José Valério.

Durante o período de estágio foram desenvolvidos em simultâneo dois tipos de atividades: a) o acompanhamento e participação em todo trabalho laboratorial de pesquisa doenças apícolas desenvolvido pela Dra. Maria José Valeiro no Posto Apícola Nacional e b) a realização de 3 estudos sanitários completos a um apiário da região centro de Portugal sob a orientação quer em trabalho de campo, quer em laboratório, da Dra. Maria José Valério, sendo este estudo destinado à realização da dissertação de mestrado.

O Posto Apícola Nacional do INIAV é um laboratório de referência a nível nacional e internacional que tem como principal objetivo o diagnóstico de doenças apícolas, mas também a participação em estudos e criação de guidelines sobre as doenças apícolas, quer sejam as já existentes no território nacional ou as potenciais doenças que ameaçam constantemente invadir o nosso País.

Durante o acompanhamento do trabalho de rotina desenvolvido pela Dra. Maria José Valério foi possível adquirir conhecimentos sobre os procedimentos laboratoriais efetuados no Posto Apícola. Destacam-se, entre eles: a receção das amostras biológicas no laboratório quer de abelhas quer de favos de criação; a realização de protocolos laboratoriais específicos; a pesquisa e identificação de agentes patogénicos; e o envio dos resultados das análises realizadas aos apicultores, associações /cooperativas apícolas e entidades responsáveis pelo controlo da sanidade apícola a nível nacional.

Neste contexto, foram adquiridos conhecimentos e realizados todos os procedimentos dos métodos de pesquisa e quantificação de *Varroa destructor*, quer nas abelhas adultas, pelo método da lavagem com sabão, quer nos favos de criação, pela desoperulação da criação.

Realizou-se também a dissecação de abelhas adultas e observação em microscópio ótico, utilizando cortes da região torácica, para a pesquisa de *Senotainia tricuspis* e *Acarapis woodi* e maceração da região abdominal da abelha para a pesquisa de *Nosema spp* (Figura 1).



Figura 1: Em cima: Almofariz com macerado de abdômens de abelha para pesquisa de *Nosema* spp. Em baixo: Placas de Petri com cortes torácicos de abelha para pesquisa de *S. tricuspis*. (fotografia do autor)

Executaram-se, igualmente, os procedimentos de pesquisa de Loque Americana pela análise de favos de criação a olho nu e identificação do cheiro característico desta doença apícola, recorrendo à visão e ao olfato do observador.

Foi ainda possível acompanhar a Dra. Maria José Valério à sede do INIAV, em Oeiras, onde houve oportunidade de contactar com todo o processo de determinação das espécies de *Nosema* presentes nas amostras enviadas por apicultores, recorrendo à técnica de PCR.

Como consequência do estágio curricular foi desenvolvido em co-autoria com a Dra. Maria José Valério e a Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca, uma revisão bibliográfica com o título “Varroose na Abelha do Mel – Descrição da doença, métodos de controlo e impactos económicos” com a finalidade de participar no prémio Bayer Saúde Animal 2018. Este trabalho foi contemplado com o 1º prémio.

Parte II – Revisão Bibliográfica

1. *Apis mellifera*

1.1. A abelha e a Apicultura

A apicultura é a atividade a partir da qual o apicultor cria abelhas e delas extrai os seus subprodutos. A domesticação de abelhas tem acompanhado a história da humanidade, sendo desde há muito considerada como uma atividade de extrema importância para o desenvolvimento dos meios rurais (Moreira e Farinha 2011).

Em Portugal existem cerca de onze mil apicultores registados, detentores de cerca de 626 mil colónias distribuídas por cerca de 33 mil apiários (DGAV 2020). Com o passar dos anos é um sector que apresenta cada vez mais apicultores profissionais, no entanto, o número total de apicultores amadores está a diminuir, havendo um aumento do número total de colónias a cada ano sem haver aumento do número total de apiários. Assim observamos uma tendência para o aumento do número de colónia por apiário e um aumento no número de colónias que cada apicultor possui (GAPA 2019; DGAV 2020).

A abelha doméstica que habita no continente Europeu, é um inseto que pertence à ordem Hymenoptera, família Apidae, espécie *Apis mellifera* sendo que na Península Ibérica predomina a subespécie *Apis mellifera iberiensis*. Existem cerca de 20 mil espécies diferentes de abelhas, no entanto, a espécie *A. mellifera* é a que tem maior relevância na polinização das variadas plantas (Pascoal 2012; He et al. 2019).

1.2. Biologia e Ciclo de Vida

A espécie *A. mellifera* é um inseto altamente sociável e apenas consegue sobreviver e proliferar fazendo parte de uma colónia. Uma colónia de abelhas melíferas é composta pela criação, que corresponde às larvas e pupas de abelhas durante a fase de metamorfose, e por insetos adultos, distribuídos de acordo com a sua função, isto é: abelhas obreiras, em número de 10.000 a 40.000; uma rainha e um variado número de zangãos, que dependendo do estado evolutivo da colónia pode oscilar entre zero e 4.000 indivíduos. A colónia de *A. mellifera* é considerada como um exemplo de disciplina e organização, em que todos os seus membros têm funções bem definidas (Moreira e Farinha 2011).

A criação da colónia está inserida nos favos da colmeia. Estes podem ser de 3 tipos: alvéolos reais dos quais irão eclodir as rainhas; alvéolos de zangãos e alvéolos de obreiras.

A metamorfose corresponde à passagem da abelha desde a fase de ovo até ao inseto adulto, possuindo uma duração diferente consoante o tipo de inseto adulto que

irá eclodir. Assim, a metamorfose da rainha ocorre durante 16 dias. Inicia-se num ovo fecundado, do qual eclode uma larva ao 3º dia. O período larvar dura 9 dias. É operculado ao 9º dia e até ao 16º dia ocorre a evolução para pupa, eclodindo o inseto adulto ao 16º dia (Figura 2).

A metamorfose da abelha obreira inicia-se com um ovo fecundado, evoluindo para o estado larvar ao fim de 3 dias, no qual permanece do 4º ao 13º dia. Ao 9º dia o alvéolo de obreira é operculado e no seu interior ocorre a passagem de larva a pupa e finalmente a inseto adulto, o qual eclode ao 21º dia (Figura 2).

A metamorfose do zangão é a mais longa durando 24 dias. Inicia-se também com a postura de um ovo, porém um ovo não fecundado. Três dias após a ovopostura, a larva eclode do ovo permanecendo nesta fase até ao 17º dia, sendo operculado ao 11º dia. Após a operculação, a larva cresce, dar-se-á a passagem para pupa eclodindo o zangão, como inseto adulto, ao 24º dia (Figura 2).

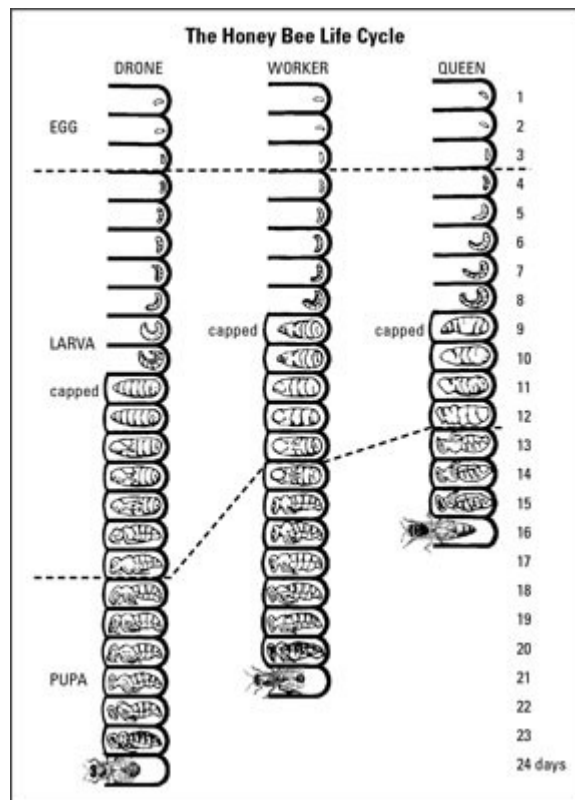


Figura 2: Representação da metamorfose de (esquerda para direita) Zangão, Abelha Obreira e Abelha Rainha. (adaptado de blogs.evergreen.edu/terroir-zack/life-cycle-of-the-honey-bee/)

Quanto à distribuição de tarefas das abelhas enquanto insetos sociais, a abelha obreira é a responsável por todas as atividades laborais na colmeia. Desde a sua eclosão como inseto adulto até a sua morte esta desenvolve variados tipos de trabalhos e de funções na colónia. No início da sua vida, até cerca de 5/6 dias pós-eclosão, a obreira, apenas possui funções de limpeza da colónia.

Com o seu crescimento também as suas glândulas se vão desenvolvendo, nomeadamente as glândulas hipo-faríngeas e as glândulas cerígenas (Figura 3), glândulas estas responsáveis pela produção de geleia real e cera, respetivamente.

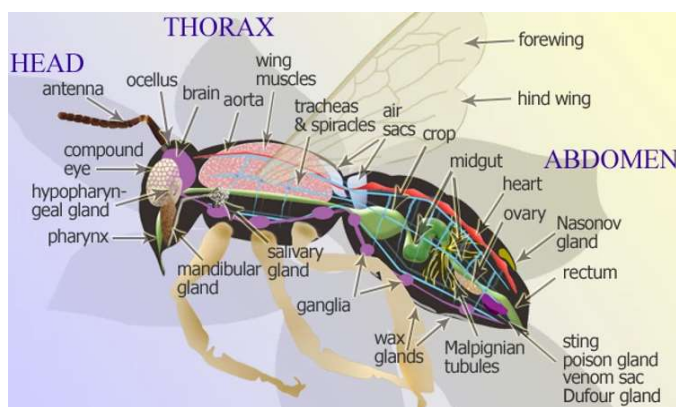


Figura 3: Esquema da Anatomia da Abelha Obreira (adaptado de Fao.org/3/t0104e/T0104E02.htm)

Como tal, dos 6 aos 16 dias de vida, a obreira, também denominada como abelha ama, vai passar a ter funções de alimentação das larvas e da rainha e produção de cera, usada na construção dos favos e na operculação dos alvéolos. É também durante este período que as obreiras participam no armazenamento de mel pela colónia. À medida que a obreira vai ficando mais velha, e a partir dos 18 dias de vida, inicia as funções de guarda, ou seja, de defesa da colmeia.

É nesta fase que ela vai aperfeiçoando a arte do voar de forma a que inicie as suas funções de coletora, funções estas que compreendem as atividades de coleta de pólen e néctar das plantas.

A coleta de pólen e de néctar acaba por ser a última função da vida da abelha obreira ou abelha campeira. período de vida da abelha é determinado pela atividade que desenvolve, ou seja, quanto maior for a atividade coletora da abelha, nomeadamente o número de voos diários que executa, menor será a sua esperança de vida. Sendo que, no inverno, em que há menor disponibilidade de alimento e os dias são mais curtos a abelha chega a viver 90 dias, enquanto que na primavera, com abundância alimentar que a leva a executar vários voos diários e com os dias maiores, permitindo também maior número de voos, esta apenas vive 55 dias (Moreira e Farinha 2011; Pascoal 2012).

A rainha é o único ser dentro da colmeia que é capaz de produzir ovos fecundados na colónia, sendo como tal a responsável pela ovopostura. A rainha vive cerca de 3 a 5 anos, dependendo da intensidade e vigor da postura de ovos (Abrahão et al. 2017).

Quando eclode como inseto adulto, a rainha passa os primeiros 15 dias de vida dentro da colônia a alimentar-se e a ganhar força para a realização do voo nupcial, que só é realizado uma única vez na sua vida. É neste voo nupcial que a rainha é fecundada por um número variável de zangãos, entre 4 a 18, o que permite que a espermateca (Figura 4) armazene espermatozoides, de diferentes proveniência.

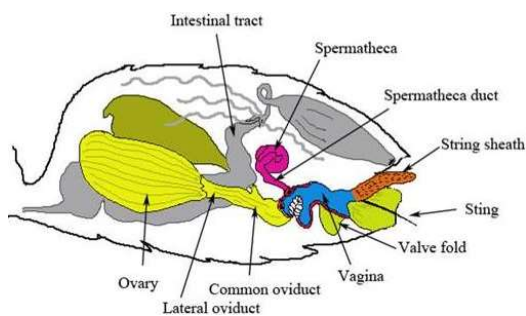


Figura 4: Esquema de abdômen da Abelha rainha. (adaptado de [//carrsconsulting.com/honeybee/normal/anatomybee.htm](http://carrsconsulting.com/honeybee/normal/anatomybee.htm))

Após o voo nupcial a rainha permanece na colônia cerca de uma semana a alimentar-se a fim de reunir condições para iniciar a ovopostura. A rainha é também a responsável pela libertação de uma feromona específica que gere variados comportamentos dentro da colônia como o comportamento de defesa e o comportamento higiênico, entre outros (Moreira e Farinha 2011; Pascoal 2012).

Os zangãos são os machos das colônias e são apenas responsáveis pela fecundação de rainhas virgens (Abrahão et al. 2017).

1.3. Os produtos da Colmeia

O produto que a maioria dos apicultores colhe das colmeias é o mel, no entanto muitos outros produtos podem ser extraídos de forma a aumentar a produtividade de uma exploração apícola. Como produtos secundários obtêm-se o pólen, o propólis, a cera, apitoxina, geleia real, enxames e as abelhas rainhas (Moreira e Farinha 2011; Sforcin et al. 2017; Apícola 2019).

O mel é o alimento energético das abelhas que as abelhas reservam na colmeia durante as épocas de abundância alimentar. O mel é feito pelas abelhas através do néctar que colhem das plantas, ao qual adicionam enzimas salivares e após a sua desidratação armazenam nos favos. Desde o início da apicultura, que ano após ano, os apicultores selecionam as colmeias que coletam e armazenam mais mel, chegando ao ponto em que as colmeias armazenam muito mais mel do que necessitam, permitindo ao apicultor colher o mel excedente, nunca comprometendo as reservas que a colônia necessita em períodos de escassez. Para tal, a colmeia é composta por um ninho, onde

existe a criação e as reservas e quando este está cheio o apicultor coloca alças (pequenas caixas de madeiras com 8 a 9 quadros) de forma a que as abelhas coloquem aí o mel em excesso (Figura 5).



Figura 5: Apiário com colmeias compostas por ninhos e variado número de alças (fotografia do autor)

Na altura da cresta (colheita de mel das colmeias) o apicultor apenas extrai o mel contido nas alças (Sousa Neves 2006).

O pólen é o alimento proteico das abelhas e é principalmente usado para a alimentação das larvas durante a metamorfose. A coleta de pólen por parte das abelhas corresponde a um processo cooperação entre as plantas e as abelhas, pois as abelhas ao colherem o pólen, muito necessário ao funcionamento da colónia, permitem a passagem de grãos de pólen entre várias plantas da mesma espécie, aumentando muito o sucesso reprodutivo destas (Casaca 2010).

O pólen é colhido pelo apicultor quando a abelha carregada de pólen está para entrar na colmeia. O método mais utilizado é com o recurso a capta-polens, que possuem uma rede circular de diâmetro ligeiramente superior ao diâmetro da abelha, permitindo que esta a atravesse, no entanto, as bolas de pólen que a abelha carrega nas patas não passam por este orifício, caindo o pólen para uma gaveta (Figura 6). O apicultor pode apenas colocar os capta-polens durante um curto período de tempo, 2 a 4 dias de cada vez, pois as abelhas não reservam muito pólen dentro da colmeia, evitando assim que este fique em défice (Casaca 2010).



Figura 6: Colmeias com capta-pólen colocados, durante a extração de pólen (fotografia do autor)

A cera de abelha e o própolis são verdadeiramente subprodutos pois o apicultor não tem colmeias dedicadas á produção destes produtos. Todos os anos o apicultor extrai cera das colmeias quando faz a renovação de ceras velhas por ceras novas, em colmeias que morrem e é derretida toda a cera do ninho e durante a cresta, na remoção dos opérculos que selam o mel nas alças(Barros et al. 2009).

O própolis é composto por uma goma extraída da seiva de algumas arvores e que as abelhas usam para isolar toda a superfície e orifícios da colmeia. O própolis pode ser retirado com a colocação de redes no topo da colmeia ou através da raspagem dos quadros e colmeias (Casaca 2010). É um dos subprodutos que contem mais propriedades terapêuticas, sendo usado como anti-infecioso em feridas, e sob a forma de estrato para reforçar o sistema imunitário (Sforcin et al. 2017).

A apitoxina e a geleia real são ainda subprodutos pouco explorados em Portugal, no entanto, cada vez mais estão a ganhar relevância pelas suas inúmeras propriedades terapêuticas. A geleia real é produzida pelas glândulas hipofarigeas das abelhas amas e é o único alimento que a abelha rainha ingere durante toda a sua vida. Este alimento é altamente rico em aminoácidos essenciais e vitaminas, sendo muito utilizado na cosmética e como suplemento alimentar para reforço do sistema imunitário (Williams 2000; Kazemi et al. 2019).

A produção de rainhas e enxames de abelhas para venda a outros apicultores é também uma importante fonte de rendimento para uma exploração apícola, sendo cada vez mais frequente para o apicultor a produção destes produtos (Neto 2009).

2. As doenças da Colmeia:

2.1. Varroose

2.1.1. Agente etiológico e distribuição geográfica

O parasita responsável pela varroose na Abelha do Mel, *A. mellifera*, é um ácaro da espécie *Varroa destructor*, pertencente à família *Varroidae* (Relva 2010).

O ácaro *Varroa* foi identificado pela primeira vez, em 1904, na ilha de Java na Indonésia, tendo a espécie sido denominado *Varroa jacobsoni*. A dispersão mundial do ácaro *Varroa* iniciou-se quando este conseguiu mudar do seu hospedeiro natural, *Apis cerana*, completamente adaptado ao parasitismo, para iniciar o parasitismo em *Apis mellifera*, um hospedeiro novo de elevada suscetibilidade a este ácaro (Rosenkranz et al. 2010).

Inicialmente pensava-se que a espécie responsável pela varroose na *Apis mellifera* era *V. jacobsoni*, no entanto, no ano 2000, Anderson e Trueman demonstraram que a espécie que possuía potencial para parasitar a abelha europeia seria *Varroa destructor*. Esta espécie possui 5 haplótipos capazes de parasitar *A. mellifera* embora somente 2 apresentem patogenicidade relevante. São estes o haplótipo Japan/Thailand, que é considerado menos patogénico e apenas encontrado em colónias no Japão, Tailândia, América do Norte e América do Sul, e o haplótipo Korea, de elevada patogenicidade sendo responsável pela dispersão mundial de *V. destructor* (Anderson and Trueman 2000).

Desde 1949, data na qual foi identificada pela primeira vez *destructor* na *A. mellifera*, a varroose rapidamente se espalhou por todo o mundo, sendo que atualmente apenas o continente australiano (Figura 7) e algumas ilhas do atlântico, e pacífico se encontram indemnes à doença (Dietemann et al. 2013; Traynor et al. 2020).

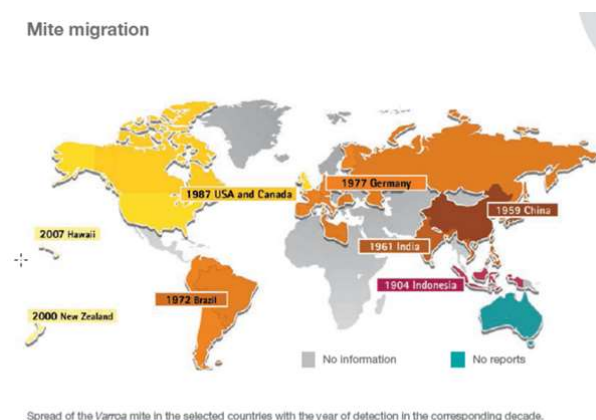


Figura 7: Mapa da dispersão mundial de *V. destructor*
(Adaptado de beehealth.bayer.us/bayer-news-and-resources/publications)

No que se refere a Portugal, o primeiro relato de varroose ocorreu no ano de 1987, na região Norte, entre os rios Douro e Minho, disseminando-se rapidamente por todo o país, sendo desde então a doença de maior relevância para a apicultura (Relva 2010)

2.1.2. Morfologia de *Varroa destructor*

Os órgãos reprodutores e os órgãos sensoriais são as estruturas de maior relevância para *V. destructor* pois a sua sobrevivência depende grandemente da eficácia dos mesmos. Este parasita exibe um dimorfismo sexual muito acentuado, possuindo bastantes adaptações morfológicas ao seu hospedeiro. O corpo do macho é arredondado, em forma de pera, com uma coloração entre o branco e o cinzento claro, medindo apenas 1 mm de diâmetro, sendo significativamente mais pequeno que o da fêmea em todas as fases de desenvolvimento. O corpo da fêmea é oval e achatado, sendo mais largo (1,5-2 mm) que comprido, e a coloração varia entre o castanho claro e o castanho escuro. O corpo de *V. destructor* é dividido, em ambos os sexos, em duas partes bem definidas, o idiossoma e o gnatossoma (Rosenkranz et al. 2010).

O gnatossoma corresponde à porção crânio-ventral de *V. destructor*, onde se encontram as estruturas que formam a armadura bucal nomeadamente duas quelíceras e dois pedipalpos sensoriais. As quelíceras são formadas por 3 partes (proximal, intermédia e distal), sendo que a porção distal nas fêmeas é móvel e possui dois pequenos dentes enquanto no macho esta porção foi transformada num espermatodáctilo, uma estrutura tubular que permite a transferência dos espermatozoides para o interior do trato genital da fêmea. A armadura bucal da fêmea tem uma função picadora-sugadora, permitindo a *V. destructor* perfurar o revestimento quitinosos das abelhas e sugar a hemolinfa (Relva 2010).

O idiossoma, caudal ao gnatossoma, corresponde à maior parte do corpo da varroa e é constituído pelo corpo e membros, onde se localiza o aparelho reprodutor quer da fêmea quer do macho (Rosenkranz et al. 2010).

O género *Varroa* não possui órgãos visuais nem auditivos, tendo toda a sua superfície corporal recoberta por pelos sensoriais bastante desenvolvidos capazes de detetarem diferenças de temperatura, humidade, estímulos químicos e vibrações. Este parasita utiliza o primeiro par de patas não com a finalidade de se deslocar, mas sim como antenas para sentir o ambiente envolvente, pois no tarso de cada uma destas patas o ácaro possui um órgão sensorial que tem como função fornecer informações do foro gustativo e olfativo, permitindo-lhe obter informação sobre a localização da criação e o seu estado de desenvolvimento (Rosenkranz et al. 2010).

2.1.3. Biologia e ciclo de vida

O ácaro *V. destructor* é um parasita obrigatório da abelha, passando todo o ciclo de vida no ninho da colmeia, na criação, não tendo capacidade de se reproduzir fora do mesmo (Relva 2010).

A temperatura média no interior de uma colmeia é de 34°C, variando entre os 30,5°C, no inverno e os 35,5°C no verão. A temperatura dentro do ninho da colmeia é mais um dos fatores que torna este parasitismo tão efetivo para o género *Varroa* pois a sua temperatura ideal de desenvolvimento é aproximadamente de 32°C ± 2,9°C. A temperatura também influencia a eficácia de desenvolvimento do ácaro, sendo que este atinge uma taxa reprodutiva máxima entre os 32,5°C e os 33,4°C. A temperatura mínima que *V. destructor* suporta é de 1°C, no entanto, só contacta com temperaturas tão baixas quando sai da colmeia parasitando uma abelha adulta, sendo este fator bastante importante na dispersão dos parasitas pelos apiários (Nazzi and Le Conte 2016).

Uma varroa fêmea vive cerca de 2 a 3 meses na primavera e verão e de 6 a 8 meses no inverno, quando há ausência de criação. Se separada das abelhas não vive mais que 7 dias (Murilhas e Casaca 2004).

O ciclo de vida de *V. destructor* compreende duas fases distintas: a fase reprodutiva (Figura 8), que ocorre no interior dos alvéolos da criação operculada de abelhas obreiras e de zangãos; e a fase forética que corresponde ao parasitismo de abelhas adultas dentro e fora da colmeia (Pascoal 2012).

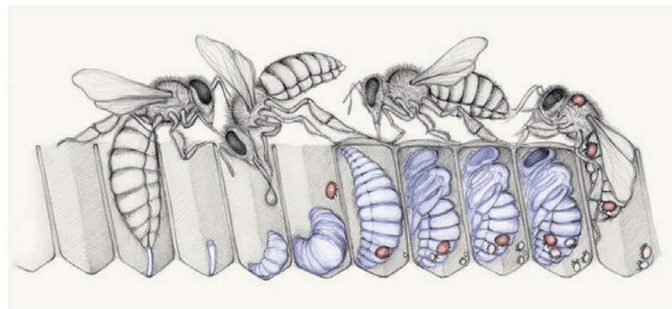


Figura 8: Fase reprodutiva de *V. destructor*
(adaptado de <https://beehealth.bayer.us/bayer-news-and-resources/publications>)

Os comportamentos reprodutivo e de busca de hospedeiro são cruciais para o ciclo de vida de *V. destructor*. O parasitismo começa com a invasão do alvéolo, iniciando-se aqui a alimentação com a hemolinfa da larva de abelha ou zangão, seguindo-se de um mimetismo químico como mecanismo de escape ao reconhecimento pelas abelhas responsáveis pela manutenção da criação, ovopostura e eclosão, crescimento e acasalamento (Rosenkranz et al. 2010).

Uma abelha ou zangão parasitados por uma fêmea fecundada *V. destructor* (ainda na fase forética), ao deslocarem-se pela colmeia permitem ao ácaro que percorra

o ninho até que identifique e localize o alvéolo que contém a larva a parasitar. O seu sistema sensorial permite-lhe encontrar com facilidade o local onde se vai alimentar e reproduzir, ou seja, um alvéolo de obreira contendo uma larva de 8 a 9 dias de idade, 15 a 20 horas antes de ser operculado, ou um alvéolo de zangão contendo uma larva de 9 a 10 dias de idade, 40 a 50 horas antes de ser operculado. Quando *V. destructor* se encontra relativamente perto do alvo, abandona a abelha ou o zangão que a transportava e invade o alvéolo escolhido (Nazzi and Le Conte 2016).

A espécie *V. destructor* tem preferência por parasitar a criação de zangão em comparação com a criação de obreira pois o primeiro além de oferecer mais nutrientes aos ácaros por possuir maior volume de hemolinfa disponível também liberta mais agentes químicos (feromonas) atrativos, é visitado mais vezes por abelhas amas que podem conter parasitas, aumentando a probabilidade de parasitismo, e ainda passa mais tempo operculado o que permite que *V. destructor* execute mais ciclos reprodutivos. Os alvéolos reais, de onde eclodem rainhas, quase nunca são parasitados pois a geleia-real possui uma elevada concentração de ácido octanóico com efeito repelente contra as varroas (Anderson and Trueman 2000).

Tendo em conta o número de alvéolos com condições ideais para o parasitismo, a sua invasão por *V. destructor* não é aleatória. Sabe-se que, por norma, as varroas tendem a parasitar alvéolos onde já se encontram outras, ocasionando a que dado alvéolo seja muito parasitado enquanto outros permanecem livres do ácaro. Este comportamento acontece devido a vários fatores como a existência de alvéolos contendo mais agentes atrativos, zonas de criação de obreira e zangãos que pela sua localização mais central, são mais visitadas por abelhas parasitadas. Através deste comportamento *V. destructor* obtém maior variabilidade genética e consequente evolução da espécie através da fecundação por machos de diferentes progenitoras (Nazzi and Le Conte 2016).

As abelhas possuem um sistema de identificação dos indivíduos da colmeia através da produção de uma feromona específica e comum a todos eles. Caso exista um ser vivo dentro da colónia que não possua o mesmo odor aquelas irão combatê-lo. Como defesa contra este mecanismo defensor, as varroas desenvolveram o designado “mimetismo químico”, isto é, estes ácaros conseguem produzir uma feromona igual à que está a ser produzida na colónia para que as abelhas-amas não os detetem nem eliminem, aumentando assim a sua eficácia de parasitismo (Rosenkranz et al. 2010).

Após a entrada no alvéolo, *V. destructor* dirige-se para o fundo do mesmo, passando entre a larva e a parede até ficar aprisionada no alimento deixado pelas abelhas para a larva consumir. Quando este alimento finda, o ácaro começa a alimentar-se da hemolinfa da abelha imatura (pré-pupa/pupa). As feromonas produzidas pela larva

de obreira ou zangão e pela cera do opérculo desencadeiam o início da oogénese nas varroas, cerca de seis horas após a operculação (Beecare 2017).

Aproximadamente 60 horas após a operculação, quando a oogénese está concluída, *V. destructor* inicia a ovopostura na parede do alvéolo. A varroa pode colocar até 6 ovos de 30 em 30 horas. No entanto, este cenário não é comum, tendo normalmente taxas de reprodução inferiores, influenciadas pela subespécie quer de *A. mellifera* quer de *V. destructor* e pelo facto de se tratar de uma larva de zangão ou de obreira (Pascoal 2012).

O primeiro ovo a ser posto é um ovo não fecundado do qual se desenvolve sempre um macho. Os restantes ovos estão fecundados e darão origem a fêmeas. Os machos necessitam de sete dias até estarem aptos a reproduzir. As varroas fêmeas jovens, no estado de ninfas, têm uma coloração branca e demoram seis dias até ficarem adultas e prontas a serem fecundadas. Durante o período de desenvolvimento, os ácaros imaturos são incapazes de se alimentarem sozinhos, pelo que a varroa-mãe perfura a pupa da abelha, criando um orifício através do qual a sua criação se pode alimentar (Beecare 2017).

A fecundação inicia-se seis dias após a ovopostura e dura até á eclosão da abelha ou zangão adulto. O macho é o primeiro descendente a ficar apto a se reproduzir e espera até que as *varroas* fêmeas jovens estejam aptas, fecundando-as assim que possível. A vida do macho da *varroa* dura apenas enquanto as pupas da abelha ou do zangão estão em desenvolvimento, pois assim que eclode o inseto adulto o macho e as fêmeas imaturas morrem por falta de alimento (Nazzi and Le Conte 2016).

A fase forética do ciclo de vida de *V. destructor* inicia-se quando o ácaro fêmea abandona o alvéolo, onde passou a fase reprodutiva sobre uma abelha ou zangão recém-eclodido, e termina quando o ácaro invade novamente um outro alvéolo. A *varroa* quando inicia a fase forética não permanece na abelha que a transportou, mas sim muda-se para uma abelha ama ou para uma abelha campeira. Esta escolha não é aleatória sendo condicionada pelo estado de infestação da colónia, pois quando *V. destructor* necessita de aumentar o sucesso reprodutivo dentro da mesma colónia (através do incremento da percentagem de infestação) prefere parasitar uma abelha ama que tem acesso direto a toda a criação. Deste modo, torna-se mais fácil eleger a larva ideal, tornando a fase forética mais curta. Quando a taxa de infestação é elevada as varroas parasitam também abelhas campeiras, pois nesta fase o objetivo destes ácaros é disseminar-se pelas outras colónias e apiários, usando a abelha campeira como vetor para o alcançar (Williams 2000; Rosenkranz et al. 2010; Nazzi and Le Conte 2016).

Quando numa colónia há criação operculada, apenas 15 a 20% das varroas existentes estão na fase forética, estando as restantes na fase reprodutiva, dentro dos alvéolos, não permitindo a sua observação direta. Quando a colónia está reduzida a enxame ou não há postura de ovos há mais de 21 dias, as varroas existentes encontram-se todas na fase forética (Loftus et al. 2016).

2.1.4. Patogenicidade e sinais clínicos

A elevada eficácia de disseminação das varroas entre colónias é um fator importante no poder patogénico do ácaro. A abelha campeira ao sair da colónia infestada transportando uma fêmea de *V. destructor* fecundada, facilmente introduz o parasita numa nova colónia, através da pilhagem, da derivação para outras colónias e da transmissão direta a outras abelhas quando estas se encontram nas fontes de néctar. Quando os zangãos são os transportadores a disseminação ainda é mais eficaz pois o zangão pode entrar em qualquer colmeia de qualquer apiário sem ser atacado pelas abelhas guardas, levando o parasita diretamente para o interior das colónias, reinfestando-as. A enxameação e o comércio de pacotes de abelhas e enxames são formas muito importantes na dispersão da varroose entre zonas distintas (Muli et al. 2014).

A abelha *A. mellifera* sofre com este parasitismo especialmente no estado larvar e pupal, sendo afetada de diversas formas. A perda de hemolinfa que ocorre quando a varroa se alimenta durante o estado de larva e de pupa provoca uma redução no peso da abelha adulta, proporcionalmente ao número de varroas que dela se alimentaram. Uma obreira parasitada com apenas uma varroa durante a metamorfose, tem uma redução de 7% no seu peso à eclosão e um zangão pode ter perdas de 11 a 19%, o que leva a uma redução na performance de voo, tempo de vida útil, vitalidade e higiene, capacidade de aprendizagem e orientação (Rosenkranz et al. 2010).

Para além destes efeitos diretos, *V. destructor* é um vetor de excelência para várias viroses de *A. mellifera*, permitindo que os vírus infetem a abelha ainda no estado larvar ou de pré-pupa. Já foram isolados pelo menos 18 vírus nesta espécie de abelha e pelo menos 5 destes usam a varroa como vetor. São eles o Vírus das Asas Deformadas (Deformed wing virus- DWV), o Virús Kashmir (Kashmir bee virus-KBV), o Vírus da Cria Ensacada (Sacbrood virus-SBV), o Vírus da Paralisia Aguda (Acute bee paralysis virus-ABPV), e o Vírus Paralisia Aguda Israelita (Israeli acute paralysis virus-IAPV) (de Miranda et al. 2010; de Miranda and Genersch 2010). Os efeitos dos vírus das asas deformadas e da paralisia aguda são os mais frequentemente observados, pois o apicultor identifica-os ao visualizar abelhas e zangãos com grandes alterações nas asas e na locomoção (Pascoal 2012).

Quando as percentagens de infestação por *V. destructor* são baixas, na ordem dos 2%, a colónia normalmente não apresenta sinais de parasitismo. No entanto, a taxa de infestação irá aumentar com o passar do tempo e a colónia não sobreviverá mais que 2 a 4 anos caso não seja feita nenhuma ação com vista a reduzir a infestação (Murilhas e Casaca 2004).

Os primeiros sinais de parasitismo observáveis pelo apicultor são a visualização de ácaros sobre as abelhas e zangãos adultos, observação de abelhas e zangãos com asas deformadas, moribundos e sem capacidade de voar, quer dentro da colmeia quer na tábua de voo (de Miranda et al. 2010; Pascoal 2012)

Com o decorrer do parasitismo e aumento da taxa infestação, vão existir cada vez mais abelhas afetadas e os sinais tornam-se mais evidentes. Quando as taxas de infestação estão elevadas há um decréscimo acentuado no número abelhas adultas na colónia, pois as abelhas parasitadas vivem menos tempo e os vírus aumentam a mortalidade, a área de criação está diminuída, com aspeto rendilhado e com bastantes anomalias como pupas desoperculadas, áreas de criação morta e má higiene generalizada (Relva 2010).

A intensidade destes sinais revela a proximidade do colapso da colónia. A partir deste ponto, o colapso pode acontecer em apenas 2 semanas pois a colónia chega a uma fase em que deixa de haver abelhas adultas suficientes para a manter em funcionamento (Murilhas e Casaca 2004).

2.1.5. Diagnóstico e Monitorização da taxa de infestação

Ao longo do ano apícola é necessário monitorizar periodicamente a taxa de infestação por *V. destructor* em cada apiário. Como referência, deve ser efetuada a cada 2 meses aproximadamente. Contudo, esta periodicidade varia com a taxa de infestação e com o estado evolutivo das colónias (Pascoal 2012).

A monitorização tem de ser realizada em todos os apiários, através da colheita de amostras numa percentagem representativa das colónias (20 a 30%). De realçar que a monitorização deve ser constante, não sendo possível usar o cenário do ano anterior como referência, pois em cada ano e em cada apiário a evolução da infestação certamente será diferente (Murilhas e Casaca 2004).

Existem vários métodos de diagnóstico de infestação por *V. destructor*, tendo todos eles vantagens e desvantagens, variando a sua sensibilidade e o impacto causado à colónia na sua realização. A observação dos ácaros *V. destructor* é feita a olho nu. (Pascoal 2012).

A OIE descreve três métodos que devem ser realizados em conjunto para uma determinação correta da taxa de infestação da colónia, da evolução da infestação e do

sucesso do tratamento, a saber: o método de contagem de varroas foréticas em abelhas adultas; o método de contagem de varroas em criação operculada, de zangãos e de obreiras e o método de contagem de varroas em estrados de recolha (Dietemann et al. 2013).

Para realizar o método de contagem de varroas foréticas em abelhas adultas colhe-se uma amostra no campo, de 200 a 250 abelhas por colónia, que estejam em quadros de criação desoperculada (com maior % de abelhas amas), congelando a amostra assim que possível. Posteriormente coloca-se a amostra num frasco cheio de álcool e agita-se durante dez minutos com a finalidade de separar as varroas das abelhas. Por fim, filtra-se o álcool com a amostra através de um conjunto de dois filtros sendo o primeiro constituído por uma malha grossa onde as abelhas ficam retidas, e o segundo por uma malha fina impedindo a passagem de varroas, permitindo a sua contagem e posterior cálculo da relação existente entre número varroas/abelhas para obter a taxa de infestação forética na colónia (Dietemann et al. 2013).

No método de contagem de varroas na criação é feita a colheita de amostra no campo (+/- 200 alvéolos), de seguida efetua-se a desoperculação dos alvéolos e lavagem dos mesmos com água quente, removendo as pupas e as varroas do interior dos alvéolos para um sistema de dois filtros para separar as varroas das pupas de abelha. As varroas ficam retidas no filtro de malha fina permitindo a sua contagem e posterior determinação da taxa de infestação de ácaros que se encontravam em fase reprodutiva (Honey Bee Health Coalition 2015).

O método de contagem de varroas nos estrados de recolha é a menos invasiva e a sua utilização é mais direcionada para o controlo da eficácia de um tratamento. Este método baseia-se na colocação, durante 24 horas, de um estrado de recolha no fundo da colmeia após a realização de um tratamento com um acaricida. As varroas afetadas pelo tratamento irão cair e ficar retidas no estrado, permitindo a sua contagem (Dietemann et al. 2013). Ao se relacionar as taxas de infestação obtidas anteriormente pelo método de contagem de varroas foréticas, e ao correlacioná-los com a quantidade aproximada de abelhas adultas na colónia, é possível calcular um número aproximado de varroas foréticas existentes na colmeia após o tratamento, determinando a sua eficácia (Murilhas e Casaca 2004).

Os métodos de contagem de varroas devem ser sempre efetuados antes de se realizar um tratamento acaricida o qual está aconselhado em infestações com taxas superiores a 15% na criação de obreira, 30% na criação de zangãos e 5% em abelhas adultas. Abaixo destes valores devem ser realizadas, regularmente, ações de manejo com vista à redução gradual do número de varroas sem utilizar acaricidas (Relva 2010; Honey Bee Health Coalition 2015).

2.1.6. Métodos de Controlo

O objetivo do controlo da varroose em *A. mellifera* é a manutenção da população de ácaros abaixo do nível que compromete a produção e a sobrevivência das colónias. Nesta espécie de abelha, no combate à varroose, e na redução do seu impacto, o apicultor ou técnico apícola responsável, utiliza métodos de tratamento químicos, com efeitos varroicida, e métodos biotecnológicos. Estes dois métodos de controlo devem ser utilizados em conjunto e em concordância com a época do ano, o estado das colónias e a taxa de infestação (Pascoal 2012).

Os métodos biotecnológicos utilizados baseiam-se em ações de manejo da colónia tirando partido de características do ciclo de vida de *V. destructor*. Existem seis métodos, sendo eles: o método de eliminação de alvéolos de zangão; o método de interrupção da criação; o método de criação de rainhas resistentes à varroa; a utilização de estrados sanitários; a pulverização de açúcar em pó sobre as abelhas e a mudança regular de quadros com ceras velhas /com excesso de alvéolos de zangão (Honey Bee Health Coalition 2015).

Um fator a ter em conta no combate à varroose, de modo natural, é o comportamento higiénico da colónia e a resistência da mesma ao parasitismo. Estes dois aspetos são transmitidos, geneticamente, às abelhas pela rainha da colónia, sendo possível selecionar artificialmente rainhas com grande aptidão para estes mesmos comportamentos. Como tal, a criação de rainhas cada vez mais tolerantes aos efeitos de *V. destructor* é uma estratégia para a resolução a longo prazo da varroose (Neto 2009).

A renovação de ceras velhas, escuras, deformadas e com excesso de alvéolos de zangãos é uma medida de sanidade global para a colmeia. Embora não tendo efeito direto sobre a taxa de infestação por *V. destructor*, este procedimento tem efeito indireto na medida em que o apicultor melhora o ambiente em que a abelha vive, aumentando o número de abelhas novas, a vitalidade, as defesas e a força da colónia (FNAP 2009).

No método de eliminação de alvéolos de zangão, o apicultor estimula a colónia a produzir uma maior criação de zangãos fornecendo inicialmente à colmeia cera laminada com alvéolos de zangãos, o que irá atrair varroas para estes alvéolos reduzindo a infestação na criação de obreiras. Desde a operculação do alvéolo até ao nascimento dos zangãos, o apicultor tem uma janela temporal em que deverá remover toda a criação operculada de zangãos, eliminando, assim, uma grande quantidade de varroas que se encontra no interior dos alvéolos (Honey Bee Health Coalition 2015).

O método de interrupção da criação e/ou da renovação da rainha baseia-se em fornecer à colónia um período no qual não exista criação operculada e como tal, não existam varroas na fase reprodutiva, mas somente na fase forética. Este procedimento,

não só provoca um atraso na evolução do parasitismo como também aumenta a eficácia quer do comportamento de limpeza, por parte das abelhas, quer da aplicação de tratamento varroicida (Loftus et al. 2016).

Atualmente em Portugal existem 18 medicamentos veterinários homologados destinados ao controlo da varroose, dos quais cinco são acaricidas de síntese, cujas substâncias ativas são moléculas químicas sintéticas, não existentes na natureza, e os restantes treze são acaricidas naturais, cujas substâncias ativas são moléculas químicas existentes na natureza. Os acaricidas de síntese autorizados são três substâncias ativas -Amitraz, -Flumetrina, -Tau-fluvalinato. Os acaricidas naturais utilizados são o Ácido oxálico, Ácido fórmico, Timol, Óleo de eucalipto, Canfora racémica e Levomentol (DGAV 2019).

Dado o clima temperado de Portugal e considerando o ciclo de vida de *V. destructor* obtém-se uma conjugação perfeita para o desenvolvimento deste ácaro. Perante isto, trabalhando em regime profissional de modo a que este seja economicamente sustentável, é praticamente impossível o controlo de *V. destructor* apenas com métodos biotecnológicos, tornando-se indispensável o tratamento de colónias com acaricidas. Para além de necessário e economicamente rentável, em Portugal, é obrigatória a utilização de acaricidas duas vezes por ano em cada colmeia (Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural 2016).

Por mais eficazes que sejam os métodos biotecnológicos, na verdade não reduzem suficientemente as taxas de infestação requerendo a sua execução demasiado tempo e trabalho. Por outro lado, o uso de acaricidas muitas vezes também é ineficaz devido à sua utilização incorreta e à existência de indivíduos de *V. destructor* resistentes à substância ativa aplicado (Relva 2010).

2.1.7. Aplicação dos Métodos de Controlo

Para se obter um tratamento efetivo contra a varroose numa colónia é fundamental conhecer a biologia, o ciclo de vida e a morfologia da varroa bem como da abelha, é preciso monitorizar a taxa de infestação e o estado evolutivo da colónia e é imprescindível relacionar estes fatores com as condições ambientais/estação do ano e com o tipo de tratamento a utilizar (Paxton et al. 2007).

O tratamento quando efetuado deve de ser aplicado no mesmo dia a todas as colónias do apiário e se possível, todos os apicultores da região deveriam proceder de igual forma na mesma altura. Esta ação evitaria a existência de apiários com elevadas taxas de *V. destructor*, entre outros com baixas taxas, impedido a rápida reinfestação dos últimos e a redução do efeito do tratamento (Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural 2016).

Em Portugal, ao ser obrigatório o uso de acaricidas duas vezes por ano, o tratamento deverá ser aplicado de modo a que tenha maior eficácia possível. É praticamente impossível calendarizar com exatidão, no entanto, as duas épocas do ano apícola em que, tendo em conta as taxas de infestação, a aplicação de acaricidas deverá ocorrer são inverno/ início de primavera e verão/ pós-cresta (Murilhas e Casaca 2004).

O tratamento de inverno/ início de primavera deverá corresponder a uma fase de início do ano apícola em que o enxame está num estado de latência, pois é, normalmente, a altura mais fria do ano, na qual existe menos alimento, a colmeia tem menos abelhas adultas e poucos ou nenhuns quadros de criação, o que faz com que a população de varroas esteja concentrada nestes ou apenas em estado forético. Estas características, conjugadas com as especificidades do ciclo de vida de *V. destructor*, cujas taxas de reprodução são mais baixas com estas condições, torna este momento o ideal para um tratamento acaricida à base de Timol, Ácido oxálico, Ácido fórmico, Amitraz ou Flumetrina (Honey Bee Health Coalition 2015; DGAV 2016).

Para além dos fatores acima apresentados, é necessário ter em consideração que, num curto período após esta fase, a colónia vai começar a evoluir ao chegar a primavera, aumentando a quantidade de criação e número de abelhas. Como o crescimento das varroas acompanha o da colónia é fundamental que nesta fase o seu número seja o menor possível, causando deste modo menos impacto na colónia durante toda a primavera e início de verão, época de maior produtividade da colmeia (Murilhas e Casaca 2004).

O verão / pós-cresta normalmente corresponde à altura do ano em que a temperatura é elevada, há escassez de água e por sua vez uma grande redução no fluxo de néctar (Sousa Neves 2006). A colmeia encontra-se no fim da época de maior produção e vai entrar num período de escassez. Tal conduz à redução da população de abelhas e da área de criação, concentrando-se a população de *V. destructor* nos alvéolos existentes, podendo, como consequência, aumentar drasticamente as taxas de infestação. O tratamento nesta altura, se as taxas de infestação o justificarem, é importante pois muitas colónias morrem neste período devido ao aumento do número de *V. destructor* por alvéolos por diminuição do número destes, levando rapidamente ao colapso da colónia. O tratamento nesta fase pode ser realizado com qualquer produto exceto: Timol, ácido oxálico e ácido fórmico pois a sua dispersão ocorre por evaporação o que nesta altura, devido às elevadas temperaturas, seria muito rápida, podendo ter efeitos nefastos para a colónia, como o abandono da colónia pelas abelhas ou morte de abelhas rainhas. A redução da taxa de infestação neste período permite à colónia entrar no outono/ inverno com uma população boa e saudável, preparada para produzir com

as florações da altura (Murilhas e Casaca 2004; Honey Bee Health Coalition 2015; DGAV 2016).

Os métodos de controlo biotecnológico devem de ser feitos ao longo de todo o ano sempre de acordo com o estado da colónia, não causando impactos negativos à mesma pelo maneiço excessivo e reduzindo a evolução do parasitismo em épocas que não se pode usar acaricidas, como por exemplo na época produtiva (Honey Bee Health Coalition 2015).

Como tal, o método da remoção da criação de zangão deve de ser feita em plena época produtiva, principalmente na primavera, mas também poderá ser no outono se as condições o permitirem (Relva 2010).

O método de interrupção da criação pode ser executado aquando da divisão do enxame ou no processo de renovação de rainhas, e como tal deve de ser feito no início da época produtiva, e se possível combinado com a aplicação do acaricida, aumentando a eficácia de ambos. Para esta ação, o fim do inverno/ início da primavera e o fim do verão/outono são as épocas preferenciais (Pascoal 2012).

A renovação de ceras deve ser efetuada gradualmente ao longo de todo o ano exceto nas alturas de latência ou de carência de alimento (FNAP 2017). O uso de estrados sanitários é feito durante todo o ano devendo serem limpos 3 a 4 vezes por ano (CAP – Departamento Técnico 2007).

Os acaricidas devem ser variados, pois caso se use sempre o mesmo, o apicultor estará a fazer uma seleção de *V. destructor* resistente ao produto que constantemente utiliza levando à sua ineficácia. Para além dos prejuízos nas colmeias, devido à ineficácia de tratamento, a existência de ácaros resistentes é um problema global, que levará eventualmente à criação de varroas multirresistentes, que proliferarão sem que haja acaricidas capazes de as controlar, aumentando ainda mais o impacto da varroose (Murilhas e Casaca 2004).

2.2. Nosemose

2.2.1. Agente etiológico e distribuição geográfica

A noseemose é uma doença que afeta as abelhas adultas, sendo causada por um fungo unicelular que pertence à classe Microsporidia, família Nosematidae, género *Nosema*, espécies *Nosema apis* e *Nosema cerana* (Anggraini and Oliver 2015). A infeção causada por *Nosema apis* em *Apis mellifera* europeias adultas é conhecida há mais de cem anos, tendo sido descrita, pela primeira vez, em 1909 por Zander. (Mariano et al. 2010)

No ano de 2005 foi, pela primeira vez, detetado *Nosema cerana* em *Apis mellifera*. Até esta data esta espécie de fungo apenas tinha sido descrita em abelhas

melíferas asiáticas (*Apis cerana*) (Goblirsch 2018). No entanto, no início do século XXI, o fungo difundiu-se por praticamente toda a Europa (Espanha, França, Alemanha, Suíça, Dinamarca, Finlândia, Grécia, Hungria, Holanda, Reino Unido, Itália e Polónia), atacando fortemente a abelha europeia. Em 2010 já se encontrava em praticamente todos os países europeus incluindo Portugal (Mariano et al. 2010).

2.2.2. Biologia e Ciclo de Vida

O fungo *Nosema* infeta apenas abelhas adultas e ocorre quando estas ingerem esporos provenientes de dejetos de abelhas infetadas (CAP – Departamento Técnico 2007).

Após a ingestão, quando os esporos chegam ao intestino médio, injetam o material genético infeccioso no interior das células. multiplicam-se, aproximadamente durante 9 dias, causando o colapso celular e libertação de novos esporos novamente para o intestino. Estes esporos são posteriormente excretados pelas abelhas, reiniciando-se o ciclo (Oliver 2007)

A Nosemose tem diferentes comportamentos em colónias infetadas durante o ano, dependendo das condições climáticas, da percentagem de abelhas atingidas pela doença e da resposta que cada colónia possui contra o parasitismo (Paxton et al. 2007). A infeção por *N. apis* tem uma prevalência superior em climas frios e húmidos e durante o inverno e início de primavera. Já a infeção por *N. cerana* é menos influenciada pelo clima tendo uma incidência mais constante entre climas e épocas do ano, um dos fatores que aumenta a sua patogenicidade para a espécie parasitada (Mohammadian et al. 2018).

2.2.3. Patogenicidade e Sinais Clínicos

A patogenicidade e sinais clínicos resultantes da infeção por *N. apis* e *N. cerana* são distintos. Na infeção por *N. apis* os sinais clínicos são bastante evidentes, enquanto que em *N. cerana* são consideravelmente inaparentes até que exista um nível de infestação bastante elevado (Oliver 2019). O parasitismo por *N. ceranae* venceu o parasitismo por *N. apis*, sendo atualmente o agente responsável pela grande maioria dos casos de nosebose (Burnham 2019).

A espécie *N. ceranae* afeta as colmeias quer ao nível da colónia quer ao nível das abelhas. As abelhas doentes revelam deficiências na digestão e na absorção de nutrientes, resultando num subdesenvolvimento das glândulas hipo-faríngeas, que conduz a um decréscimo na quantidade e qualidade da geleia-real produzida, afetando, conseqüentemente, a dinâmica proteica em toda a colónia. Esta deficiência na nutrição influencia ainda a capacidade de coleta de mel e pólen das abelhas e a sua capacidade de orientação. Neste contexto, para além de reduzirem a sua atividade ainda conduzem a muitas derivas de abelhas, com a conseqüente dispersão da doença e aumento da

taxa de mortalidade destes insetos. Com a presença desta infeção no organismo, a abelha revela sinais de stress, resultando num decréscimo na resposta imunitária e no comportamento higiénico, facilitando a entrada de vírus e de outros agentes patogénicos na colmeia. Todos estes fatores conjugados causam um grande impacto na colónia. Quando existe uma grande percentagem de abelhas afetadas na colónia, esta entra em colapso porque não existe um número suficiente de abelhas saudáveis para a manter em funcionamento, acabando muitas vezes na sua morte (Oliver 2019).

2.2.4. Diagnóstico

O diagnóstico de Nosemose pode ser feito pelo apicultor quando este avalia a colónia, no entanto, este método é muito falível, sendo que para se efetuar um correto diagnóstico da doença é necessário recorrer a técnicas laboratoriais.

Para tal, o técnico apícola deve colher algumas abelhas campeiras (60 a 120 abelhas) à entrada da colmeia de forma a colher apenas abelhas adultas nas quais há maior probabilidade de encontrar doença. Em laboratório, deve-se macerar o abdómen das abelhas colhidas, com recurso a um almofariz e a água destilada, de forma a obter-se uma mistura que contenha o seu conteúdo intestinal. Posteriormente coloca-se uma gota da mistura obtida entre lâmina e lamela, observando-se os esporos de *Nosema* spp. ao microscópio ótico com uma ampliação de 100x. Para se realizar uma contagem efetiva dos esporos deve-se utilizar uma câmara de Neubauer (Fries et al. 2013).

2.2.5. Métodos de controlo

Na noseemose, bem como noutras doenças das abelhas, o principal método de controlo baseia-se na prevenção. O tratamento mais efetivo é através do uso de antibióticos, no entanto, em toda a Europa é completamente proibido (Mariano et al. 2010).

No maneio profilático das colmeias o apicultor deve então adotar medidas como:

- Escolha dos locais dos apiários, evitando zonas excessivamente húmidas ou sombreadas;
- Estimulação das colónias mais fracas, com alimentação energética e proteica, antes da entrada no inverno;
- Renovação periódica de quadros com ceras velhas substituindo-os por quadros de cera laminada, reduzindo-se a possível existência de esporos, estimulando a colónia e aumentando a área útil de criação;
- Substituição de rainhas velhas ou de má qualidade por rainhas jovens, com postura vigorosa e de elevado comportamento higiénico (CAP – Departamento Técnico 2007; Mariano et al. 2010).

Como métodos de combate à nosemose em colmeias doentes o apicultor pode fornecer suplementos naturais probióticos e extratos de plantas que tenham o potencial de reduzir gradualmente a percentagem de esporos nas abelhas (Mariano et al. 2010).

2.3. Ascosferiose

2.3.1. Agente etiológico e distribuição geográfica

A ascosferiose é uma doença de origem fúngica, provocada pelo fungo *Ascosphaera apis*, afetando *Apis mellifera* exclusivamente durante o estado larvar inicial (Aronstein and Murray 2010).

Foi identificada pela primeira vez em 1970 nos Estados Unidos da América e México (CAP – Departamento Técnico 2007). Atualmente é uma doença que está presente em todos os países europeus, sendo considerada endémica em Portugal (DGAV-Divisão de Epidemiologia e Saúde Animal 2018).

2.3.2. Biologia e ciclo de Vida

O fungo *Ascosphaera apis* prolifera nas colónias devido à produção de esporos. Estes esporos podem-se manter viáveis nas ceras até 15 anos, o que, caso não haja um bom manejo das colónias evitando contaminações, poderá ser um grave problema numa exploração apícola. A infeção inicia-se ao 3º ou 4º dias de vida das larvas, quando estas ingerem os esporos do fungo conjuntamente com a alimentação fornecida pelas obreiras. Após a ingestão, os esporos germinam no interior do intestino das larvas logo após a operculação dos alvéolos, resultando na sua morte e mumificação (CAP – Departamento Técnico 2007).

2.3.3. Patogenicidade e Sinais Clínicos

Após a infeção e mumificação das larvas observam-se dois tipos de desenvolvimento: a) usando a infeção é feita por micélios de um só sexo as larvas mumificadas são de cor branca (cria giz); b) quando existe a infeção e reprodução do fungo no alvéolo da larva e havendo a formação de ascocistos, verifica-se presença de larvas mumificadas negras (Pascoal 2012).

Quando uma colónia está infetada com ascosferiose podem-se observar no chão, à frente da colmeia e no patim de entrada, várias larvas mumificadas. Ao abrir a colmeia e inspecionar os quadros de criação, são facilmente visíveis várias larvas desfeitas, decapitadas dentro dos alvéolos em variados locais da colmeia (Aronstein and Murray 2010).

Com a evolução da doença surge uma colmeia fraca, debilitada e que, mesmo com boas condições de entrada de pólen e néctar, não evolui, podendo mesmo resultar na morte da colónia (CAP – Departamento Técnico 2007).

2.3.4. Métodos de Controlo

O principal método de controlo desta doença baseia-se na prevenção da propagação de esporos de colónias infetadas para colónias saudáveis, sendo o apicultor o elo de maior importância neste processo. Grande parte das infeções por *A. apis* é causada por ação humana resultante de más práticas de higiene no manuseio das colmeias. Apenas uma pequena parte da propagação da doença é feita pelas abelhas e zangãos que derivam naturalmente entre colmeias (Pascoal 2012). No entanto, devem ser retiradas todas as colmeias que demonstrem doença para um outro apiário - um apiário de quarentena - separando assim as colmeias doentes das saudáveis minimizando muito a probabilidade de dispersão da doença (Flores et al. 2000).

A ascosferiose é uma doença que se manifesta principalmente em épocas com alguma humidade como a primavera e o outono. Um manuseio inadequado e colónias enfraquecidas, são dois fatores muito importantes no desenvolvimento e agravamento da doença. Para que tal não aconteça, o apicultor deve manter as suas colónias controladas, fortes e livres de outras doenças, como a varroose. Nas colmeias doentes deve-se tentar eliminar ao máximo todo o material infetante, devem ser retirados das colmeias os quadros com criação afetada e destruí-los o mais rapidamente possível para que não haja dispersão de esporos (CAP – Departamento Técnico 2007).

Com a finalidade de manter as colónias fortes e saudáveis, o apicultor pode fazer uma troca de rainhas, retirando a rainha velha e introduzindo uma nova rainha, de preferência selecionada, da qual se espere um comportamento higiénico e vigor produtivo elevados. A alimentação estimulante das colónias, com alimento líquido energético e alimento proteico, também é uma ação importante, aumentando o número de abelhas saudáveis e reduzindo o stress da colmeia (Flores et al. 2000; Aronstein and Murray 2010).

2.4. Senotainiose

2.4.1. Agente etiológico e distribuição geográfica

O parasitismo de *Apis mellifera* por dípteros é já há muito conhecido um pouco por todo o mundo. A espécie responsável por este parasitismo varia consoante a sua localização geográfica. A espécie *Senotainia tricuspis*, pertencente à família Sarcophagidae, é o agente responsável pela senotainiose, podendo ser encontrada na Europa, Tunísia e Norte de África (Orantes Bermejo et al. 1996; Pires, S.M.A., Cadavez, V., Valério 2011).

2.4.2. Biologia e ciclo de Vida

A espécie *S. tricuspis* é um endoparasita da abelha europeia, provocando mífases que podem ser completamente insignificantes ou, pelo contrário, podem ser bastante graves. Este parasitismo ocorre predominantemente em climas quentes e soalheiros, estando bastante difundido pelos países mediterrâneos, quase exclusivamente durante o mês de setembro. O parasitismo da abelha ocorre quando a fêmea de *S. tripuspis* ataca a abelha adulta, assim que esta inicia o voo a partir da colmeia, depositando no seu tórax uma ou duas larvas. Estas larvas iniciam aí o parasitismo, penetrando através da fina membrana existente entre a cabeça e o tórax, alojando-se nos músculos torácicos. Depois de instalada no interior do tórax a larva muda para o segundo estado larvar, no qual permanece até à morte da abelha. Nessa altura, a larva continua a alimentar-se dos músculos torácicos, muda para o terceiro estado larvar e, finalmente, abandona o hospedeiro, enterrando-se no chão. Passados 7 a 12 dias eclode como adulto (Hamida 1999).

2.4.3. Métodos de Controlo

Os métodos de controlo para esta doença baseiam-se na redução do número de *S. tricuspis* adultas, sendo eles a colocação de armadilhas, em garrafas com atrativo líquido ou através de inseto coladores nos telhados das colmeias, e pela cobertura do chão imediatamente á frente da entrada das colmeias, de forma a impedir que as larvas de *Senotainia* se enterrem, interrompendo assim o seu ciclo de vida (Silva 2011).

2.5. Loque Americana

2.5.1. Agente etiológico e distribuição geográfica

A Loque americana é a doença mais destrutiva para uma colónia de *A. mellifera*. É provocada pela bactéria gram positiva *Paenibacillus larvae* (Garção 2010). Ao contrario do que o seu nome indica, a loque americana não está limitada ao continente norte americano, é uma das doença com uma dispersão a nível mundial (Hansen and Brødsgaard 2001; Chemurot et al. 2016).

2.5.2. Biologia e ciclo de vida

Esta doença afeta exclusivamente a criação das colónias de *A. mellifera* em duas fases: a fase vegetativa e a fase de esporos, sendo que apenas possui potencial de contágio para as abelhas na fase de esporos. Estes esporos são altamente contagiosos e resistentes ao calor extremo, frio e compostos químicos, podendo ficar viáveis nos favos de cera, no mel e nos utensílios apícolas até 35 anos, havendo por consequência bastantes reinfeções. A infeção da abelha dá-se quando esta ingere esporos que estão presentes no mel ou ceras, durante comportamentos de pilhagem, e também nos

esporos presentes nas larvas mortas já infetadas, durante o comportamento de limpeza da colónia. Quando a abelha é infetada comporta-se apenas como portadora das bactérias que irão infetar uma nova larva aquando da alimentação. As larvas já mortas possuem milhões de esporos de loque, tornando praticamente impossível eliminar com sucesso os esporos do interior da colmeia. Através da trofilaxia (comportamento de troca e desidratação de néctar entre abelhas) as abelhas infetadas também disseminam os esporos por todas as abelhas da colmeia (Garção 2010; Pascoal 2012).

2.5.3. Patogenia e Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da loque americana são muitas vezes negligenciados, no entanto, para um apicultor atento e informado, são muito claros. Uma colónia afetada com loque demonstra:

- Cheiro característico, proveniente da morte e putrefação das larvas;
- Quadros de criação com larvas mortas liquefeitas de cor acastanhada;
- Criação bastante dispersa pelos quadros, com um padrão rendilhado, como resultado da remoção, por parte das abelhas, das larvas mortas;
- Alvéolos com o opérculo deprimido e colapsado.

No campo, como método de confirmação da doença, o apicultor pode perfurar vários alvéolos, esmagando as larvas e observando o líquido que se forma neste procedimento (Figura 9). Se o líquido obtido tiver coloração castanha e uma consistência pastosa, formando um filamento é sinal de loque (CAP – Departamento Técnico 2007; Genersch 2010).



Figura 9: Filamento (larva filante) – sinal de loque americana (adaptado de mieldealaga.com/enfermedades/loque_americana.html)

2.5.4. Diagnóstico e tratamento

Quando há suspeita de loque o apicultor deve consultar o técnico apícola da sua associação ou cooperativa de apicultores ou contactar os serviços de sanidade apícola e colher uma amostra de favo e enviar para um laboratório de referência para efetuar a confirmação laboratorial. A loque americana em Portugal é uma doença de declaração obrigatória (DGAV 2020).

Quando o diagnóstico de loque é positivo o apicultor deve de atuar muito rapidamente para evitar que a doença se propague por outras colmeias do apiário. Durante a noite, quando todas as abelhas se encontram dentro da colmeia, o apicultor deve fechar a colmeia de forma a que nenhuma escape e deve destruir, por meio de incineração, toda a colónia. É de extrema importância desinfetar cuidadosamente todo o material apícola que contactou com a colónia infetada (CAP – Departamento Técnico 2007; Pascoal 2012).

Parte III – Estudo Sanitário de um Apiário da Região Centro Portugal – identificação, monitorização e controlo dos principais agentes etiológicos.

1. Objetivos

- a) Realização de 3 estudos sanitários num apiário da região Centro de Portugal - no outono de 2017 (mês de outubro), no inverno de 2018 (mês de janeiro) e na primavera de 2018 (mês de maio), em 20 colmeias, para deteção de agentes patogénicos em *Apis mellifera iberiensis*.
- b) Após a realização das colheitas do 2º estudo sanitário, proceder à aplicação de 4 acaricidas contra varroa: a) Apivar® (amitraz 15g por tira); b) Thymovar® (óleo essencial de timol 15g impregnado em placas de celulose); c) Apiguard® (Timol 25% p/p por 50 g de gel aquoso de libertação prolongada); d) Apilife-Var® (mistura de óleos essenciais de timol 8,00g, óleo de eucalipto 1,72g, cânfora racémica 0,39g, levomentol 0,39g em tiras impregnadas) e posterior comparação dos resultados obtidos.
- c) Monitorização das doenças existentes no apiário no período em estudo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Descrição do apiário em estudo










Para a realização deste estudo foram usadas 20 colónias de um apiário da Região Centro de Portugal, situado em São Pedro de Tomar, concelho de Tomar, distrito de Santarém (Figura 10).

A floração presente nesta região proporciona duas épocas de produção, sendo uma no final do inverno e a outra na primavera. A floração de inverno é composta por uma flora variada contendo eucalipto, urze, medronheiro e algumas ervas daninhas como saramagos, grisandra e azedas. A floração de primavera é ainda mais variada, predominando o rosmaninho, a esteva, o tojo e a soagem, e uma grande abundância de ervas daninhas como saramagos, grisandra e erva-azeda constituindo a floração secundária (Tabela1).



Figura 10: Vista de satélite do apiário (adaptado de [googlemaps.com](https://www.google.com/maps))

Tabela 1: Principais espécies de plantas presentes na área envolvente ao apiário em estudo (adaptado de jb.utad.pt).

Floração de Inverno		Floração de Primavera	
Eucalipto - <i>Eucalyptus globulus</i>		Rosmaninho - <i>Lavandula stoechas</i>	
Urze - <i>Calluna vulgaris</i>		Soagem - <i>Echium plantagineum</i>	
Medronheiro-Arbutus unedo		Esteva - <i>Cistus ladanifer</i>	
Azedas - <i>Oxalis pes-caprae</i>		Saramagos - <i>Raphanus raphanistrum</i>	
			

No que se refere à localização e ao enquadramento do apiário em estudo o mesmo encontra-se situado numa meia encosta, direcionado para sul e abrigado de ventos norte/noroeste. O local é pouco húmido, com características de clima mediterrâneo e com fácil acesso a água.

Relativamente à presença de outros animais inimigos das abelhas, incluindo insetos, observam-se ratos, que tentam entrar para as colónias na época mais fria, e também formigas, vespas germânicas, vespas asiáticas, *Galleria mellonella* (traça da cera) e *Oplostomus fuliginus* (besouros de grandes dimensões que se alimentam de mel e cera) durante as épocas mais quentes.

2.2. Critério de seleção das colmeias

As colónias que integraram o estudo foram selecionadas tendo em conta o seu historial e estado produtivo à data de início do estudo:

- Todas as colmeias em estudo foram criadas no mesmo dia, 22 de abril de 2017, por meio de desdobramento (retirada de 3 quadros de criação e 1 quadro de reservas de colmeias saudáveis prontas a produzir). Passados 3 dias foram introduzidas rainhas virgens, provenientes de uma colmeia com elevada produtividade e comportamento higiénico, iniciando a postura e o posterior desenvolvimento da colónia ao fim de 21 dias. Os restantes quadros que compõem a colmeia foram introduzidos com cera laminada;

- Todas as 20 colónias descendiam da mesma colónia-mãe, ou seja, todas as rainhas eram irmãs de mãe, reduzindo a probabilidade de existência de erros associados à variabilidade genética, no entanto, este erro não é completamente eliminado pois a fecundação das rainhas foi feita naturalmente por vários zangãos de origem desconhecida;

- Todas as 20 colónias em estudo estavam num estado evolutivo e produtivo semelhante, contendo entre 2 a 4 quadros com criação 2 a 3 quadros com mel e uma população de abelhas suficiente para o bom funcionamento da colónia. O número de quadros com criação, mel e a quantidade aparente de abelhas foram os critérios usados na classificação do estado evolutivo e produtivo das colónias;

- Em todas as colónias selecionadas para o estudo foi feita uma aplicação de um método de controlo de varroose no final da cresta com amitraz 15g por tira (Apivar®), a 05 de agosto de 2017.

2.3. Estudo Sanitário

Os estudos sanitários foram efetuados em 3 períodos distintos do ciclo produtivo das colónias de forma a avaliar a evolução dos agentes patogénicos. O primeiro estudo foi realizado no outono, a 10 de outubro de 2017, o segundo no fim do inverno, a 26 de janeiro de 2018, e o terceiro no fim da primavera, a 02 de maio de 2018.

A realização dos estudos sanitários dividiu-se em duas partes, tendo a primeira sido realizada em campo, onde foram colhidas amostras de favos de criação e abelhas das colónias, e a segunda no laboratório do Posto Apícola Nacional do INIAV, na Tapada da Ajuda, onde foi feito o diagnóstico dos agentes patogénicos existentes nas amostras colhidas e a quantificação das percentagens de infestação.

2.3.1. Metodologia utilizada na recolha no campo:

- Abelhas adultas: Retirou-se lentamente um quadro contendo criação em todos os estados larvares, do centro do ninho da colmeia (local onde se encontram uma maior diversidade de abelhas, desde as nutrizes recém-nascidas até a abelhas campeiras recém-chegadas, obtendo uma amostragem mais representativa da realidade da colmeia), e com um único movimento forte e rápido, sacudiu-se o quadro cheio de abelhas para o interior de uma tampa de colmeia.

Quando a tampa estava coberta de abelhas, com suaves pancadas na parede lateral, juntaram-se todas as abelhas numa mesma área, e com o auxílio de um copo de plástico recolheu-se uma amostra contendo em média



Figura 11: Amostras de abelhas e favo de criação (fotografia do autor)

150 abelhas (Figura 11). As amostras após terem sido colhidas foram congeladas -20°C o mais rapidamente possível.

- Favos com criação: Após se terem sacudido todas as abelhas do quadro acima descrito, com o auxílio de uma faca, cortou-se um quadrado de 12x12 cm contendo cerca de 150-350 alvéolos operculados. A amostra colhida foi colocada em caixas de cartão próprias para a finalidade e congelada à temperatura de -20°C (Figura 11).

2.3.2. Análise laboratorial das amostras colhidas:

Em laboratório foram feitos testes específicos para a pesquisa de cada agente patogénico. Os agentes etiológicos pesquisados foram os causadores de Varroose, Nosemose, Ascosferiose, Senotainiose e Loque Americana.

2.3.2.1. Pesquisa de *V. destructor*

A pesquisa de varroa foi feita quer nas amostras de abelhas quer nas de favos de criação:

a) Pesquisa de *V. destructor* em abelhas:

Retiraram-se os copos de plástico do congelador e retiraram-se as abelhas do seu interior o mais rapidamente possível para evitar o descongelamento. Confirmar se não ficou nenhuma varroa colada às paredes do copo.

Colocaram-se todas as abelhas numa superfície lisa para efetuar a contagem exata destes insetos. Após a contagem, todas as abelhas foram colocadas num frasco de vidro, ao qual se adicionou álcool etílico a 96% até submergir todos os indivíduos (Figura 12). De seguida, agitou-se o frasco vigorosamente durante cerca de 30 segundos para que as varroas se soltassem das abelhas por ação mecânica.



Figura 12: Aspeto da lavagem de abelhas para pesquisa de *V. destructor* (fotografia do autor)

Com a finalidade de separar as varroas das abelhas usou-se um conjunto de 2 filtros, tendo primeiro sido utilizado para promover a separação das abelhas das varroas e do álcool etílico e o segundo para permitir separar as varroas do álcool. Depois de vertido o conteúdo do frasco para o sistema de filtros as abelhas são lavadas com água corrente a fim de minimizar a possibilidade de ainda haver varroas fixadas às abelhas.

Por fim, todas as varroas retidas no segundo filtro foram contadas e registou-se o seu número.

b) Pesquisa de *V. destructor* em favo de criação:

Retirou-se a amostra de favo contendo a criação da arca congeladora e contou-se rapidamente o número de células operculadas. Assim que se finalizou a contagem, iniciou-se o mais rapidamente possível a desoperculação dos alvéolos antes da amostra

descongelar (enquanto a amostra está congelada o manuseamento e corte da mesma torna-se consideravelmente mais fácil e rápido).

Quando todas as células estavam desoperculadas (Figura 13) iniciou-se a retirada das larvas do interior dos alvéolos. Este processo foi feito com recurso à força mecânica da água corrente sobre as larvas, retirando-as do interior dos alvéolos. Assim que se inicia este passo é necessário ter previamente preparado o sistema de dois filtros, acima referido, de forma a que as larvas e as varroas assim que sejam removidas dos alvéolos caíam diretamente sobre estes, evitando que haja material de estudo desperdiçado e a existência de erros de contagem. Os filtros permitem a separação das varroas das larvas e a sua posterior contagem e registo do número de ácaros.



Figura 13: Amostra de favo de criação desoperculado para pesquisa de *V. destructor*. (fotografia do autor)

2.3.2.2. Pesquisa de *N. ceranae*

Da amostra inicial de abelhas, antes da pesquisa de *V. destructor*, foram separadas 60 abelhas para se proceder ao diagnóstico de agentes etiológicos de Nosemose e Senotainiose. As abelhas, ainda congeladas, foram dissecadas de forma a separar o abdómen do resto do corpo, preservando o torácax intacto para a pesquisa de larvas de *Senotainia*.

Após separação dos abdómens das abelhas estes foram colocados num almofariz, juntamente com 45 ml de água e com um pilão promove-se a maceração da amostra (Figura 14). A amostra bem macerada apresenta-se como uma mistura de cor amarelada da qual se retira uma gota, que é colocada entre lâmina e lamela para observação ao microscópio ótico, com uma ampliação de 400x.



Figura 14: Maceração de abdómens de *A. mellifera* para pesquisa de agentes de Nosemose (fotografia do autor)

2.3.2.3. Pesquisa de *S. tricuspis*

A pesquisa de larvas de *S. tricuspis* foi feita através da observação ao microscópio ótico das fibras musculares do tórax da abelha.

Para a preparação da amostra fixou-se uma abelha sobre uma cortiça em decúbito dorsal. Com uma lâmina de bisturi, retirou-se a cabeça da abelha e cortou-se uma fatia de tórax que se colocou em ácido láctico numa placa de Petri, com 6cm de diâmetro,

durante pelo menos 12h. A parte restante da abelha foi colocada em outra placa de Petri, para posterior esmagamento.

Após 12h em ácido láctico, retirou-se a fatia de tórax e colocou-se sobre papel absorvente e deixou-se a repousar cerca de 5 minutos para que a maior parte do ácido láctico fosse absorvida. De seguida procedeu-se ao esmagamento da fatia de tórax entre duas lâminas e fixaram-se os bordos das mesmas com fita-cola (Figura 15). Por fim procedeu-se à observação ao microscópio ótico, em objetivas de 4x e/ou 10x.

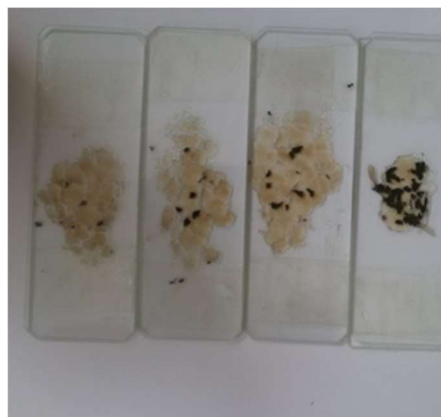


Figura 15: Lâminas contendo tórax esmagados de *A. mellifera* para pesquisa de *S. tricuspis*. (fotografia do autor)

2.3.2.4. Pesquisa de *Ascospaera apis*

A pesquisa de agentes de ascosferiose foi realizada em dois momentos: a) No momento da visita ao apiário, durante a colheita de amostras das colmeias, as rampas de voo e o chão imediatamente à frente das colmeias foram inspecionados para a procura de larvas giz (sinal característico da presença da doença), registando-se quando se havia observado alguma evidência de doença, e b) em laboratório. Sendo esta uma doença que afeta exclusivamente a criação, a pesquisa deste agente patogénico foi feita apenas nas amostras de favo de criação.

Assim que a amostra de favo é retirada da arca congeladora e imediatamente antes da sua desoperulação para a contagem de varroas, é feita uma análise visual á amostra em que se procura evidências da existência de larvas mumificadas e/ou negras ou decapitadas, registando-se o resultado da pesquisa.

2.3.2.5. Pesquisa de *Paenibacillus larvae*

A pesquisa de Loque americana é realizada em laboratório com recurso á visão e olfato. Sendo uma patologia que afeta exclusivamente a criação da colónia, a pesquisa da mesma é feita apenas nas amostras de favo de criação.

Após a desoperulação das células das amostras de favo de criação para pesquisa de *V. destructor* e antes de iniciar a lavagem da mesma, realiza-se uma verificação de existência de sinais da doença. São procurados sinais como o cheiro característico e larvas putrefactas, de coloração acastanhada que quando perfuradas formam um filamento filante castanho. Após esta observação, é registado o resultado da mesma.

2.4. Aplicação de 4 medicamentos utilizados como métodos de controlo da varroose

Sabendo que a varroose é uma constante na zona em estudo, e de forma a extrair mais informações e obter estudos mais completos sobre a evolução da doença e as suas formas de controlo, foi aplicado, entre o segundo e o terceiro estudos sanitários, no dia 28 de março de 2018, um tratamento de controlo de varroa com a finalidade de comparar a eficácia de quatro medicamentos veterinários diferentes, contendo com substâncias ativas o amitraz e o timol com a seguinte composição:

- Amitraz a 12,5% em tiras (Apivar®);
- Timol 15g em placas de celulose (Thymovar®);
- Timol a 25% p/p por 50 g de gel aquoso de libertação prolongada (Apiguard®);
- Mistura de óleos essenciais de timol 8,00g, óleo de eucalipto 1,72g, cânfora racêmica 0,39g, levomentol 0,39g em tiras impregnadas (Apilife-Var®).

2.4.1. Caracterização dos grupos de colmeias a incluir no ensaio dos 4 medicamentos contra a varroose

Das 20 colmeias em estudo foram definidos 5 grupos contendo cada um 4 colmeias. Quatro desses grupos foram destinados à aplicação de métodos de controlo para posterior comparação da eficácia dos produtos utilizados, tendo o 5º grupo constituído o grupo controlo em que não foi aplicado qualquer tratamento antiparasitário.

Na criação dos grupos em que foi aplicado um método de controlo contra a varroose baseou-se na percentagem de infestação por *V. destructor* e na força aparente da colónia (relação entre quadros de criação, quadros de reservas e quantidade de abelhas adultas na colónia). Cada grupo foi composto de forma a que houvesse no máximo 1 colónia mais fraca e que tivesse pelo menos uma colmeia com uma taxa elevada de infestação por varroa e uma colmeia com uma baixa taxa de infestação. O grupo controlo foi criado apenas com colmeias que tinham taxa de infestação por varroa inferior a 2% e contendo uma colónia forte e uma colónia fraca.

Dos grupos de colmeias criados para aplicação e comparação da eficácia dos métodos de controlo contra a varroose foram:

- Grupo 1 – Colmeias nº1; nº2; nº3; nº5; - Aplicação de Apivar®;
- Grupo 2 – Colmeias nº 6; nº7; nº13; nº14; - Aplicação de Thymovar®;
- Grupo 3 – Colmeias nº4; nº8; nº9; nº12; - Aplicação de Api-LifeVar®;
- Grupo 4 – Colmeias nº15; nº17; nº18, nº20; - Aplicação de Apiguard®.

O grupo 5 (controlo), incluiu as colónias nº 10, nº11, nº 16, nº19 nas quais não foi aplicado nenhum tratamento, e assim servirem de controlo para o ensaio.

2.4.2. Aplicação dos métodos de controlo

A aplicação dos métodos de controlo foi feita de acordo com as recomendações existentes na REM de cada um dos medicamentos.

No grupo 1, para o tratamento com a substância ativa amitraz 15g por tira (Apivar®), foram aplicadas 2 tiras, em cada colmeia. O tratamento baseou-se numa única aplicação, em que as tiras foram dispostas verticalmente no centro do quadro, entre o último e penúltimo quadro de criação de ambos os lados do ninho (Figura 16), permanecendo ativo na colmeia



Figura 16: Aplicação de Apivar® (fotografia do autor)

durante 6 semanas. No final deste período as tiras de tratamento foram removidas.

No grupo 2, para o tratamento com a substância ativa timol 15g em placas de celulose (Thymovar®), foi aplicada 1 tira, dividida em 2 metades iguais, sendo estas colocadas na periferia da zona do ninho com quadros de criação (Figura 17). Este tratamento constou de duas aplicações, espaçadas por 21 dias, tendo sido a primeira tira colocada no início do tratamento e a segunda passados 21 dias.



Figura 17: Aplicação de Thymovar® (fotografia do autor)

No grupo 3 foi feito o tratamento com a mistura de óleos essenciais de timol 8,00g, óleo de eucalipto 1,72g, cânfora racêmica 0,39g, levomentol 0,39g (Api-LifeVar®). Este tratamento consistiu na aplicação de 1 tira contendo o medicamento (Figura 18), a cada 7 dias durante 28 dias, perfazendo um total de 4 aplicações. Para a execução deste tratamento foi necessário dividir cada tira em 4 partes iguais, aplicando-as sobre os quadros que delimitam o ninho de criação.



Figura 18: Aplicação de Apilife-Var® (fotografia do autor)

No grupo 4, o tratamento realizado consistiu na aplicação da substância ativa timol 25% por 50g de gel aquoso (Apiguard®). Este tratamento consistiu na introdução no centro da colmeia de um recipiente com 50 g de um gel aquoso contendo timol na concentração de 25% (Figura 19) tendo sido efetuadas duas aplicações por colónia, com um intervalo de 14 dias.



Figura 19: Aplicação de Apiguard® (fotografia do autor)

2.5. Dados meteorológicos

As informações sobre precipitação e temperaturas máximas e médias registadas na área durante o período de estudo foram obtidas no site do Instituto Português do Mar e da Atmosfera.

3. Resultados

3.1. Estudos Sanitários

3.1.1. Primeiro estudo sanitário

3.1.1.1. Parâmetros meteorológicos

Nos 3 meses de outono, entre 1 de setembro e 30 de novembro, registaram-se valores muito baixos de precipitação e apenas em 13 dias foram observados valores de precipitação superiores a 1 mm (valor médio diário no continente). Nos dias em que ocorreu precipitação o valor médio do continente foi sempre inferior a 15 mm (IPMA 2017).

O mês de outubro foi o mais quente dos últimos 87 anos e o valor médio da temperatura máxima do ar foi o mais alto desde 1931. Registaram-se valores máximos (recordes) de temperatura máxima e mínima do ar. Ocorreram 2 ondas de calor: de 1 a 16 e de 23 a 30 de outubro, que abrangeram grande parte do território do continente, com exceção das regiões do litoral. A primeira onda de calor teve uma duração máxima de 15/16 dias e está entre as mais longas para o mês de outubro (IPMA 2017).

3.1.1.2. Agentes patogénicos

Dos cinco agentes pesquisados - *V. destructor*, *Nosema spp*, *S. tricuspis*, *Ascosphaera apis* e *Paenibacillus larvae*- apenas a presença de *V. destructor* e *S. tricuspis* foi registada.

A pesquisa de *V. destructor* feita em abelhas adultas resultou em apenas dois resultados positivos (Colmeias nº 12 e nº19) com taxas de infestação inferiores a 1%,

enquanto que em favos de criação obtiveram-se 12 resultados positivos (Colmeias nº 1, nº3, nº4, nº6, nº7, nº12, nº13, nº14, nº15, nº17 e nº20), com uma taxa de infestação média de 0,44%, variando entre 0% e 5,88%.

Quanto à pesquisa de *S. tricuspis* todas as 20 colmeias em estudo foram positivas. A percentagem de infestação média foi de 12,12%, variando entre valores mínimos de 1,67% e máximos de 41,67% (Tabela 2).

Tabela 2: Agentes etiológicos observados no 1º estudo efetuado no outono (10 de outubro) de 2017 em 20 colmeias

Colmeia nº	Agentes etiológicos observados											
	<i>V. destructor</i>						<i>Nosema</i> spp.	<i>S. tricuspis</i>			<i>P. larvae</i>	<i>A. apis</i>
	V.	Abelhas	%	V.	Alvéolos	%	Pos/Neg	S.	Abelhas	%	Pos/Neg	Pos/Neg
1	0	174	0,00	5	155	3,23	Neg	6	60	10,00	Neg	Neg
2	0	162	0,00	0	167	0,00	Neg	25	60	41,67	Neg	Neg
3	0	129	0,00	1	162	0,62	Neg	6	60	10,00	Neg	Neg
4	0	103	0,00	4	108	3,70	Neg	4	60	6,67	Neg	Neg
5	0	115	0,00	0	174	0,00	Neg	5	60	8,33	Neg	Neg
6	0	150	0,00	8	211	3,79	Neg	4	60	6,67	Neg	Neg
7	0	116	0,00	6	102	5,88	Neg	4	50	8,00	Neg	Neg
8	0	137	0,00	0	168	0,00	Neg	1	60	1,67	Neg	Neg
9	0	163	0,00	0	201	0,00	Neg	6	60	10,00	Neg	Neg
10	0	139	0,00	0	186	0,00	Neg	16	60	26,67	Neg	Neg
11	0	145	0,00	0	221	0,00	Neg	10	60	16,67	Neg	Neg
12	1	149	0,67	2	104	1,92	Neg	1	60	1,67	Neg	Neg
13	0	155	0,00	3	223	1,35	Neg	5	60	8,33	Neg	Neg
14	0	138	0,00	3	218	1,38	Neg	3	40	7,50	Neg	Neg
15	0	158	0,00	1	257	0,39	Neg	5	58	8,62	Neg	Neg
16	0	136	0,00	0	269	0,00	Neg	10	40	25,00	Neg	Neg
17	0	148	0,00	3	248	1,21	Neg	1	60	1,67	Neg	Neg
18	0	171	0,00	3	180	1,67	Neg	4	60	6,67	Neg	Neg
19	1	177	0,56	0	217	0,00	Neg	6	60	10,00	Neg	Neg
20	0	161	0,00	1	228	0,44	Neg	16	60	26,67	Neg	Neg

3.1.2. Segundo estudo sanitário

3.1.2.1. Parâmetros meteorológicos

O inverno 2017/18 foi caracterizado por valores da temperatura média do ar e da quantidade de precipitação inferiores ao valor normal classificando-se este inverno como frio e seco (IPMA 2018a).

O valor médio da temperatura média do ar em fevereiro foi o 3º valor mais baixo desde 2000 e o valor médio da temperatura mínima foi o 9º valor mais baixo desde 1931 e o 3º mais baixo desde 2000. Manteve-se a situação de seca que já se verifica desde abril, uma vez que nos meses de inverno continuaram a ocorrer valores de precipitação

inferiores ao normal. No final de fevereiro cerca de 83% do território estava em seca severa e 1% em seca extrema (IPMA 2018a).

3.1.2.2. Agentes patogénicos

Neste estudo o único agente patogénico encontrado foi o ácaro *V. destructor*. Este parasita foi encontrado em todas as amostras de abelhas adultas, com uma taxa de infestação média de 3,75%. No entanto, foi registada uma grande heterogeneidade de valores, variando entre os 27% (Colmeia nº1) como máximo e 0,6% como mínimo de. Na pesquisa de *V. destructor* em favos de criação existiram 18 resultados positivos, com uma percentagem média de infestação de 8,6%, variando entre os 45% como máximo (Colmeia nº1) e 0% como mínimo (Tabela 3).

Tabela 3: Agentes etiológicos observados no 2º estudo efetuado no inverno (26 de janeiro) de 2018 em 20 colmeias

Colmeia nº	Agentes etiológicos observados											
	<i>V. destructor</i>						<i>Nosema spp.</i>	<i>S. tricuspis</i>			<i>P. larvae</i>	<i>A. apis</i>
	V.	Abelhas	%	V.	Alvéolos	%	Pos/ Neg	L.	Abelhas	%	Pos/Neg	Pos/Neg
1	51	186	27,42	67	149	44,97	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
2	8	188	4,26	3	220	1,36	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
3	1	168	0,60	30	199	15,08	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
4	9	172	5,23	50	265	18,87	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
5	2	148	1,35	8	260	3,08	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
6	3	191	1,57	16	214	7,48	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
7	15	166	9,04	21	162	12,96	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
8	1	168	0,60	5	216	2,31	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
9	2	151	1,32	5	183	2,73	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
10	1	165	0,61	1	174	0,57	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
11	1	143	0,70	0	101	0,00	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
12	3	144	2,08	22	142	15,49	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
13	1	154	0,65	30	249	12,05	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
14	2	154	1,30	31	209	14,83	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
15	2	174	1,15	14	222	6,31	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
16	2	162	1,23	0	133	0,00	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
17	1	141	0,71	9	142	6,34	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
18	12	174	6,90	8	196	4,08	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
19	1	132	0,76	2	252	0,79	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg
20	5	133	3,76	6	208	2,88	Neg	0	60	0,00	Neg	Neg

3.1.3. Terceiro estudo sanitário

3.1.3.1. Parâmetros meteorológicos

A primavera de 2018 foi caracterizada por valores da temperatura média do ar inferiores ao normal e da quantidade de precipitação muito superiores ao valor normal classificando-se como fria e extremamente chuvosa (IPMA 2018b).

Valor médio da quantidade de precipitação superior em 4,4 vezes o valor médio mensal sendo o segundo março mais chuvoso desde 1931 (mais chuvoso em 2001). Em algumas estações, o mais chuvoso desde o início das respetivas séries. O valor médio da temperatura média do ar foi o nono mais baixo dos últimos 88 anos e foi o mais baixo desde 2000 (IPMA 2018).

3.1.3.2. Agentes patogénicos

Neste estudo sanitário foram encontradas três amostras de abelhas com resultados positivos a *Nosema spp.* pertencentes às colmeias nº6, nº17 e nº 18.

Na pesquisa de *V. destructor* em amostras de favo de criação foram obtidos dezanove resultados positivos e um negativo (Colmeia N°4), enquanto na pesquisa de varroa nas abelhas adultas foram obtidos 16 resultados positivos e 4 resultados negativos (Colmeias N° 8, N°12, N°16, N°20)

Os restantes agentes patogénicos não foram observados na primavera de 2018. (Tabela 4).

Tabela 4: Agentes etiológicos observados no 3º estudo efetuado na primavera (02 de maio) de 2018 em 20 colmeias

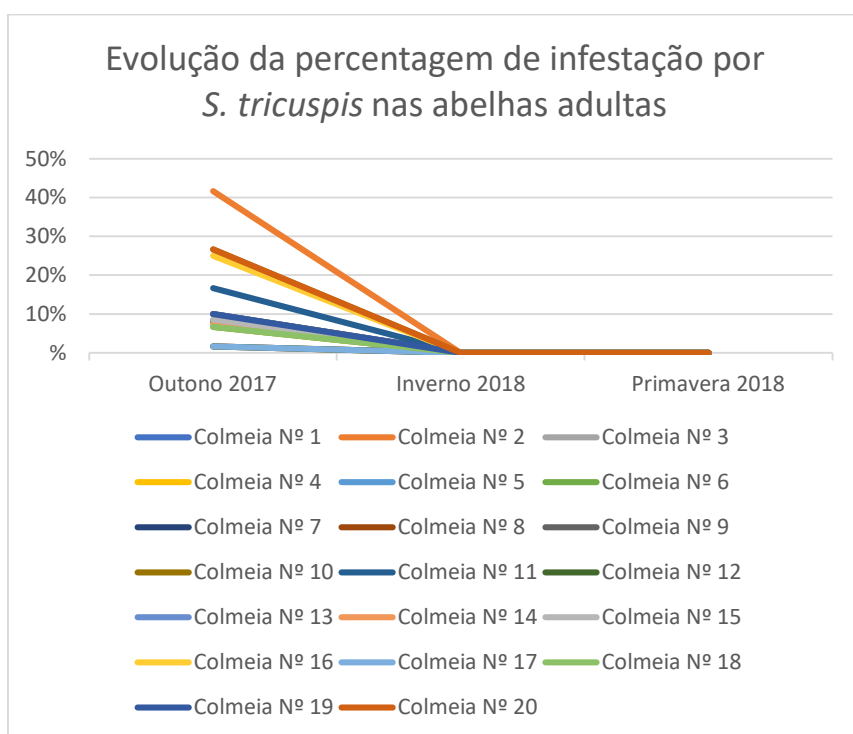
Colmeia nº	Agentes etiológicos observados											
	<i>V. destructor</i>						<i>Nosema spp.</i>	<i>S. tricuspis</i>			<i>P. larvae</i>	<i>A. apis</i>
	V.	Abelhas	%	V.	Alvéolos	%	Pos/Neg	L.	Abelhas	%	Pos/Neg	Pos/Neg
1	1	141	0,71	1	317	0,32	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
2	5	182	2,75	27	385	7,01	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
3	8	165	4,85	20	310	6,45	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
4	1	128	0,78	0	262	0,00	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
5	4	156	2,56	15	196	7,65	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
6	6	170	3,53	7	425	1,65	Pos	0	60	0,0	Neg	Neg
7	2	165	1,21	4	405	0,99	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
8	0	100	0,00	5	220	2,27	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
9	1	170	0,59	6	422	1,42	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
10	21	300	7,00	62	352	17,61	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
11	11	220	5,00	20	282	7,09	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
12	0	250	0,00	1	237	0,42	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
13	2	130	1,54	13	164	7,93	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
14	1	105	0,95	2	449	0,45	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
15	15	162	9,26	28	394	7,11	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
16	0	110	0,00	44	145	30,34	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
17	13	130	10,00	22	368	5,98	Pos	0	60	0,0	Neg	Neg
18	1	142	0,70	2	415	0,48	Pos	0	60	0,0	Neg	Neg
19	14	250	5,60	33	363	9,09	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg
20	0	280	0,00	4	320	1,25	Neg	0	60	0,0	Neg	Neg

3.2. Evolução dos agentes etiológicos das doenças apícolas ao longo dos 3 estudos sanitários

3.2.1. Senotainiose

Relativamente à evolução do agente etiológico *S. tricuspis*, obtivemos no estudo sanitário de outono de 2017 (10 de outubro) resultados positivos em todas as colmeias, com uma taxa média de infestação por colmeia de 12,12%, chegando a um máximo de 41,67%. No entanto quer no segundo, quer no terceiro estudo sanitário a percentagem de infestação de colmeias por este parasita foi de 0%, havendo uma redução 100% (Gráfico1).

Gráfico 1: Evolução da percentagem de infestação por *S. tricuspis* nas abelhas adultas desde 10 de outubro 2017 a 02 de maio de 2018



3.2.2. Evolução da Nosemose

Nos dois primeiros estudos sanitários (10/10/2017 e 26/01/2018) a percentagem de infestação de colmeias por *Nosema* spp. foi de 0%. Na realização do terceiro estudo sanitário, este parasita foi observado em 3 colónias, aumentando a percentagem de colmeias afetadas pela patologia para 15%.

3.2.3. Evolução de Loque Americana e Ascosferiose

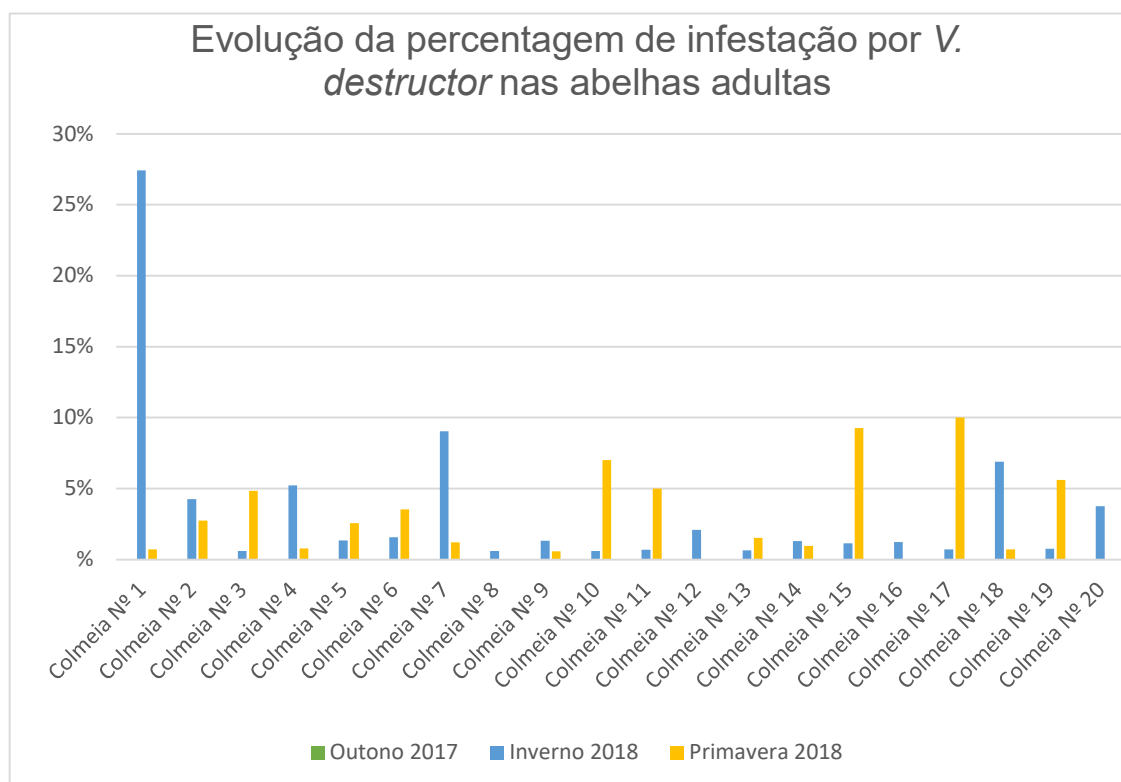
Em todos os três estudos sanitários a percentagem de infestação de colmeias por *P. larvae* e por *A. apis* foi de 0%, não havendo qualquer evolução.

3.2.4. Evolução da Varroose

3.2.4.1. Evolução de *V. destructor* nas amostras de abelhas adultas

No primeiro estudo sanitário foi encontrado o ácaro *V. destructor* em 10% das colmeias, com uma taxa média de infestação por colmeia de 0,061%. No segundo estudo sanitário, *V. destructor* foi encontrado em 100% das colmeias, com uma taxa média de infestação por colmeia de 3,75%. Entre estes dois estudos sanitários houve um aumento de 90% do número de colmeias afetadas pela varroose bem como um aumento de 61,5 vezes na taxa média de infestação por colmeia (Gráfico 2).

Gráfico 2: Evolução da percentagem de infestação por *V. destructor* nas abelhas adultas desde 10 de outubro 2017 a 02 de maio de 2018



Com base nos resultados gerais das taxas de infestação por *V. destructor*, no segundo estudo sanitário, as colmeias foram divididas em 5 grupos tendo em conta a evolução da doença em cada um. No terceiro estudo sanitário apenas foram calculadas as taxas de infestação de varroa por grupo, permitindo assim comparar a evolução após a aplicação de medicamentos para o seu controlo.

Nos grupos 1, 2 e 3, sujeitos à aplicação de um método de controlo houve uma redução da taxa média de infestação por colmeia. No grupo 4, embora também tenha existido a aplicação de um método de controlo, houve um aumento da taxa média de infestação. No grupo 5, no qual não houve aplicação de método de controlo, a taxa de infestação aumentou 5,5 vezes (Tabela 5).

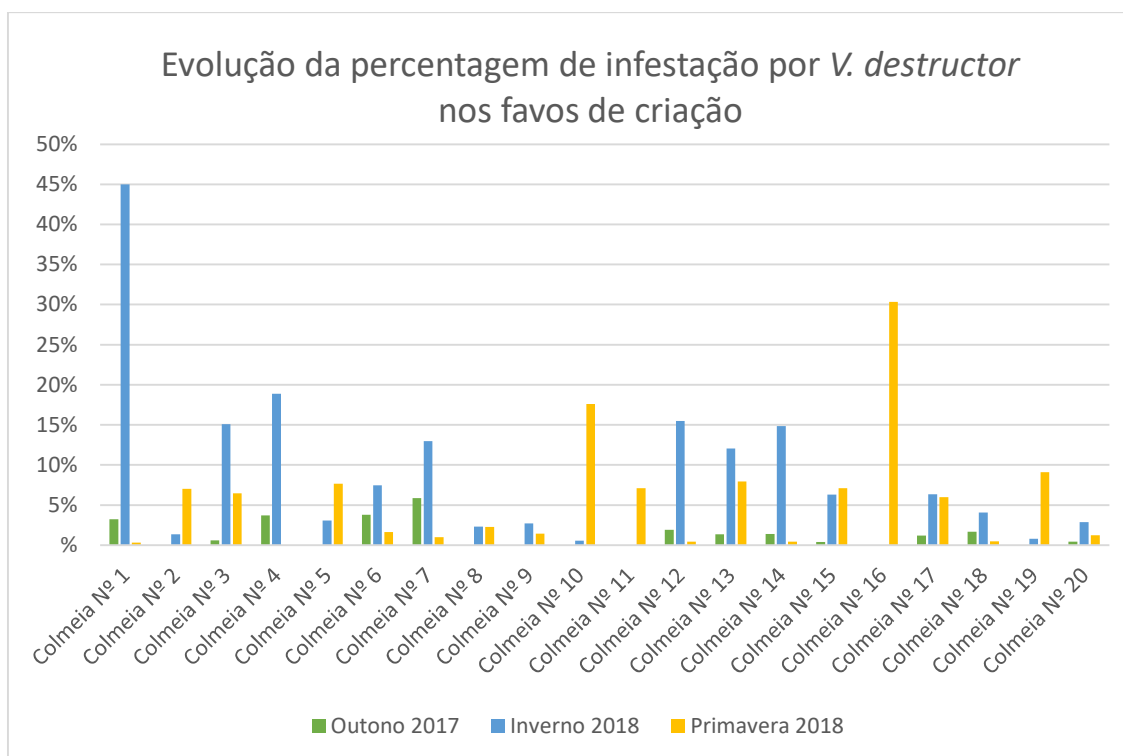
Tabela 5: Evolução da percentagem média, máximos e mínimos de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas por grupos de colmeias desde 26/01/2018 a 02/05/2018

Grupo	% de <i>V. destructor</i> em Abelhas Adultas					
	2º Estudo Sanitário			3º Estudo Sanitário		
	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1- Colmeias nº 1,2,3 e 5	8,4	27,4	0,6	2,7	4,8	0,7
2- Colmeias nº 6,7,13 e 14	3,1	9	0,6	1,8	3,5	1
3- Colmeias nº 4,8,9 e 12	2,3	5,2	0,6	0,3	0,8	0,3
4- Colmeias nº 15,17,18 e 20	3,1	6,9	0,7	5	10	0
5- Colmeias nº 10,11,16 e 19	0,8	1,2	0,6	4,4	7	0

3.2.4.2. Evolução de *V. destructor* em favos de criação

No primeiro estudo sanitário (outono de 2017) o ácaro *V. destructor* foi encontrado em 60% das colmeias obtendo uma taxa de infestação média de 0,44%. Na realização do segundo estudo sanitário, no inverno de 2018, observamos um aumento de 30% do número de colmeias com Varroose, sendo 90% das mesmas afetadas pela doença. Também se verifica um aumento da taxa média de infestação de varroa por colmeia, passando para 8,6%, aumentando 19,54 vezes em relação ao estudo anterior (Gráfico 3).

Gráfico 3: Evolução da percentagem de infestação por *V. destructor* em favos de criação desde 10 de outubro 2017 a 02 de maio de 2018



A análise da evolução da infestação por *V. destructor* nos favos de criação entre o segundo e o terceiro estudo sanitário foi, tal como nas análises a abelhas adultas,

realizada por grupo de colmeias. Nos grupos 1, 2, 3 e 4 (nos quais foram aplicados métodos de controlo), as taxas médias de infestação por varroa reduziram do 2º estudo, realizado no inverno, para o 3º estudo, realizado na primavera, sendo que, no grupo 5 (sem aplicação de método de controlo), se registou um aumento de 47 vezes na taxa média de infestação, passando de 0,34% para 16% (Tabela 6).

Tabela 6: Evolução da percentagem média, máximos e mínimos de infestação por *V. destructor* em favos de criação por grupos de colmeias desde 26/01/2018 a 02/05/2018

Grupo	% de <i>V. destructor</i> em Favos de Criação					
	2º Estudo Sanitário			3º Estudo Sanitário		
	Média	Máximo	Mínimo	Média	Máximo	Mínimo
1- Colmeias nº 1,2,3 e 5	16,12	44,96	1,36	5,4	7,7	0,3
2- Colmeias nº 6,7,13 e 14	11,83	14,83	7,47	2,8	7,9	0,4
3- Colmeias nº 4,8,9 e 12	9,85	18,86	2,3	1	2,3	0
4- Colmeias nº 15,17,18 e 20	4,9	6,33	2,8	3,7	7,1	0,5
5- Colmeias nº 10,11,16 e 19	0,34	0,79	0	16	30,3	7,1

3.3. Avaliação da eficácia dos métodos de controlo contra a Varroose

3.3.1. Grupo 1 – Aplicação de Apivar®:

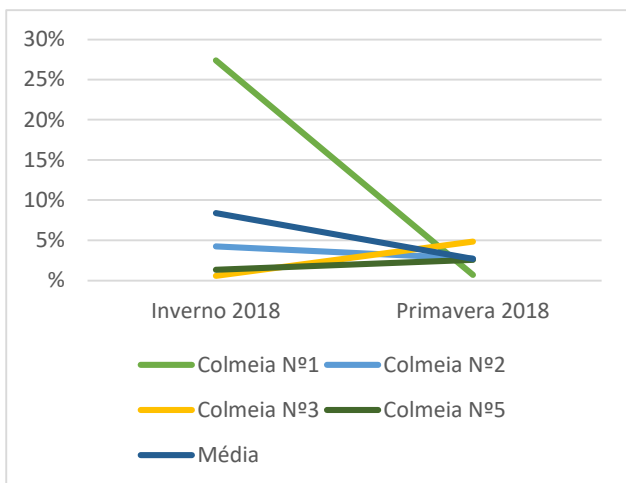
3.3.1.1. Eficácia nas abelhas adultas

No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação de *V. destructor* nas abelhas mostrou ser 3,09 vezes inferior à taxa de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 7). Nas colmeias nº1 e nº2 houve uma redução da taxa de infestação de varroa, no entanto, nas colmeias nº3 e nº5 observou-se um aumento da taxa de infestação (Gráfico 4).

Tabela 7: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

Grupo 1	% de <i>V. destructor</i> em Abelhas Adultas	
	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº1	27,42	0,71
Colmeia Nº2	4,26	2,75
Colmeia Nº3	0,6	4,85
Colmeia Nº5	1,35	2,56
Média	8,4075	2,7175

Gráfico 4: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018



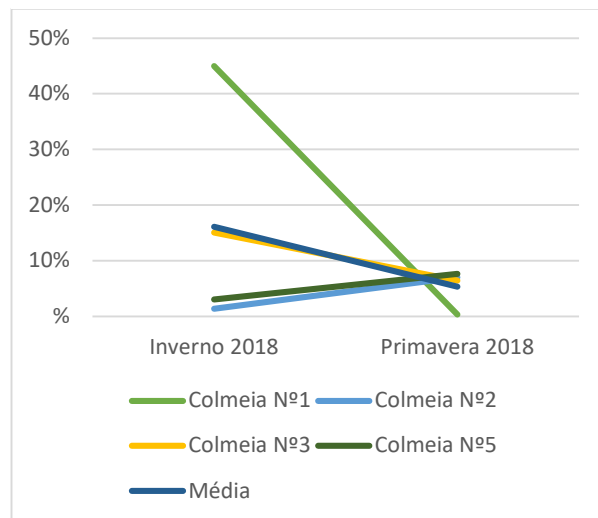
3.3.1.2. Eficácia nos favos de criação

No terceiro estudo sanitário (primavera 2018), após a aplicação de Apivar®, a taxa média de infestação por varroa, nos favos de criação, mostrou ser 3,01 vezes inferior à taxa média de infestação presente no segundo estudo sanitário (inverno 2018) (Tabela 8). A colmeia nº 1 e nº 3 mostram uma redução da percentagem de infestação por varroa entre os estudos, no entanto, colmeia nº 2 e nº5 apresentam um aumento de infestação por *V. destructor* no mesmo período (Gráfico 5).

Tabela 8: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em Favos de Criação		
Grupo 1	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº1	44,96	0,32
Colmeia Nº2	1,36	7,01
Colmeia Nº3	15,07	6,45
Colmeia Nº5	3,07	7,65
Média	16,12	5,36

Gráfico 5: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Apivar® de 26/01/2018 a 02/05/2018



3.3.2. Grupo 2 – Aplicação de Thymovar®

3.3.2.1. Eficácia nas abelhas adultas

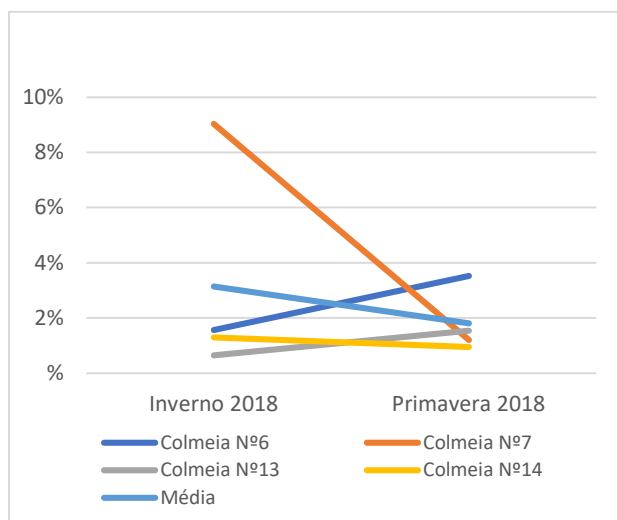
No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação de varroa nas abelhas adultas mostrou ser 1,73 vezes inferior à taxa de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 9).

Tabela 9: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em Abelhas Adultas		
Grupo 2	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº6	1,57	3,53
Colmeia Nº7	9,04	1,21
Colmeia Nº13	0,65	1,54
Colmeia Nº14	1,3	0,95
Média	3,14	1,8075

As colmeias nº 6 e nº13, entre o segundo e o terceiro estudo sanitário aumentaram a percentagem de infestação por *V. destructor*, enquanto nas colmeias nº7 e nº14 houve uma redução no mesmo período (Gráfico 6).

Gráfico 6: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018



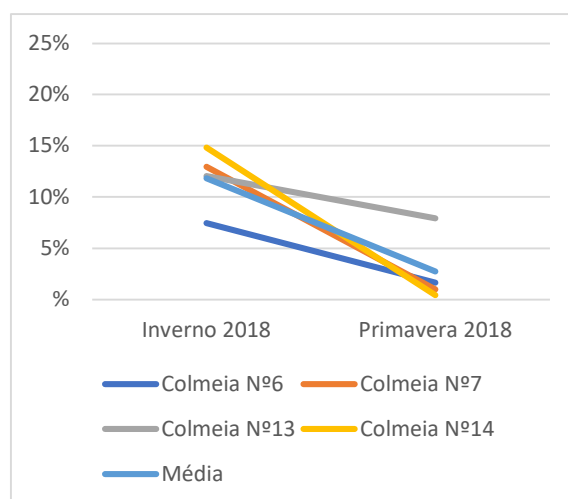
3.3.2.2. Eficácia nos favos de criação

No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação por varroa nos favos de criação mostrou ser 4,29 vezes inferior à taxa média de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 10).

Tabela 10: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em Favos de Criação		
Grupo 2	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia N°6	7,48	1,65
Colmeia N°7	12,96	0,99
Colmeia N°13	12,05	7,93
Colmeia N°14	14,83	0,45
Média	11,83	2,755

Gráfico 7: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Thymovar® de 26/01/2018 a 02/05/2018



Neste grupo, todas as colmeias apresentam uma redução na taxa de infestação por *V. destructor* nos favos de criação após a aplicação de Thymovar® (Gráfico7).

3.3.3. Grupo 3 – Aplicação de Api-LifeVar®

3.3.3.1. Eficácia nas abelhas adultas

No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação por varroa nas abelhas adultas mostrou ser 6,74 vezes inferior à taxa de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 11).

Tabela 11: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em abelhas adultas		
Grupo 3	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº4	5,23	0,78
Colmeia Nº8	0,6	0
Colmeia Nº9	1,32	0,59
Colmeia Nº12	2,08	0
Média	2,3075	0,3425

Todas as colmeias deste grupo apresentam uma redução na taxa de infestação por *V. destructor* após a aplicação do método de controlo (Gráfico 8).

3.3.3.2. Eficácia nos favos de criação

No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação por varroa nos favos de criação mostrou-se ser 9,56 vezes inferior à taxa média de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 12).

Tabela 12: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em Favos de Criação		
Grupo 3	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº4	18,87	0
Colmeia Nº8	2,31	2,27
Colmeia Nº9	2,73	1,42
Colmeia Nº12	15,49	0,42
Média	9,85	1,0275

Neste grupo de colmeias todas apresentam uma redução das taxas de infestação por *V. destructor* entre o segundo e o terceiro estudo sanitário (Gráfico 9).

3.3.4. Grupo 4 – Aplicação de Apiguard®

3.3.4.1. Eficácia em abelhas adultas

No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação por varroa em abelhas adultas mostrou ser 1,59 vezes superior à taxa de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 13).

Gráfico 8: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

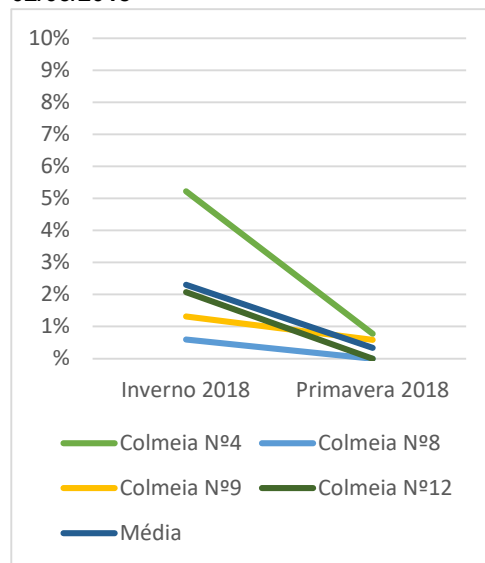


Gráfico 9: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Api-LifeVar® de 26/01/2018 a 02/05/2018

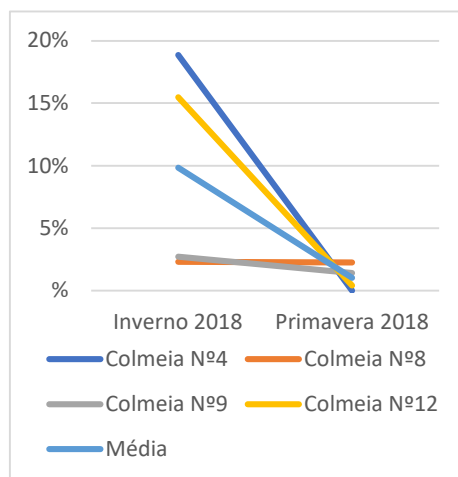
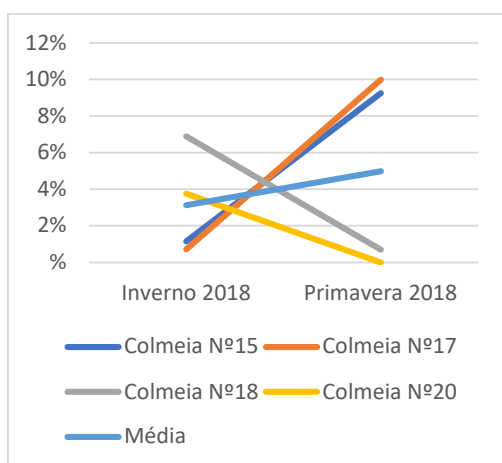


Tabela 13: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em abelhas adultas		
Grupo 4	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº15	1,15	9,26
Colmeia Nº17	0,71	10
Colmeia Nº18	6,9	0,7
Colmeia Nº20	3,76	0
Média	3,13	4,99

As colmeias nº 15 e nº17 aumentaram as taxas de infestação por *V. destructor* entre o segundo e o terceiro, enquanto as colmeias nº18 e nº20 reduziram no mesmo período (Gráfico 10).

Gráfico 10: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018



3.3.4.2. Eficácia em favos de criação

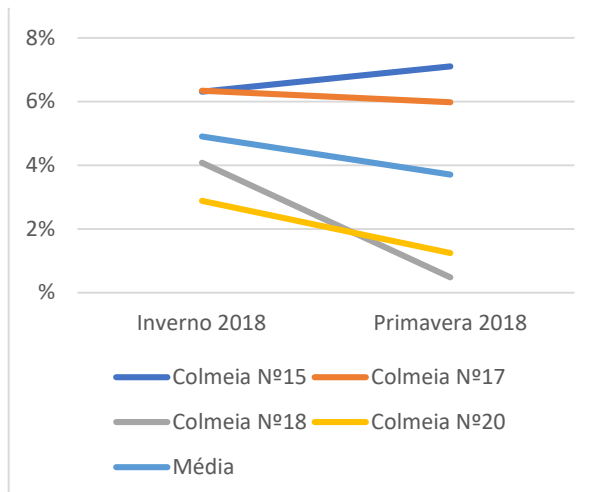
No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação de varroa nos favos de criação mostrou ser 1,32 vezes inferior à taxa média de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 14).

Tabela 14: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em Favos de Criação		
Grupo 3	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº15	6,31	7,11
Colmeia Nº17	6,34	5,98
Colmeia Nº18	4,08	0,48
Colmeia Nº20	2,88	1,25
Média	4,9025	3,705

Neste grupo observamos uma redução da taxa de infestação de varroa em todas as colmeias exceto na colmeia nº15 que entre o segundo e o terceiro estudo sanitário aumentou a taxa de infestação de varroa (Gráfico11).

Gráfico 11: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação com aplicação de Apiguard® de 26/01/2018 a 02/05/2018



3.3.5. Grupo 5 – Controlo - Sem Aplicação de substâncias ativas

3.3.5.1. Evolução nas abelhas adultas

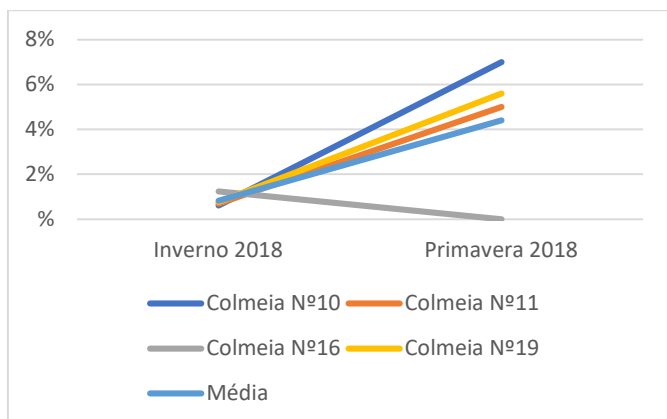
No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação de varroa nas abelhas mostrou ser 5,33 vezes superior à taxa de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela15).

Tabela 15: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em abelhas adultas		
Grupo 5	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº10	0,61	7
Colmeia Nº11	0,7	5
Colmeia Nº16	1,23	0
Colmeia Nº19	0,76	5,6
Média	0,825	4,4

Neste grupo, em todas as colmeias, verificou-se um aumento nas taxas de infestação por varroa à exceção da colmeia nº16 em que não foi encontrado este ácaro nas abelhas adultas (Gráfico 12).

Gráfico 12: Variação da % de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018



3.3.5.2. Evolução nos favos de criação

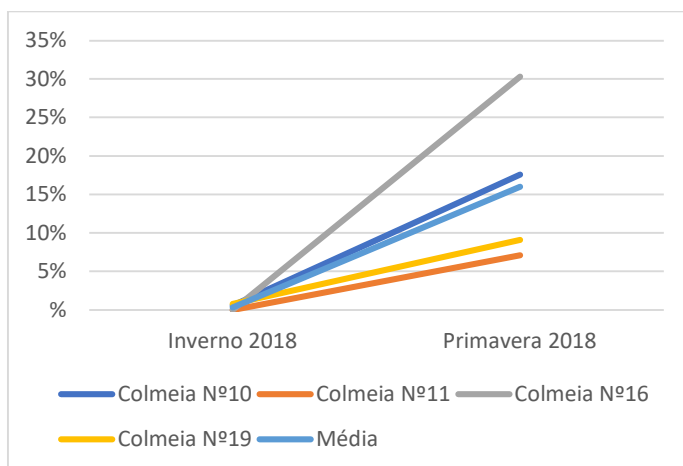
No terceiro estudo sanitário a taxa média de infestação de varroa nos favos de criação mostrou ser 47,035 vezes superior à taxa média de infestação presente no segundo estudo sanitário (Tabela 16).

Tabela 16: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018

% de <i>V. destructor</i> em Favos de Criação		
Grupo 5	inverno 2018	primavera 2018
Colmeia Nº10	0,57	17,61
Colmeia Nº11	0	7,09
Colmeia Nº16	0	30,34
Colmeia Nº19	0,79	9,09
Média	0,34	16,0325

Neste grupo, todas as colmeias aumentaram a taxa de infestação de varroa entre o segundo e o terceiro estudo sanitário (Gráfico 13).

Gráfico 13: Variação da % de infestação por *V. destructor* em favos de criação sem aplicação de substâncias ativas, de 26/01/2018 a 02/05/2018



4. Discussão

4.1. Estudos Sanitários

Os objetivos inicialmente propostos foram atingidos. O diagnóstico dos agentes das doenças que afetaram o efetivo apícola em estudo, em 3 estações distintas do ano, permitiu obter informação sobre a evolução das mesmas desde o início do outono até ao final da primavera, sendo que o outono e inverno correspondem a épocas de escassez de alimento, elevado stress para as colónias e conseqüentemente constituem as épocas do ano em que existe uma mortalidade acentuada. Por outro lado, a primavera corresponde a uma época de abundância alimentar, onde praticamente todos os fatores ambientais são favoráveis ao desenvolvimento das colónias.

No primeiro estudo sanitário, a 10 de outubro de 2017, as colmeias em estudo encontravam-se no final da época quente do ano, correspondendo a uma época de elevado stress para as colónias devido ao excesso de calor, elevada predação por parte de outros insetos, escassez de água e de alimento. O seu estado sanitário é um fator determinante para a percentagem de colmeias que morrem durante esta época até à primavera.

Pelos resultados obtidos no presente este estudo observou-se que as colmeias estavam pouco afetadas pelas principais doenças apícolas, pois, entre todos os agentes patogénicos pesquisados - *Nosema spp.*, *A. apis*, *P. larvae*, *V. destructor* e *S. tricuspis* – apenas *S. tricuspis* e *V. destructor* foram encontrados nas colónias, sendo que *V. destructor* apresentou taxas de infestação irrelevantes, pois, segundo Murilhas e Casaca (2004), colmeias com taxas de infestação abaixo de 2% não apresentam sinais de parasitismo, encontrando-se saudáveis.

No segundo estudo sanitário, realizado a 26 de janeiro de 2018, verificou-se que apenas *V. destructor* foi encontrada nas amostras analisadas. Embora apenas tenha sido encontrado um único agente patogénico, as colmeias encontram-se num estado sanitário pior que no primeiro estudo pois as percentagens de infestação de *V. destructor* foram muito elevadas, requerendo a aplicação de métodos de controlo a fim de evitar a perda de colónias (Relva 2010). Como agravante, o referido período de estudo, representava a época de maior escassez de alimento, associada a condições de baixas temperaturas e humidade aumentada, debilitando ainda mais o estado das colmeias.

A análise dos resultados obtidos no terceiro estudo sanitário, efetuado a 02 de maio de 2018, mostrou que as colmeias estavam preparadas, a nível sanitário, para a época produtiva durante a primavera, estação caracterizada pela abundância de alimento e por temperaturas amenas. Neste estudo sanitário, dos cinco agentes patogénicos pesquisados, apenas foram encontrados *V. destructor* e *Nosema spp.* De

salientar que tal ocorreu após a aplicação de métodos de controlo da varroose que impediram o aumento exponencial destes ácaros com consequências nefastas para as colónias. A aplicação de métodos de controlo contra a varroose deve ser executada antes da época produtiva e imediatamente após a mesma, permitindo deste modo que na época produtiva a *V. destructor* não evolua exponencialmente, evitando a redução da produtividade da colónia e que assim que a colónia termina a época produtiva, o controlo da varroose deverá de ser eficaz de forma a que a colónia inicie o período de escassez com taxas de infestação inferiores a 2%, garantindo assim um bom estado sanitário bem como uma redução da mortalidade anual das colónias (Murilhas e Casaca 2004; Paxton et al. 2007).

4.2. Evolução das doenças ao longo do período de estudo

Embora segundo a literatura (Orantes Bermejo et al. 1996; Pires et al. 2011) a infestação por *S. tricuspis* esteja praticamente restrita aos meses de agosto e setembro, observou-se, no presente estudo, que em outubro de 2017 as colmeias ainda apresentavam uma taxa de infestação muito elevada, o que é explicável pelas condições meteorológicas anormais para a altura do ano em causa. Estas alterações meteorológicas consistiram numa permanência do clima quente e seco característico do verão, até meados de outubro, de permitindo que *S. tricuspis* continuasse o parasitismo em *A. mellifera* por um período anormalmente alargado.

Como o parasitismo por *S. tricuspis* ocorre apenas quando as condições meteorológicas permitem que a mosca adulta efetue voos para deposição das suas larvas sobre as abelhas, (Haddad et al. 2015), era de esperar que com a chegada do outono e do inverno esta relação de parasitismo terminasse sem que fosse necessária a aplicação de qualquer método de controlo. Com a realização do segundo estudo sanitário comprovou-se este facto nas colónias, tendo-se observado a redução da taxa de infestação de 100%, em outubro, para 0% no final de janeiro.

Na realização do terceiro estudo sanitário, comprovou-se a inexistência de parasitismo por *S. tricuspis* desde o final do outono até à primavera, sendo esta doença totalmente controlada pela variação do clima, não sendo necessária a aplicação de qualquer método de controlo.

Relativamente à evolução da Nosemose observou-se que quer no primeiro, quer no segundo estudo sanitário esta doença não foi encontrada. De acordo com a literatura (CAP – Departamento Técnico 2007; Fries 2010; Mariano et al. 2010) a principal forma de combate a *Nosema spp.* é feita pela prevenção. Essa prevenção baseia-se em boas técnicas de manejo e escolha criteriosa da localização dos apiários, renovação de ceras velhas substituindo-as por novas ceras laminadas, troca de rainhas velhas e pouco

produtivas por rainhas novas e de elevado comportamento higiénico e padrão de postura de ovos. Em todas as colmeias incluídas no presente estudo estas técnicas de manejo foram aplicadas o que justifica a inexistência desta doença no primeiro estudo sanitário.

Segundo Mohammadian et al. (2018), a principal época de desenvolvimento de Nosemose ocorre durante o inverno e início de primavera, em épocas frias e húmidas e concordantes com fases de elevado stress para as colónias. Com a realização do terceiro estudo sanitário comprovou-se que a doença se desenvolveu no apiário, pois a 02 de maio de 2018 já existiam 3 colmeias (15%) positivas a *Nosema spp.*, mostrando que, embora tenham sido efetuadas técnicas de controlo preventivo do aparecimento da doença, esta acabou por ocorrer.

Existem também outros fatores que influenciam a ocorrência de doenças, nomeadamente a noseemose, que são fatores que o apicultor não consegue controlar. São eles: a) a pilhagem que as abelhas adultas executam em outras colmeias mais fracas e possivelmente doentes de apiários vizinhos, infetando-se com o agente patogénico no momento da pilhagem; b) a transmissão de doenças por parte dos zangãos. Com a ocorrência de condições meteorológicas favoráveis, as colónias iniciam a criação de zangãos e os zangãos ao poderem entrar e sair livremente em todas as colónias num raio de aproximadamente 2km, são importantes agentes de transmissão de doenças (Oliver 2007; Oliver 2019).

No que se refere a outras doenças apícolas, como a ascosferiose e a loque americana, segundo os dados oficiais apresentados pela DGAV (2019), no plano sanitário apícola de 2020, a incidência no território nacional, de Ascosferiose é de 5% e a de Loque Americana é de 1%. Pela literatura (CAP – Departamento Técnico 2007; Genersch 2010) a principal forma de transmissão destas doenças é feita pelo apicultor por incorretas técnicas de manejo e de deficiente higienização do material apícola. Para além destes fatores, o principal método de controlo do aparecimento destas doenças baseia-se na manutenção de colónias saudáveis e com bastante vigor produtivo e reprodutivo pela troca de ceras e rainhas velhas (Flores et al. 2000; Aronstein and Murray 2010; Genersch 2010). Tendo em conta os aspetos acima apresentados e o historial das colmeias incluídas no presente estudo era espectável a ausência destes agentes patogénicos nos 3 estudos sanitários, tal como ocorreu.

Aquando da realização do primeiro estudo sanitário foi verificado que não existiam estas doenças no apiário em estudo, pelo que era espectável que as mesmas também não viessem a ocorrer nos seguintes. No entanto, é de salientar, que caso houvesse um apiário vizinho que tivesse estes agentes patogénicos ativos era possível

a ocorrência futura destas doenças devido aos comportamentos de pilhagem de colónias debilitadas por parte das abelhas adultas (Rosenkranz et al. 2010).

No que concerne à constante presença dos agentes da varroose, e com base na interpretação do Programa Apícola Nacional e do Plano Sanitário Apícola, elaborados pela DGAV (2019), e segundo diversos estudos, Relva (2010) e Nazzi and Le Conte (2016) pode-se afirmar que a varroose é a maior e a mais importante doença para a apicultura nacional e mundial.

Na realização do primeiro estudo sanitário observou-se que as taxas médias de infeção das colónias por *V. destructor* quer nas abelhas adultas, quer nos favos de criação, foram inferiores a 1%, sendo estas consideradas irrelevantes pois com percentagens abaixo dos 2% as colónias não demonstram qualquer sinal de parasitismo (Murilhas e Casaca 2004). Contudo, com percentagens acima de 5% nas abelhas adultas e 15% nos favos de criação de obreira é necessária uma urgente aplicação de métodos de controlo da doença (Honey Bee Health Coalition 2015).

Os resultados obtidos no estudo sanitário de 10/10/2017, relativamente às taxas de infestação por *V. destructor*, mostraram que nesta data a doença estava controlada no apiário e que, conhecendo o historial de manejo das colónias, pode-se considerar que o tratamento com amitraz (Apivar®), realizado a 05/08/2017 foi eficaz no controlo da espécie *V. destructor* nas colmeias em estudo.

Murilhas e Casaca (2004) referiram que, desde que exista criação numa colónia, a varroa está em constante desenvolvimento, de tal forma que uma colmeia com inicialmente 2% de infestação por varroa nos favos de cria, se não for tratada contra a varroose morrerá dentro de 2 a 4 anos. Como tal, embora as taxas médias de infestação nas colónias em estudo sejam inferiores a 1% pode-se prever que, num futuro próximo, irão aumentar consideravelmente.

A temperatura ideal para o desenvolvimento de *V. destructor* encontra-se entre os 32,5°C e os 33,4°C ($\pm 2,9^\circ\text{C}$) e a temperatura do ninho das colónias varia entre 30,5°C e 35,5°C (Nazzi and Le Conte 2016), permitindo que a varroa se desenvolva desde que haja criação. Um aumento das percentagens de infestação de varroa mesmo durante o inverno é característico do clima mediterrâneo onde o apiário está inserido. Embora o inverno seja a estação mais fria do ano, as temperaturas são relativamente amenas e a existência de alguma floração disponível para as abelhas, permitem que a colmeia continue com postura ativa e se mantenha em desenvolvimento, tal como a varroa (Paxton et al. 2007; Relva 2010).

Com a realização do segundo estudo sanitário a 26 janeiro de 2018, inverno, podemos verificar que nos 4 meses que espaçaram o primeiro e o segundo estudo sanitário, a varroa desenvolveu-se e aumentou as taxas médias de infestação. Neste

estudo verificou-se uma taxa média de infestação por *V. destructor* em abelhas adultas de 3,75% e em favos de criação de 8,6%. Embora estes valores de taxas médias de infestação não estejam acima do limite para a aplicação de um método de controlo são superiores a 2%, e considerados preocupantes. Observou-se, ainda, que, mesmo durante o inverno e início de primavera, época mais fria, as taxas aumentaram 61,5 vezes nas abelhas adultas e 19,5 vezes nos favos de criação, em quatro meses, e sabendo que a época preferencial de reprodução da varroa é a primavera (Nazzi and Le Conte 2016), poder-se-ia antever que as taxas de infestação por *V. destructor* iriam atingir valores demasiadamente elevados se nenhum método de controlo fosse aplicado.

Os resultados obtidos no terceiro estudo sanitário, a 02 de maio de 2018, foram concordantes com o esperado pois nos grupos 1, 2, 3 e 4 nos quais foi aplicado um método de controlo, as taxas médias de infestação por *V. destructor* nas abelhas adultas e nos favos de criação baixaram em relação ao estudo anterior, à exceção do grupo 4 no qual a taxa média de infestação em abelhas adultas aumentou. Este aumento pode ser devido a uma má eficácia do método de controlo utilizado ou por uma reinfestação por *V. destructor* demasiado elevada. No grupo 5, sem aplicação do método de controlo, os resultados também foram concordantes com o esperado, pois sem a aplicação de um método de controlo as percentagens médias de infestação aumentaram 5,5 vezes nas abelhas adultas e 19,5 vezes nos favos de criação desde o estudo anterior. Com estes resultados podemos compreender a importância da aplicação de métodos de controlo contra a varroose no controlo desta doença.

4.3. Avaliação da eficácia dos métodos de controlo contra a Varroose

A eficácia dos métodos de controlo contra a varroose foi calculada pela variação na percentagem média de infestação por *V. destructor* entre o segundo e o terceiro estudos sanitários em cada grupo de colmeias.

Nos resultados das percentagens de infestação por *V. destructor* por colmeia foi pertinente a informação extraída a partir das amostras de abelhas adultas, no entanto, a análise de resultados a partir de favos de criação foi consideravelmente mais relevante. Tal deve-se ao facto da distribuição da varroa pelos favos de criação e pelas abelhas adultas não ser homogénea. Perante baixas percentagens de infestação por varroa na colónia, este ácaro prefere parasitar abelhas amas, e entrar para o interior dos alvéolos pois o seu objetivo é alcançar o mais rapidamente possível novas larvas para se poder reproduzir mais rapidamente (Nazzi and Le Conte 2016). Sabe-se também que quando as taxas de infestação são muito elevadas, o ácaro *V. destructor* tem preferência por zangãos e abelhas campeiras, de forma a conseguir difundir-se com

maior eficácia por todas as colónias (Nazzi and Le Conte 2016). Para além deste fator, há que ter em conta que cerca de 15 a 20% das varroas de uma colónia encontram-se em fase forética e as restantes no interior da criação (Loftus et al. 2016) razão pela qual se consideraram as percentagens de varroa nos favos de criação para comparação da eficácia dos métodos de controlo.

O grupo 3 (Apilife-Var®) obteve uma redução de 86,15% na taxa de infestação por *V. destructor*, em abelhas adultas, e de 89,94%, nos favos de criação apresentando o terceiro estudo sanitário taxas de infestação de 1% nos favos de criação e 0,3% nas abelhas adultas. Segundo estudos de Imdorf et al. (1995) e de Fergusson et al. (2013) a eficácia de tratamento com Apilife-Var® demonstrou reduções na ordem dos 74% e de 53,8%, respetivamente. Em comparação com os resultados obtidos nos favos de criação no presente estudo, o medicamento foi consideravelmente mais eficaz. Isto pode ser explicado pelo facto de o Apilife-Var® ser um medicamento composto por várias substâncias ativas, em que o timol é o principal componente, mas também contém óleo de eucalipto, cânfora racémica e levomentol. Estas substâncias atuam quer por contacto, quer por sublimação, o que condiciona a sua eficácia consoante as condições meteorológicas, a quantidade de abelhas nas colmeias, o estado evolutivo das colmeias e da varroa e também a disponibilidade de alimento, podendo nas colmeias em estudos terem-se reunido melhores condições para a atuação do fármaco. Outro fator ainda a ter em conta na eficácia do medicamento foi o facto de este ter sido o único em que em todas as colmeias do grupo, se observou quer nas abelhas adultas quer nos favos de criação, uma redução da taxa de infestação por *V. destructor* após a sua aplicação.

No grupo 1 (Apivar®) houve uma redução da percentagem média de infestação por *V. destructor* de 67,9% nas abelhas adultas e de 77% nos favos de criação. Neste grupo a colmeia nº 2 e a colmeia nº5 obtiveram taxas de infestação por varroa nos favos de criação superiores no terceiro estudo sanitário em relação ao segundo, no entanto, o fármaco permitiu manter as taxas de infestação abaixo de valores críticos (5% em abelhas adultas e 15% em favos de criação), e ao comparar-se os resultados deste grupo com o grupo 5 - sem tratamento-, observa-se que a sua aplicação foi eficaz dado que conseguiu evitar o crescimento exponencial de *V. destructor*.

A análise de outros estudos sobre a eficácia do tratamento com amitraz revela valores muito díspares, desde 99,5% (Skubida and Pohorecka 2013) a 64,3% (Ramadhani et al. 2015), sendo já apontada a resistência ao amitraz como uma das causas desta variação de eficácia.

Nas colmeias em estudo, sabe-se que tinha sido efetuado anteriormente pelo menos um tratamento com amitraz. O tratamento realizado com esta substância ativa é um dos mais antigos e talvez dos mais utilizados na apicultura portuguesa, pelo que a

existência de varroas resistentes a esta substância ativa poderá ser uma explicação para os baixos valores de eficácia obtidos.

O grupo 2, em que foi aplicado timol 15g em placas de celulose (Thymovar®), entre o segundo e o terceiro estudo sanitário houve uma redução da percentagem média de infestação por *V. destructor* de 42% em abelhas adultas e de 76% nos favos de criação. Neste grupo observamos uma redução das taxas de infestação em todas as colmeias do grupo, no entanto, ao comparar os resultados obtidos com outros estudos realizados, que mostraram uma eficácia de tratamento na ordem dos 85% (Fergusson et al. 2013) e 91,5% (Suard et al. 2007), os valores de eficácia obtidos no presente estudo foram inferiores. O timol, que se encontra aplicado em placas de celulose, necessita de uma temperatura de 15 a 35°C e uma ventilação adequada da colmeia para que a sua sublimação seja bem-sucedida e se obtenha uma boa eficácia. Tal depende muito da quantidade de abelhas na colmeia (ventilação e aquecimento) e da temperatura ambiente durante a sua aplicação, e nesse sentido, podem ter ocorrido variações nestes fatores que não permitiram que o medicamento obtivesse a sua máxima eficácia. Por outro lado, a sua aplicação pode-se considerar eficaz pois as taxas médias de infestação por varroa mantiveram-se muito abaixo dos valores críticos (5% em abelhas adultas e 15% em favos de criação (Honey Bee Health Coalition 2015)) e muito próximos dos 2% de infestação quer em abelhas adultas quer em favos de criação, mostrando assim que as colmeias se encontram saudáveis (Murilhas e Casaca 2004).

Os resultados do grupo 4, em que foi aplicado timol 25% por 50g de gel aquoso (Apiguard®), mostraram que o tratamento foi pouco eficaz pois a taxa média de infestação por *V. destructor* nas abelhas adultas aumentou 1,59 vezes e nos favos de criação reduziu apenas 24,5% entre o segundo e o terceiro estudo sanitário. Outros estudos mostram que a eficácia deste medicamento se situou na ordem dos 89,8% (Ramadhani et al. 2015) e 83,1% (Paillard et al. 2020), valores estes muito acima dos obtidos. Para além desta comparação há a considerar, ainda, o facto de ter sido neste grupo que houve maior variação das percentagens de redução de infestação por *V. destructor* por colmeia pois em quatro colmeias, as colmeias nº 15 e 17 aumentaram de forma significativa as percentagens de infestação quer em abelhas adultas quer em favos de criação enquanto que as colmeias nº 18 e 20 obtiveram resultados muito positivos na redução de infestação. Estes factos mostraram que o tratamento foi efetivo nas colmeias nº 18 e 20 e, contudo, não o foi nas colmeias nº 15 e 17. Esta diferença, associada aos valores de eficácia apresentados por outros autores (Ramadhani et al. 2015; Paillard et al. 2020), pode ser explicada por uma aplicação incorreta do método de controlo nas colmeias nº18 e 20 ou alguma anomalia no produto. Diferenças na

quantidade de abelhas em cada colmeia, que possam ter conduzido a alteração na libertação da substância ativa também poderá ser uma justificação para esta variação de eficácia.

É também necessário analisar a variação da taxa de infestação do grupo 5, não sujeito a tratamento, onde se observou um aumento exponencial de *V. destructor*, de 47,2 vezes nos favos de criação e de 5,33 vezes nas abelhas adultas. Este grupo, mostrou que apenas no período de 1 mês, colmeias com taxas de infestação por varroa inferiores a 1%, colmeias completamente saudáveis, tornaram-se colmeias que necessitaram da aplicação urgente de um método de controlo de varroose. Se se colocar a hipótese de que a varroa se desenvolve de forma semelhante em todas as colmeias do apiário, pode-se constatar que o tratamento efetuado em cada um dos grupos 1 a 4 foi efetivo pois, caso não o tivesse sido, as percentagens de varroa seriam muitíssimo mais elevadas (Murilhas e Casaca 2004; Relva 2010).

Sendo o Apilife-Var® o único medicamento com uma mistura de óleos essenciais (Timol, Eucalipto, Levomentol e Cânfora) enquanto os outros apenas continham uma substância ativa, os resultados deste estudo levam à conclusão que a adição de outras substâncias ativas (embora que em pequenas quantidades) tenha um efeito benéfico no controlo da varroa. Tendo em conta a diferença de eficácia do Thymovar® para o Apiguard®, em que ambos têm a mesma substância ativa (timol), os resultados do estudo levam-nos a concluir que o material no qual está embebido o timol obteve influência, havendo melhores resultados para a matriz de celulose do que para o gel aquoso.

Sobre a diferença de eficácia entre Thymovar® e Apiguard®, tendo ambos a mesma substância ativa (timol), os resultados obtidos sugerem que o material no qual está embebido o timol tem influência, verificando-se melhores resultados com a matriz de celulose do que com o gel aquoso.

Como limitantes do cálculo das infestações por *V. destructor* um fator a ter em consideração na análise dos erros associados ao estudo prende-se com o facto da distribuição das varroas numa colónia, quer nas abelhas quer na criação, não ser homogénea, e como tal, durante a recolha das amostras poder-se-ia ter recolhido abelhas ou favos de criação de zonas da colmeia mais ou menos afetada, existindo logo aí um fator de aleatoriedade.

Outro fator que poderá ter influenciado a dinâmica da evolução da varroose nas colmeias é a enxameação. Não foi possível acompanhar todas as semanas a evolução das colmeias em estudo, e como tal não é de excluir a possibilidade da ocorrência deste fenómeno. Quando se dá a enxameação, a colónia divide-se em duas partes, em que uma parte abandona a colmeia com a rainha mais antiga e a outra permanece na colónia

com uma nova rainha. Consoante a quantidade de criação operculada e a percentagem de infestação por *V. destructor* da colónia no momento da enxameação observa-se uma variação na percentagem de varroas que permanece na colmeia, dependendo esta da quantidade de ácaros que abandonou a colmeia sobre as abelhas que enxamearam, falseando assim os resultados.

Outro dos fatores limitantes do estudo relaciona-se com a existência ou não de pilhagem em colmeias mortas ou debilitadas. Este fator é sempre desconhecido e uma agravante na percentagem de infestação por varroa, dependendo da concentração de colmeias de outros apicultores que existam nas redondezas.

5. Conclusões

A realização deste estudo permitiu obter maior conhecimento sobre a realidade sanitária de um apiário, diagnosticando os agentes patogénicos existentes e também retirando conclusões sobre a eficácia de alguns métodos de controlo aplicados.

Com a realização de 3 estudos sanitários abrangendo o período entre 10 de outubro de 2017 e 05 de maio de 2018 foi possível verificar que, aquando da realização do segundo estudo sanitário, a 26 de janeiro de 2018, as colmeias em estudo apresentavam piores condições sanitárias devido ao parasitismo por *V. destructor*.

A infestação por *S. tricuspis* revelou-se irrelevante para as colmeias em estudo, pois, embora no primeiro estudo sanitário se tenham verificado taxas de infestação elevadas, as mudanças nas condições meteorológicas foram suficientes para a erradicação deste parasitismo.

A pesquisa dos agentes patogénicos *P. larvae* e *A. apis* revelou-se negativa nos 3 estudos sanitários concluindo-se que com um maneiço preventivo correto é possível manter as colmeias livres destas doenças.

A infestação por *Nosema* spp. foi apenas diagnosticada no terceiro estudo sanitário, mostrando que embora tenham sido efetuados métodos de controlo preventivo, como a troca de ceras, utilização de rainhas de novas com bom comportamento higiénico e apropriado maneiço apícola, não foram suficientes para evitar o aparecimento da doença. No entanto, como nos primeiros 2 estudos sanitários a pesquisa de *Nosema* spp. foi negativa, a repetição anual destes métodos de controlo deverá ser implementada para manter os níveis deste fungo continuamente baixos.

A presença constante de *V. destructor* comprovou que este ácaro constitui a maior preocupação para a apicultura quer pela sua intensidade de parasitismo quer pela dificuldade de erradicação. Com base no aumento dos valores das taxas de infestação ao longo do estudo, concluiu-se que *V. destructor* se desenvolve durante o inverno e que, mesmo em colmeias com taxas de infestação muito baixas no outono, é fundamental efetuar um método de controlo antes do início da primavera com vista à manutenção de colónias saudáveis.

Quanto aos fármacos aplicados contra a varrose, o método de controlo mais eficaz foi obtido através da utilização de Apilife-Var®, seguindo-se o Apivar® e o Thyomvar®. A aplicação de Apiguard® revelou-se como o método de controlo menos eficaz.

Como perspetivas futuras ao estudo, seria de elevado interesse a realização de vários estudos sanitários abrangendo uma maior amostragem de colmeias e contendo um período em estudo de pelo menos um ano, acompanhando todo o ciclo da colmeia.

6. Bibliografia

- Abrahão IG, Oliveira MO de, Freitas BM. 2017. Curso Técnico em Apicultura - Biologia das abelhas. <https://www.researchgate.net/publication/320907688>.
- Anderson DL, Trueman JWH. 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Exp Appl Acarol* Vol 24.:1–189.
- Anggraini AR, Oliver J. 2015. Nosemosis. *Food Agric Organ United Nations*.:1–5. [fao.org](http://www.fao.org).
- Aronstein KA, Murray KD. 2010. Chalkbrood disease in honey bees. *J Invertebr Pathol*. 103(SUPPL. 1):1–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.018>.
- Barros AI, Nunes F hermínio, Costa MMF da. 2009. Manual de Boas Práticas na Produção de Cera de Abelha. :1–63. www.fnap.pt.
- Barros AIRNA de, Nunes FHF, Costa MMF da. 2009. Manual de Boas Práticas na Produção de Cera de Abelha - Princípios Gerais. www.fnap.pt.
- Beecare B. 2017. The Varroa mite – a deadly and dangerous bee parasite. Bayer Crop AG.:1–20. <https://beecare.bayer.com/varroa>.
- Burnham AJ. 2019. Scientific advances in controlling *Nosema ceranae* (Microsporidia) infections in honey bees (*Apis mellifera*). *Front Vet Sci*. 6(MAR):1–8. www.frontiersin.org.
- CAP – Departamento Técnico. 2007. Manual De Sanidade Apícola. :36. www.fnap.pt.
- Casaca JD. 2010. Manual de Produção de Pólen e Própolis. www.fnap.pt.
- Chemurot M, Brunain M, Akol AM, Descamps T, de Graaf DC. 2016. First detection of *Paenibacillus* larvae the causative agent of American Foulbrood in a Ugandan honeybee colony. *Springerplus*. 5(1):0–6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4947070/>.
- DGAV. 2016. Plano de luta contra a varroose. :1–13. www.dgv.min-agricultura.pt.
- DGAV. 2018. Programa Sanitário Apícola 2018. https://www.gpp.pt/images/Programas_e_Apoios/Apoios_de_Mercado/PAN.
- DGAV. 2019. Medicamentos Veterinários - Abelhas. :1–2. http://www.gpp.pt/images/Programas_e_Apoios/Apoios_de_Mercado/PAN/MV_Abelhas_Abril2019.pdf.
- DGAV. 2020. Programa Sanitário Apícola 2020. :1–22. www.dgav.pt.
- Dietemann V, Nazzi F, Martin SJ, Anderson DL, Locke B, Delaplane KS, Wauquiez Q, Tannahill C, Frey E, Ziegelmann B, et al. 2013. Standard methods for varroa research. *J Apic Res*. 52(1):1–54.
- Fergusson M, Ph RO, Gürbilek N, Scarlet D, Ph RO, K.M., Quevauviller P, Thomas O, Van Der Beken A, Ph RO, et al. 2013. Efficacy of Thymovar vs Apilifevar. *J Chem Inf Model*. 53(9):1689–1699. <https://www.researchgate.net/publication/269887457>.
- Flores JM, Funari S, Ruiz J, Puerta F, Campano F. 2000. ASCOSFERIOSE (*Ascospaera apis*):CAUSAS PREDISPONETES, MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO. *Bol Indústria Anim*.:1–26. <http://www.iz.sp.gov.br/bia/index.php/bia/issue/view/122>.
- Fries I. 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *J Invertebr Pathol*. 103(SUPPL. 1):S73–S79. doi:10.1016/j.jip.2009.06.017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>.
- Fries I, Chauzat MP, Chen YP, Doublet V, Genersch E, Gisder S, Higes M, McMahon DP, Martín-Hernández R, Natsopoulou M, et al. 2013. Standard methods for *Nosema* research. *J Apic Res*. 52(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>.
- GAPA. 2019. PAN - Programa Apícola Nacional 2017-2019. Gabiente

Planeamento, Políticas e Adm Geral.:1–97.
https://www.gpp.pt/images/Programas_e_Apoios/Apoios_de_Mercado/PAN/PAN2017-2019.pdf.

Garção HP. 2010. Eficácia da Própolis no controlo da Loque Americana : Avaliação em zonas controladas.

Genersch E. 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr Pathol.* 103(SUPPL. 1):1–19.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015>.

Goblirsch M. 2018. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie.* 49(1):131–150.

Hamida T Ben. 1999. Enemies of bees. *Bee Dis diagnosis Zaragoza CIHEAM.* 165:147–165. <https://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=99600245>.

Hansen H, Brødsgaard CJ. 2001. World-Wide Distribution , Early Detection and Control of American Foulbrood. *Int Apic Congr.*
<https://www.apimondia.com/docs/congress/2001/Papers/370>.

He C, Zhang K, Hou X, Han D, Wang S. 2019. Foraging behavior and pollination efficiency of *Apis mellifera* L. On the oil tree peony ‘Feng Dan’ (*Paeonia ostii* T. Hong et J.X. Zhang). *Insects MDPI.* 10:1–11.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523710>.

Honey Bee Health Coalition. 2015. Tools for Varroa Management |A Guide To Effective Varroa Sampling & Control. <https://honeybeehealthcoalition.org/>.

IPMA. 2017. Boletim climatológico sazonal - outono 2017. www.ipma.pt.

IPMA. 2018a. Boletim Climatológico Sazonal. <http://www.ipma.pt>.

IPMA. 2018b. Boletim Climatológico Sazonal primavera 2018. www.ipma.pt.

Kazemi V, Eskafi M, Saeedi M, Manayi A, Hadjiakhoondi A. 2019. Physicochemical properties of royal jelly and comparison of commercial with raw specimens. *Jundishapur J Nat Pharm Prod.*:4–7.
https://www.researchgate.net/publication/335557489_Physicochemical_Properties_of_Royal_Jelly_and_Comparison_of_Commercial_with_Raw_Specimens.

Loftus JC, Smith ML, Seeley TD. 2016. How honey bee colonies survive in the wild: Testing the importance of small nests and frequent swarming. *PLoS One.* 11(3):1–11. doi:10.1371/journal.pone.0150362.

Mariano H, Raquel M, Aranzazu M. 2010. *Nosema ceranae* in Europe : an emergent type C nosemosis *. *Apidologie.* 41:375–392.

Ministério da Agricultura Floresta e do Desenvolvimento Rural. 2016. Programa Apícola Nacional 2017-2019. :1–99. <https://www.gpp.pt/index.php/pan/programa-apicola-nacional>.

de Miranda JR, Cordoni G, Budge G. 2010. The Acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J Invertebr Pathol.* 103(SUPPL. 1):S30–S47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.014>.

de Miranda JR, Genersch E. 2010. Deformed wing virus. *J Invertebr Pathol.* 103(SUPPL. 1):S48–S61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>.

Mohammadian B, Bokaie S, Moharrami M, Nabian S, Forsi M. 2018. Distribution of *nosema* spp. in climatic regions of Iran. *Vet Res Forum.* 9(3):259–263.
http://vrf.iranjournals.ir/article_32082.html.

Moreira L, Farinha N. 2011. Guia Prático da Biologia da Abelha. *Man Apic.* 1:1–48. www.fnep.pt.

Muli E, Patch H, Frazier M, Frazier J, Torto B, Baumgarten T, Kilonzo J, Kimani JN, Mumoki F, Masiga D, et al. 2014. Evaluation of the Distribution and Impacts of Parasites, Pathogens, and Pesticides on Honey Bee (*Apis mellifera*) Populations in East Africa. *Browning GF, editor. PLoS One.* 9(4):e94459.
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0094459>.

Murilhas A, Casaca J. 2004. CONVIVER COM A VARROA EMPORUGAL - Um contributo para a adopção de boas práticas apícolas de convivência com a varroa. :1–32. <http://www.dzoo.uevora.pt/>.

- Nazzi F, Le Conte Y. 2016. Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annu Rev Entomol.* 61(1):417–432. doi:10.1146/annurev-ento-010715-023731.
- Neto J. 2009. Manual de criação de rainhas autoctones. Fnap. www.fnap.pt.
- Oliver R. 2007. The “Nosema twins - Part I.” *Am Bee J.* 147(12):1055–1058.
- Oliver R. 2019. Nosema Part 4 : Nosemosis. *Sci Beekeep.*:1–14. scientificbeekeeping.com/nosema-part-4-nosemosis/%0AContents.
- Orantes Bermejo FJ, González Megías A, García Fernández P. 1996. Prevalence of parasitization by Diptera in *Apis mellifera* L in southern Spain. *Apidologie.* 27(6):467–471. doi:10.1051/apido:19960605.
- Paillard M, Mielgo P, Giovenazzo P. 2020. Final Report : Apiguard® efficacy for controlling *Varroa destructor* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Canada.
- Pascoal M. 2012. Avaliação Da Eficácia De Nova Estratégia De Combate À Varroose Da Abelha (*Apis Mellifera*) Em Portugal: Tratamento Combinado De Acaricidas Homologados. FMV. <https://www.repository.utl.pt/>.
- Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I. 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*. *Apidologie.* 38(6):558–565. doi:10.1051/apido.
- Pires, S.M.A., Cadavez, V., Valério MJ. 2011. Prevalence and geographical distribution of *Senotainia tricuspis* (Meigen) [abstract] OIE Symposium Program.
- Ramadhani K, Ludovick U, Maimuna KT. 2015. Comparison of the efficacy of Apiguard (thymol) and Apivar (amitraz) in the control of *Varroa destructor*. *Spanish J Agric Res.* 13(3).
- Relva CM da S. 2010. Luta contra *Varroa destructor* Anderson & truemán : avaliação de estratégias biotécnicas e bioquímicas com o óleo essencial de *Mentha cervina* L . :1–77. <https://www.repository.utl.pt/handle/10400.5/2885>.
- Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J Invertebr Pathol.* 103(SUPPL. 1):S96–S119. doi:10.1016/j.jip.2009.07.016.
- Sforcin JM, Bankova V, Kuropatnicki AK. 2017. Medical Benefits of Honeybee Products. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2017:2–4. doi:10.1155/2017/2702106.
- Silva MJ V. 2011. *Senotainiose or apimíase*. Lisboa: Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.
- Skubida P, Pohorecka K. 2013. The amitraz strips efficacy in control of *Varroa destructor* after many years application of amitraz in apiaries. *J Apic Sci* 2013; 57(1) 107–121.
- Sousa Neves AMG De. 2006. Manual de Boas Práticas na produção de Mel. www.fnap.pt.
- Suard T, Siefert B, Gisler S. 2007. Efficacy of the thymol-based varroacide THYMOVAR® in a multi-site trial in France during the end of summer and the autumn of 2007. :1–2. www.ecrotek.co.nz .
- Traynor KS, Mondet F, de Miranda JR, Techer M, Kowallik V, Oddie MAY, Chantawannakul P, McAfee A. 2020. *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends Parasitol.* 36(7):592–606. doi:10.1016/j.pt.2020.04.004.
- Williams DL. 2000. A veterinary approach to the European honey bee (*Apis mellifera*). *Vet J.* 160(1):61–73. doi:10.1053/tvj.2000.0474.