



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

**Avaliação do efeito acaricida de óleo essencial de *Mentha cervina* L.
sobre *Varroa destructor***

Ana Luísa Marques Gaspar Serrenho

Orientador:

Professora Doutora Manuela Rodrigues Branco Simões

Co-Orientador:

Professor Doutor António Manuel Coelho Murilhas

10/01/2012

Mestrado em Engenharia Zootécnica

Dissertação

**Avaliação do efeito acaricida de óleo essencial de *Mentha cervina* L.
sobre *Varroa destructor***

Ana Luísa Marques Gaspar Serrenho

Orientador:

Professora Doutor Manuela Rodrigues Branco Simões

Co-Orientador:

Professor Doutor António Manuel Coelho Murilhas

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Manuela Branco, pela oportunidade de fazer a tese na área da apicultura e por todo o apoio e ensinamentos durante todo o processo.

Ao Professor Doutor António Murilhas, pela co-orientação e ensinamentos e, em especial, pela honestidade acerca do mundo difícil da Apicultura.

Ao Professor Doutor Nuno Costa, por todo o seu apoio, ensinamentos e amizade durante estes últimos anos, se não fosse por ele não tinha nem os conhecimentos nem a motivação para continuar a querer aprender mais sobre a Apicultura.

À Professora Joana Godinho, pelo apoio incondicional ao longo da tese, ensinamentos e amizade.

Ao INRB pela cedência do apiário.

À Engenheira Leandra Rodrigues, por todo o apoio durante a tese, simpatia e disponibilidade.

À Professora Doutora Ana Monteiro, pela cedência dos óleos essenciais, sem os quais esta tese não seria possível.

À Professora Doutora Margarida Moldão, pelo apoio prestado, ensinamentos e pela disponibilidade constante.

Ao Engenheiro Vítor Alves, pela disponibilidade ao fazer os filmes utilizados na parte prática do trabalho e simpatia.

Ao Professor Doutor Eduardo Mateus, pela disponibilidade e ensinamentos.

Ao senhor Agostinho do Departamento de Ciências do Ambiente, Secção de Agrometeorologia, pela cedência dos dados meteorológicos da Tapada da Ajuda, que prontamente me foram entregues.

Aos professores, colegas e demais pessoas que contribuíram para o meu processo formativo e que fez de mim a pessoa que sou hoje.

Aos meus amigos pela amizade, horas bem passadas, chamadas de atenção e apoio em todos os momentos.

À minha grande amiga Ana Sofia, pela amizade incondicional.

Aos meus cães, pelos momentos de descontração, ternura e amizade.

Aos meus pais e irmão, pelo amor, carinho e paciência ao longo destes anos e por me terem proporcionado esta “viagem”.

Ao meu namorado, por tudo! Pelo amor, amizade, compreensão e companheirismo. Por estar sempre, sempre lá...

Um grande obrigado a todos!

RESUMO

A varroa destructor é um ácaro que compromete a sobrevivência e produtividade das abelhas, acarretando grandes prejuízos para a actividade apícola. Actualmente, uma das linhas de investigação nesta área passa por tratamentos através de óleos essenciais.

Este trabalho teve como objectivo avaliar o efeito acaricida de óleo essencial (OE) de *Mentha cervina*. Foram realizados ensaios com varroas sujeitas a várias doses de óleo. Os resultados foram promissores, pois o efeito acaricida foi notório mesmo a doses muito baixas. Ficou igualmente provado que o OE testado não é prejudicial para as abelhas. Foram também estudados em colónias de abelhas, aplicados sob forma de pó ou de filme, mas os resultados não foram tão positivos como inicialmente previsto. O efeito acaricida não foi visível. Consequentemente discute-se uma adequação da matriz e da dosagem.

Palavras-chave: *Mentha cervina*, *Apis mellifera*, varroa, acaricida.

ABSTRACT

Evaluation of the acaricidal effect of the essential oil of *Mentha cervina* on *Varroa destructor*

Varroa destructor endangers the survival and productivity of honey bee colonies worldwide, causing major damage to the beekeeping industry. Currently, one of the research lines looking for better ways of coping with Varroa is the assessment of essential oils that may be successfully used in colony treatments. The main aim of this study was to evaluate the acaricidal effect of the essential oil of *Mentha Cervina* on phoretic Varroa mites. Laboratory tests were performed with doses of essential oil ranging from 0.1 to 10 µl. The results were globally very promising, since the acaricidal effect on Varroa was manifest even at considerably low dosages, being apparently harmless to individual bees. The tested essential oil was also applied to honey bee colonies, either in a powder or in a film carrier. The results were not as positive as anticipated, considering that no added acaricidal effect was found in field treatments.

Keywords: *Mentha cervina*, *Apis mellifera*, Varroa, Acaricide.

EXTENDED ABSTRACT

*Evaluation of the acaricidal effect of the essential oil of *Mentha cervina* on *Varroa destructor**

The *Varroa destructor* mite is presently one of the greatest enemies of honey bee colonies worldwide, affecting its productivity and endangering its survival. Although there are several chemical treatments available to control this ectoparasite, the development of resistance to synthetic acaricide treatments has been recurrently reported. As a result, alternative strategies to mitigate this problem are needed. One potentially successful option is the use of essential oils.

Mentha cervina is an aromatic herb of great importance in Portuguese cuisine, which can be frequently found near rivers, streams or areas submerged in water during most of the year. This plant develops in the spring, blooming in summer when the content of essential oil is highest (4%) and considerably higher than generally found in other mints.

This work aimed at determining the toxicity of essential oil of the *Mentha cervina* on phoretic *Varroa* mites. Laboratory tests were first conducted on individual adult worker bees and phoretic *Varroa* in enclosed spaces, using volatile purified essential oil. Sponges were used as volatilization substrate. The essential oil of *M. cervina* was also later field-tested in full-sized honey bee colonies, applying it in matrix envelopes of starch powder or film left inside the colonies for two weeks. During this period, the mortality of both adult female mites and adult honey bees was monitored and compared with control groups.

In laboratory experiments, phoretic *Varroa* and adult worker bees were obtained from six honey bee colonies placed at the apiary of the 'Tapada da Ajuda' (Lisbon, Portugal), where the field trials were also later carried out. The essential oil was extracted by hydrodistillation of plant material grown in 'Torres Vedras' (Portugal) and previously harvested in 2009, at flowering time. The starch-based encapsulated powder matrix was obtained by spray drying, whereas the hydrophilic film matrix was made with chitosan.

In the laboratory, various trials were performed on *Varroa* mites subjected to nine essential oil amounts (ranging from 0.1 to 10 µl). Irrespective of the applied essential oil dosage, 100 %

Varroa mortality was reached after one day of exposure. The behaviour of the Varroa mites during this period was also monitored and accounted for. The studied essential oil apparently had no significant acute toxicity to the adult worker bees, considering that very high survival rates were observed after 24 hours of exposure, without mortality patterns significantly deviating from untreated control groups.

On the contrary, in honey bee colony field tests the results obtained with the essential oil did not meet the initial expectations. No significant increase in Varroa mite mortality could be observed during the first two weeks of treatment, possibly as a result of the extremely fast essential oil volatilization (which could have been facilitated by the intensive ventilating activity recorded in the treated colonies).

Further studies are needed to find out a higher efficacy essential oil releasing matrix (allowing for slower, more constant, essential oil volatilization rates) and to fine tune the essential oil dosage best suited for honey bee colony field treatments.

Índice

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT.....	iv
EXTENDED ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
I. ENQUADRAMENTO DO TEMA	1
1. Introdução e objectivos	1
2. Organização e biologia das colónias de abelhas (<i>Apis mellifera</i>)	3
2.1. Biologia da colónia	3
2.2 Ciclo biológico e dinâmica da população	5
2.3 Mecanismos de defesa contra invasores	7
3. Dinâmica e aspectos comportamentais da varroa (<i>Varroa destructor</i>)	8
3.1 Sintomas e patologia da varroa	9
3.2 Tratamentos químicos e resistência	9
4. Utilização de óleos essenciais no combate da varroa	11
4.1 Efeitos biológicos dos óleos essenciais	12
4.2 Óleos essenciais da Hortelã-da-ribeira (<i>Mentha cervina</i>).....	13
4.3 Encapsulamento de óleos essenciais	14
4.4 Filmes comestíveis (tiras).....	14
II. MATERIAIS E MÉTODOS	16
1. Aquisição do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	16
2. Aquisição do material biológico (abelhas, zângãos e varroas)	17
3. Testes ao nível laboratorial do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	18
3.1 Teste da actividade do OE em varroas.....	18
3.2 Teste da actividade do OE em abelhas	19
3.2.1 Teste de confirmação de resultados.....	19
4. Extracção e análise cromatográfica do OE.....	21
5. Aplicação do OE em colónias infestadas.....	23
6. Tratamento estatístico.....	25
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26

1.	Caracterização do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	26
2.	Testes ao nível laboratorial do óleo essencial de <i>Mentha cervina</i>	29
2.1	Teste da actividade do OE em varroas.....	29
2.2	Teste da actividade do OE em abelhas.....	34
2.2.1	Teste de confirmação de resultados.....	35
3.	Aplicação do OE em colónias infectadas.....	37
IV.	Dificuldades encontradas no trabalho.....	42
V.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
VII.	ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama dos factores intra-colónia que influenciam o sucesso da colónia	5
Figura 2 - Diagrama dos factores ambientais que influenciam o sucesso da colónia.	6
Figura 3 – Filmes utilizados no ensaio de campo.....	16
Figura 4 - Quadro zângãos utilizado para a recolha de varroas.....	17
Figura 5-Pormenor de varroas sobre o corpo dos zângãos.....	18
Figura 6 - Pormenor de uma caixa	18
Figura 7 - Pormenor caixa	20
Figura 8 - Pormenor caixas na estufa.....	20
Figura 9 - Sacos de rede.....	24
Figura 10 - Espectro de massas obtido para a amostra de OE na análise por GC/MS mediante ionnização de campo (GC/FI-MS), com a identificação das classes de compostos predominantes.	26
Figura 11 - Cromatograma para a análise em GC/MS mediante ionnização de campo (GC/FI-MS)	27
Figura 12 - Espectro de massa obtido para o segundo maior pico e respectivo espectro de referência para a mentona.....	28
Figura 13 – Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm ³ com diferentes doses de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> (1 a 10 µl) e controlo (0 µl) no período de 18 horas...	30
Figura 14 - Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm ³ com diferentes doses de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> (1 a 10 µl) e controlo (0 µl) nas primeiras duas horas de ensaio.	31
Figura 15 - Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm ³ com diferentes doses de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> (0,1 a 1 µl) e controlo (0 µl) no período de 24 horas.	31

Figura 16 - Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm ³ com diferentes doses de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> (0,1 a 1 µl) e controlo (0 µl) nas primeiras duas horas de ensaio.	32
Figura 17 – Proporção das doses de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> utilizadas nos ensaios 1 e 2.	33
Figura 18 - Média global (+e.p.) das taxas de sobrevivência no primeiro ensaio de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> , doses de 1 a 10 µl e controlo (0 µl).	33
Figura 19 – Curvas de sobrevivência de abelhas obreiras tratadas, em caixas de 716,6 cm ³ , com diferentes doses de óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> (0,1, 0,5 e 1 µl) e controlo (0 µl) em três horas e meia de ensaio.	35
Figura 20 – Curvas de sobrevivência de abelhas obreiras tratadas, em câmara climática, com óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> (0,1 µl) e controlo (0 µl) durante 24 horas de ensaio.	36
Figura 21 - Pormenor do filme roído pelas abelhas; fonte: autora.	37
Figura 22 - Mortalidade das abelhas durante o período de ensaios com óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> . Momento do tratamento do ensaio final assinalado com a seta.	38
Figura 23 – Queda de varroa durante o período de ensaio com óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> . Momento do tratamento do ensaio final assinalado com a seta.	39
Figura 24 - Queda varroa: colmeia 1 tratada com óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> . Momento do tratamento assinalado com a seta.	39
Figura 25 - Queda varroa: colmeia 2 tratada com óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> . Momento do tratamento assinalado com a seta.	40
Figura 26 - Queda varroa: colmeia 3 tratada com óleo essencial de <i>Mentha cervina</i> . Momento do tratamento assinalado com a seta.	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1- Contagens da mortalidade das varroas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores).....	47
Anexo 2 - Taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores)	48
Anexo 3 - Teste de log-rank e a comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores).....	48
Anexo 4 - médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores)	49
Anexo 5 - Contagens da mortalidade das varroas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores)	50
Anexo 6 - Taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores)	51
Anexo 7 - Teste de log-rank e comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores)	51
Anexo 8 - Médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores).....	52
Anexo 9 - Contagens da mortalidade das abelhas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em abelhas)	52
Anexo 10 - Taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas)	53
Anexo 11 - Teste de log-rank e a comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em abelhas)	54
Anexo 12 - Médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas)	54
Anexo 13 - Contagens da mortalidade das abelhas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados)	55

Anexo 14 - taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados).....	55
Anexo 15 - Teste de log-rank e a comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados).....	56
Anexo 16 - Médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados).....	56
Anexo 17 – Monitorização da queda diária de varroa nas colónias infestadas (aplicação do OE em colónias)	57
Anexo 18 - Monitorização da mortalidade diária de abelhas nas colónias infestadas (aplicação do OE em colónias).....	58
Anexo 19 - Dados meteorológicos da tapada da ajuda referente ao período de ensaios.	59
Anexo 20 - Cromatograma obtido por gc/ms mediante ionização electrónica (extracção e análise cromatográfica).....	60
Anexo 21 - Espectro de massa obtido para a pulegona (pico com tempo de retenção 22.30 min) (extracção e análise cromatográfica).....	61
Anexo 22 - Espectro de referência para a pulegona (extracção e análise cromatográfica)	62

I. ENQUADRAMENTO DO TEMA

1. Introdução e objectivos

As abelhas, pertencem à terceira maior ordem de insectos, Hymenoptera, onde pertencem igualmente as formigas, habitando o nosso planeta desde o Cretácico. Estes insectos são especialmente conhecidos e admirados pelas suas comunidades sociais extremamente organizadas, denominadas colónias.

Quando falamos de abelhas, intuitivamente, falamos no enorme peso que têm na polinização e reprodução de várias plantas, em particular, de todas aquelas que dependem da polinização feita por insectos (polinização entomófila). As abelhas são ainda detentoras de um comportamento que em muito contribui para a eficácia da polinização: a fidelidade. Este comportamento peculiar otimiza o processo de fecundação e conseqüente sucesso reprodutivo uma vez que a abelha na sua colecta de pólen ou néctar de uma planta, permanece fiel a essa mesma espécie de planta, até que esta deixe de ser “atractiva”, ou seja, deixe de contribuir satisfatoriamente para as necessidades da colónia. Por outro lado, a eficiência da polinização deve-se também à própria anatomia da abelha, ao elevado número de elementos que constituem as colónias e ao sistema de comunicação, sob fontes de recursos, que estas utilizam. No entanto, não podemos deixar de mencionar o papel igualmente importante que as plantas desempenham neste processo, através de mecanismos de atracção das abelhas. Sejam estes aromas e/ou cores, que muitas vezes escapam à nossa visão e olfacto, a própria anatomia da planta e as ofertas de alimento. Este aspecto polinizador é, hoje, muito reconhecido pelas actividades ligadas à produção vegetal, ganhando relevo na produção de muitas culturas agrícolas (Spürgin, 1997) e ecossistemas terrestres (Bradbear, 2009).

A actividade da abelha como insecto polinizador, e conseqüente multiplicação, conservação e estabilidade dos ecossistemas das plantas, indica-nos outra linha de acção, a da protecção e preservação da Natureza. É certo que outros insectos também possuem esta função

polinizadora, mas pelo seu modo de vida solitário não contribuem em tão grande escala como contribuem as numerosas e organizadas abelhas. Havendo exceções em climas com temperaturas muito baixas, em que a polinização é assegurada, na sua maioria, por morcegos e pássaros (Spürgin, 1997). Nós, humanos, e outros animais beneficiamos indirectamente deste processo, uma vez que as espécies vegetais são a principal base da nossa alimentação e sobrevivência. Por outro lado, existem outras espécies que dependem das abelhas alimentando-se da criação, mel, pólen ou cera ou parasitando, sendo que alguns destes parasitas coabitam na colónia, como é o exemplo do ácaro *Varroa destructor* Anderson e Trueman (Anderson & Trueman, 2000).

A varroa é responsável por uma doença chamada Varroose, que prejudica grandemente a sobrevivência e produtividade das colónias, acarretando grandes prejuízos para a actividade apícola. Este ácaro tem origem na Ásia onde co-habita com a *Apis cerana*, tendo sido observado pela primeira vez em *Apis mellifera* em 1959 no sudeste asiático (Anderson & Trueman, 2000).

Já em Portugal foi pela primeira vez encontrado em 1987 na região de Entre o Douro e Minho, disseminando-se rapidamente pelo país causando inúmeros estragos (Vieira & Branco, 1992). Actualmente, este parasita continua a ser fatal para as colónias não tratadas (Murilhas & Casaca, 2004) e apesar da existência de tratamentos contra a varroa, a hipótese deste parasita estar a desenvolver resistência aos tratamentos actuais impulsiona a necessidade de se pensar em estratégias alternativas. Em 1995, foram observados e registados os primeiros sinais desta resistência (Milani, 1999). Como tal, apicultores e comunidade científica têm estado vigilantes e concentrados na tentativa de solucionar esta problemática, sendo crescente a investigação nesta área. Uma das linhas possíveis de investigação passa pelo uso de óleos essenciais, pela sua toxicidade característica, e por serem produtos naturais.

Este trabalho visou testar a eficácia de óleos essenciais extraídos de *Mentha cervina* L. no combate à varroa. Os óleos essenciais foram testados sob três formas: voláteis libertados da substância pura imersa em esponja, e em pó e em filme numa matriz de amido. Primeiro visou-se realizar testes laboratoriais, com varroas e abelhas, no sentido de averiguar a toxicidade em

ambos. Após estes testes, foi efectuado um ensaio em apiário, onde se testou os óleos essenciais, na forma de pó e filme, em colónias infestadas.

2. Organização e biologia das colónias de abelhas (*Apis mellifera*)

2.1. Biologia da colónia

As abelhas organizam-se em grandes famílias que a que se dá o nome de colónias. Os indivíduos que constituem as colónias diferem entre eles, desempenhando diversas funções consoante a casta, idade ou necessidades da colónia. As abelhas de uma colónia possuem um odor específico, pelo que se reconhecem entre elas, distinguindo indivíduos de colónias vizinhas. A colónia é, normalmente, constituída pela rainha, zângãos e obreiras (cerca de 95% da população; Branco, 1997). A rainha assume um papel importante na colónia, mantendo-a unida e assumindo um ponto-chave no processo de reprodução e multiplicação da colónia. A rainha é a única fêmea fértil, ou seja, a única capaz de colocar ovos férteis fecundados, que originarão obreiras ou rainhas, de acordo com a alimentação. Já as obreiras só colocarão ovos não fecundados, de indivíduos haplóides que originam zângãos (machos). Normalmente, existe apenas uma rainha na colónia, excepto em momentos específicos como a enxameação. A enxameação é um fenómeno pelo qual a colónia se divide. Neste processo, a rainha mais velha abandona a colónia com parte da população, com o intuito de estabelecer nova colónia. Apesar do papel matriarca que a rainha assume as tarefas das obreiras são igualmente importantes para a colónia.

A função desempenhada por uma obreira num dado momento da sua vida dependerá consideravelmente da sua idade, começando no interior da colmeia com acções de limpeza e terminando com a procura e recolha de alimento (Becher *et al.*, 2010). As funções das obreiras não são estanques, podendo sofrer avanços ou recuos consoante as necessidades da colónia, isto é, uma obreira pode voltar a executar a mesma função ou funções que só desempenharia

mais tarde se assim as necessidades da colónia o exigirem. Estas funções garantem o desenvolvimento e sobrevivência da colónia.

Os zângãos são os elementos masculinos desta comunidade e têm duas funções: a de contribuir para a regulação da temperatura da colmeia, tal como as obreiras, e a função reprodutora, principal. Durante a sua vida, que pode ir até cerca de 3 meses, os zângãos voam e saem da colónia várias vezes, mas morrem após acasalar a rainha (Branco, 1997).

A rainha, ao iniciar a postura, coloca os ovos nas células asseguradas pelas obreiras, que originarão a próxima descendência.

O ovo, uma vez depositado verticalmente no alvéolo começa a pender para o lado ao fim de três dias, iniciando-se a primeira fase da metamorfose, a fase larvar. As larvas são alimentadas pelas obreiras com uma papa nutritiva, consoante a sua casta e idade. As larvas que originam rainhas são sempre alimentadas com geleia real, ao contrário das que originam obreiras ou zângãos. Estes últimos, apenas se alimentam de geleia real nos três primeiros dias do desenvolvimento. Após a larva completar o desenvolvimento, as abelhas jovens selam a entrada das células com uma camada de cera porosa (operculação), principiando profundas alterações. A larva passa então à fase de pupa e posteriormente à fase adulta, altura em que sairá da célula (Branco, 1997).

O período de desenvolvimento médio das obreiras, rainha e zângãos é de 21, 16 e 24 dias, respectivamente.

As obreiras que nascem na Primavera tendem a ter uma vida mais curta, 20 a 40 dias enquanto as que nascem no Outono viverão possivelmente 4 a 5 meses (Maurizio, 1968), garantindo a sobrevivência da colónia até à Primavera seguinte. Esta diferença, em termos de longevidade, começou por ser atribuída ao elevado metabolismo a que as obreiras nascidas na Primavera estavam sujeitas na procura intensa de alimento (Maurizio, 1968), mas mais tarde descobriu-se que existem diferenças fisiológicas de acordo com a época de nascimento, relacionadas com a actividade de criação, ditando essa longevidade (Fluri, 1983). Por outro lado, há quem tenha demonstrado que as abelhas de colónias mais pequenas vivem mais tempo que as de colónias maiores (Rueppell et al., 2009), apresentando algumas explicações possíveis, entre elas, o facto

de as primeiras iniciarem a sua tarefa de recolha de alimento mais cedo. Já a rainha, pode viver anos, sendo substituída mais tarde por uma rainha mais nova, morrendo ou abandonando a colónia (enxameação).

2.2 Ciclo biológico e dinâmica da população

Entender a dinâmica das populações das abelhas e a aplicação desses conhecimentos continua a ser uma questão de grande importância. Na prática, perceber o modo como a população evolui e se comporta pode ser um excelente auxiliar na gestão de um apiário (Branco, 1997).

A população adulta e imatura das colónias varia sob a influencia de vários factores internos e externos às colónias (figuras 1 e 2). Anualmente as colónias apresentam um ciclo biológico sincronizado com a variação sazonal do fotoperiodismo e dos recursos alimentares. As condições climáticas, a uma escala pontual, influenciam também as condições de voo. A chuva e vento fortes, por exemplo, podem impedir a actividade de voo. A temperatura ambiente, para além de condicionar a temperatura interna da colónia, influencia a actividade de recolha de alimento pelas obreiras. Nos climas temperados as abelhas têm um ciclo biológico anual bem definido em duas fases: a primeira fase de expansão - multiplicação da população - que antecede a Primavera e Verão e a segunda de retracção - decréscimo da população - durante o período adverso do Outono e Inverno (Branco, 1997), estando adaptado à evolução dos recursos alimentares.

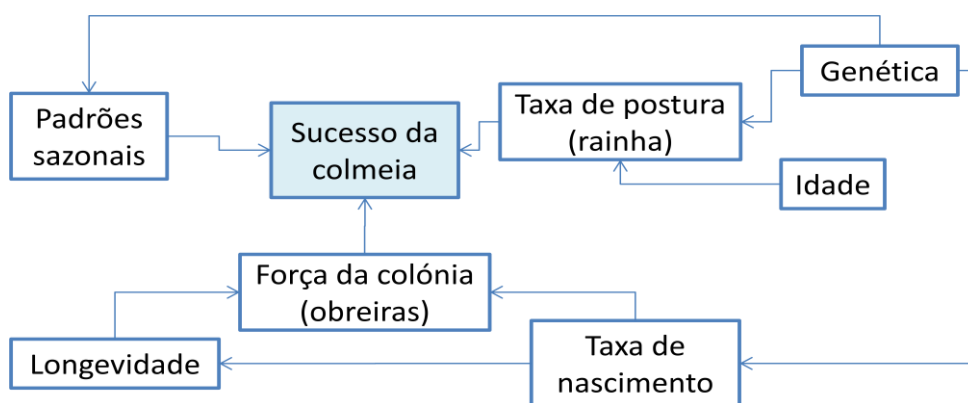


Figura 1 - Diagrama dos factores intra-colónia que influenciam o sucesso da colónia; adaptado de Branco (1997)

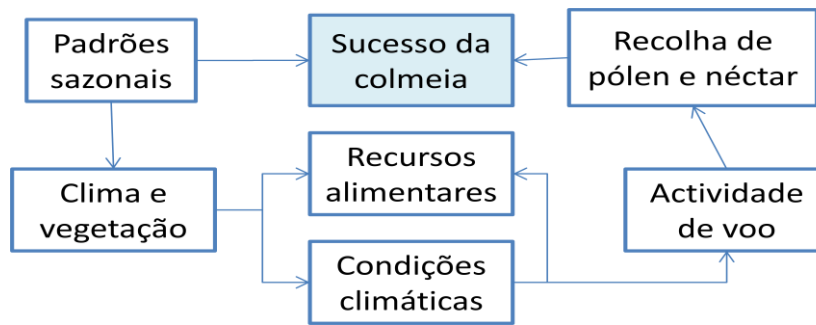


Figura 2 - Diagrama dos factores ambientais que influenciam o sucesso da colónia; adaptado de Branco (1997).

Estas oscilações na população dependem de vários factores: taxa de postura, dimensão da colónia, clima e presença de criação (Ghamdi & Hoopingarner, 2004). A taxa de postura é dos factores que mais afecta a dinâmica da população e depende de outros factores como luminosidade (horas de luz) e actividade de pastoreio (pólen e/ou néctar) (Ghamdi & Hoopingarner, 2004). Assim sendo a criação será menor ou nula no final do Outono até ao fim do Inverno, uma vez que as horas de luz são reduzidas e a actividade de pastoreio é quase nula ou nula devido à escassez de recursos. A dimensão da colónia dependerá de todos os outros factores mencionados, mas também do espaço físico disponível para a colónia poder crescer. Já o clima vai influenciar fortemente as actividades das abelhas, nomeadamente actividades de voo/pastoreio. Se as condições não forem as ideais (haver vento ou chuva, por exemplo) as abelhas acolhem à colónia, passando a desempenhar outras tarefas, influenciando negativamente a colecta de alimentos (Woyciechowski & Kozlowski, 1998). Quanto à população imatura, o seu sucesso, depende do equilíbrio entre o número de obreiras e a taxa de postura da rainha. A proporção entre o número de larvas e o número de obreiras convém ser a adequada, uma vez que estas últimas têm de ser suficientes para inspeccionar, limpar e alimentar a criação e ao mesmo tempo manter a temperatura da colónia constante no ninho (34-35°C) (Becher *et al.*, 2010), garantindo condições para o desenvolvimento e crescimento das novas abelhas. Se este equilíbrio não existir, por diversas razões (como morte de obreiras) as obreiras encarregam-se de destruir células de criação, através de mecanismos como o canibalismo, sub-alimentação das larvas ou descida da temperatura da colónia (Schmickl & Crailsheim, 2004). Por outro lado, a

manutenção da criação vai depender fortemente das reservas de proteínas (pólen) tendo de existir uma gestão exacta destes recursos por parte da colónia, já que estes são também consumidos por praticamente todos os elementos desta comunidade. Este consumo de pólen pode estar limitado em situações de escassez de reservas, sendo o pólen partilhado de outra forma. (Schmickl & Crailsheim, 2004). As obreiras possuem um sistema de comunicação que lhes permite transmitir às outras as necessidades da colónia, neste caso, maiores ou menores quantidades de pólen.

2.3 Mecanismos de defesa contra invasores

As colónias desenvolveram mecanismos de defesa contra invasores e predadores de forma a assegurar os seus interesses, protegendo a criação e suas reservas alimentares. Através destes mecanismos podem minimizar as ameaças apresentadas pelos seus inimigos. Estas acções de defesa, em certos casos (exemplo da varroa), passam pelos comportamentos de limpeza da colónia (Boecking & Spivak, 1999), havendo a capacidade de detectar e retirar organismos estranhos. É certo que o sucesso desta operação dependerá do momento em que for executada (Boecking & Spivak, 1999), isto é, antes da postura de ovos. Por outro lado, as abelhas também efectuam operações de limpeza nelas próprias e com a ajuda de outras, retirando o pólen e corpos estranhos retido nos pêlos do corpo tal como ectoparasitas (exemplo, varroa). No entanto, este mecanismo parece não ser suficiente para evitar elevados graus de infestação de varroa.

3. Dinâmica e aspectos comportamentais da varroa (*Varroa destructor*)

A varroa é um ectoparasita, em qualquer das suas fases (adulta ou imatura), que vive exclusivamente das abelhas, estando o seu ciclo de vida perfeitamente adaptado ao da abelha.

As fêmeas adultas têm forma achatada e cor castanho-avermelhada, com corpos de forma oval de aproximadamente 1,6-1,8 x 1-1,2 mm. A boca das fêmeas está dotada de mecanismos que penetram a pele do hospedeiro e sugam a hemolinfa. Os machos são de tamanho mais reduzido e de cor clara (Murilhas & Casaca, 2004).

A varroa está completamente dependente da fase imatura da abelha para se reproduzir, alojando-se nos alvéolos antes de estes serem fechados (Branco, 1997). Após aproximadamente 60 horas (2 dias e meio) de se introduzir no alvéolo, a fêmea começa a depositar os ovos em intervalos próximos de 30 horas. Em colónias muito infestadas podemos encontrar duas ou mais fêmeas em cada célula de criação (Murilhas & Casaca, 2004). Na maioria dos casos o primeiro ovo depositado dará origem ao macho e os seguintes a fêmeas (Donze & Guerin, 1994). A varroa vai alimentar-se da hemolinfa das larvas de abelhas, essencial ao seu processo de reprodução e sobrevivência.

Existe uma clara preferência pelas células dos zângãos, uma vez que estas têm uma maior dimensão, maior período de exposição para a invasão (estimulado pelas larvas) (Boot et al., 1995) e um ciclo de crescimento maior, favorecendo a reprodução e sobrevivência do parasita.

Assim que a abelha adulta sai do alvéolo leva com ela a “varroa mãe” e a sua descendência feminina. O macho e as fêmeas imaturas morrem aquando a abertura do alvéolo pelas abelhas.

Os machos têm um período de vida muito curto, fecundando as fêmeas dentro dos alvéolos.

A varroa necessita da abelha para se propagar, acoplando-se à mesma. Ao ser transportada no corpo da abelha, pode facilmente infectar abelhas de outras colónias em fenómenos como o da enxameação, deriva, pilhagem ou livre-trânsito de zângãos. Por outro lado, muitas vezes os apicultores não agem da forma mais indicada, transportando as colónias ou material contaminado para outros locais, contribuindo para a disseminação da varroa (Murilhas & Casaca, 2004).

3.1 Sintomas e patologia da varroa

Os efeitos deste parasita nas colónias nem sempre são óbvios, aumentando com o número de ácaros e com a sua densidade na colónia. Quando este número é baixo não existem efeitos muito notórios, mas quando o número de ácaros é significativo, podemos ter sérios impactos na população (adultos e criação). Nesta última situação, de grave infestação, as colónias entram em colapso acabando as abelhas na sua totalidade por abandonar a colónia ou morrer (Murilhas & Casaca, 2004).

As colónias infestadas podem não apresentar sintomas claros de infestação até ao verão, podendo mesmo verificar-se boas produções, mas acabarão por sucumbir no Outono ou Inverno (Murilhas & Casaca, 2004), momento em que a população decresce.

Quando as colónias apresentam um grau de infestação elevado as abelhas manifestam uma maior probabilidade de surgimento de deformações nas asas e abdómen, perda de peso, depressão do sistema imunitário, diminuição da esperança de vida, decréscimo súbito (e anormal para a época do ano) na população de abelhas adultas, anomalias na criação, tais como pupas em células não operculadas e células operculadas muito dispersas pelos favos, ou criação negligenciada/morta não removida do favo pelas abelhas adultas da colónia (Murilhas & Casaca, 2005).

3.2 Tratamentos químicos e resistência

Actualmente os tratamentos contra a varroa baseiam-se frequentemente em acaricidas sintéticos (Ruffinengo et al., 2007), como Apistan®, Apivar® e Bayvarol®. O uso contínuo destes produtos ao longo dos anos e erros na aplicação dos mesmos – doses pouco letais – originaram o desenvolvimento de resistência por parte da varroa a estes acaricidas (Milani, 1995). Em 1995 foram registados os primeiros sinais dessa resistência (Milani, 1999).

A resistência é fruto da variabilidade individual/colectiva que é determinada geneticamente, sendo passada facilmente à descendência. Embora estas varroas resistentes tenham

dificuldades em competir com as varroas susceptíveis aos tratamentos, uma vez que existem em menor escala, ao usarmos estes acaricidas estamos a contribuir para essa competição no sentido de favorecer as varroas resistentes, promovendo uma população extremamente resistente no futuro (Le Conte *et al.*, 2010).

Por outro lado, existe o perigo de ocorrerem resíduos dos acaricidas nos produtos da colónia, como o mel ou a cera, o que justifica a pesquisa de tratamentos alternativos. Esta problemática traz um novo desafio para os investigadores: elaborar novas formas de combate da varroa, travando ou abrandando o aparecimento de ácaros resistentes aos actuais tratamentos. Uma das linhas de acção passa pelo uso de ácidos orgânicos, óleos essenciais ou qualquer dos seus componentes (Ruffinengo *et al.*, 2007).

4. Utilização de óleos essenciais no combate da varroa

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de compostos voláteis naturais, extraídos das plantas aromáticas e condimentares por destilação. Os compostos dos OE resultam do metabolismo secundário das plantas e são conhecidos pelo seu odor intenso. Na natureza são detentores de um papel importante na protecção das plantas, actuando como bactericidas, antivirais, antifúngicos e insecticidas. Os OE são produzidos maioritariamente e armazenados nos tricomas glandulares. Estes óleos são caracterizados por dois ou três grandes “famílias” de compostos (20-70%), que geralmente determinam as propriedades biológicas. Os grupos principais são compostos por terpenos e terpenóides e outros constituintes aromáticos ou alifáticos, todos caracterizados por baixos pesos moleculares (Bakkali *et al.*, 2008). A síntese dos OE e sua composição está dependente tanto de factores intrínsecos, inerentes à constituição genética, como a factores externos, dependentes das condições ecológicas e ambientais em que as plantas se desenvolvem (Van den Broucke, 1983). Pelas suas propriedades, os OE são utilizados no sector alimentar, farmacêutico, cosmético, agronómico e indústria de perfumes, sendo importante entender a sua acção biológica (Bakkali *et al.*, 2008).

Os OE são actualmente objecto de investigação no combate da varroa uma vez que apresentam uma baixa toxicidade para as abelhas, são menos prejudiciais para o meio ambiente e têm uma grande aceitação por parte dos produtores (Isman, 2000). Cerca de 150 óleos essenciais já foram testados no controlo da varroa (Imdorf, Bogdanov, Ochoa, & Nicholas W. Calderone, 1999). Actualmente já são utilizados compostos de óleos essenciais na luta contra a varroa como o timol (tomilho – *Thymus vulgaris*), eucaliptol (eucalipto – *Eucalyptus spp*) e mentol (hortelã – *Mentha piperita*). Uma das vantagens da utilização dos OE nesta área é que estas substâncias já estão presentes no mel compondo os seus aromas naturais (Maga, 1983). Foi provado que muitos OE têm uma actividade acaricida sobre a varroa (Calderone & Spivak, 1995) apresentando baixa toxicidade para as abelhas (Lindberg, 2000).

4.1 Efeitos biológicos dos óleos essenciais

Como já foi mencionado anteriormente, os OE têm um papel importante na defesa da planta contra insectos, ácaros e agentes patogénicos, evidenciando o efeito tóxico que estas substâncias têm sobre estes organismos. Esta toxicidade deve-se às propriedades de determinados OE ou seus constituintes (Regnault-Roger & Hamraoui, 1993). Estes compostos tóxicos funcionam como neurotoxinas que vão interferir no neurotransmissor octopamina, que é exclusivo dos artrópodes (Isman, 2002), justificando a tolerância dos mamíferos a estes compostos e sua utilização comercial (Belchior, 2009).

A octopamina (OA) é uma monoamina biogénica também conhecida por p-hidroxietanolamina, que tem um papel essencial no controlo do comportamento e na regulação do estado motivacional dos invertebrados, tendo efeitos em alvos periféricos, como os músculos e sistema nervoso central (Degen *et al.*, 2000). A OA pode ser encontrada em grandes porções no sistema nervoso dos artrópodes, sendo responsável pelas mais variadas funções biológicas, actuando como neurotransmissor, neurohormona e neuromodulador (Enan, 2005). A OA presente nos neurónios do cérebro ao ser libertada vai ligar-se aos correspondentes receptores de forma a desencadear uma resposta fisiológica (Roeder *et al.*, 2003). São vários os compostos conhecidos na natureza que apresentam afinidade para os receptores de OA (OARs), sendo na sua maioria agonistas, isto é, que se comportam como competidores na formação de ligações. O amitraz é um bom exemplo de um composto agonista. Por outro lado, há compostos que são antagonistas, não existindo muita informação sobre estes, sabe-se que actuam por bloqueio específico ou inibição da acção da OA (Roeder *et al.*, 2003). Estes compostos, quer sejam agonistas ou antagonistas, vão interferir no sistema nervoso dos artrópodes. Estudos efectuados em baratas (*Periplaneta americana*), demonstraram que os óleos essenciais de plantas aromáticas provocam alterações no sistema nervoso, afectando o ritmo cardíaco destes insectos (Enan, 2005). Relativamente às abelhas, os OE apresentam uma baixa toxicidade (Lindberg, 2000), tornando-se uma grande vantagem na linha de investigação do combate da varroa.

No entanto, os efeitos biológicos dos OE e respectiva eficácia tóxica vão depender de muitos factores que têm de ser considerados, tais como a concentração do óleo, método de aplicação; duração do tratamento; origem da planta e respectivo estado vegetativo; entre outros.

4.2 Óleos essenciais da Hortelã-da-ribeira (*Mentha cervina*)

A *Mentha cervina*, conhecida comumente por hortelã-da-ribeira, é uma planta de grande relevo na gastronomia portuguesa e podemos encontrá-la em rios, ribeiras ou zonas em que, maior parte do ano, se encontram submersas em água (Silva *et al.*, 2009), tratando-se de um proto-hemicriptófito - caules folhosos - de 10 a 40 cm (Franco, 1984). Esta espécie apresenta um elevado teor em OE, pelo que lhe poderá ser atribuído um valor comercial importante. Esta planta desenvolve-se na Primavera, florescendo no Verão, período onde o rendimento em OE é mais elevado (4%), valor muito alto quando comparado com outros estudos em mentas (Rodrigues *et al.*, 2008). Os OE desta espécie, são compostos na sua maioria por pulegona, (61.5-80.1%), seguida da isomentona (3-18%) e limoneno (3-7%) (Rodrigues *et al.*, 2008). A homogeneidade química desta planta contraria maioria dos estudos realizados em mentas e seus híbridos, e poderá ser explicada pela fraca variabilidade genética, devido ao processo reprodutivo nesta espécie ser essencialmente vegetativo (Rodrigues *et al.*, 2007). O elevado teor em pulegona encontrado em todas as populações estudadas, indica que estas pertencem ao quimiotipo pulegona (Rodrigues *et al.*, 2007). Por esta razão, deverá ser apurado se a acção acaricida, existindo de facto, é proveniente da acção da pulegona, como componente maioritário, ou devido à interacção deste com os outros compostos, ainda que em menor quantidade.

4.3 Encapsulamento de óleos essenciais

Os OE são compostos extremamente voláteis, sensíveis à luz, ao calor e ao oxigénio (Kanakdande *et al.*, 2007), o que dificulta a sua utilização e aplicação. O microencapsulamento é um método que poderá resolver estas questões, permitindo a manipulação mais fácil e eficaz dos OE, tendo inúmeras aplicações na indústria alimentar (Loksuwan, 2006). Neste método o ingrediente é protegido dentro de uma cápsula ou esférola ou filme (Loksuwan, 2006), o que cria uma barreira que o protege de reidratações, oxidações ou outro tipo de degradações, evita o contacto com outros ingredientes e controla a sua difusão. A eficiência desta protecção depende essencialmente da composição e estrutura da parede mas também das condições de manipulação dos encapsulados, tais como a temperatura, pH, pressão e humidade. A matriz de encapsulamento pode ser proteica (e.g. leite, gelatina), gomas (e.g. alginato), glucídica (e.g. sacarose, maltodextrina, amido modificado, ciclodextrinas, celulose), lípidos, gorduras, ceras, lectinas (emulsionantes) e fibras (Fuchs *et al.*, 2006).

Actualmente existem vários métodos de microencapsulamento passando pela secagem por “spray drying”, extrusão, suspensão no ar ou leito do fluido, revestimento em turbinas, gelificação, polimerização interfacial e emulsificação. A técnica mais utilizada é a “spray drying”, uma vez que é, economicamente, a mais viável (Kanakdande *et al.*, 2007). Esta técnica tem ainda a vantagem de converter líquidos em partículas sólidas pulverulentas, facilitando o seu manuseamento (Loksuwan, 2006).

4.4 Filmes comestíveis (tiras)

Os filmes, à semelhança das microcápsulas, têm como objectivo proteger o produto ou ingrediente dos agentes exteriores, sendo mais uma forma de podermos manipular os óleos essenciais eficazmente e controlar a sua acção em prol de um objectivo.

Este método é usado na indústria alimentar com vários fins, tais como: preservar a humidade de um determinado produto; separar componentes de um produto, conservando as suas propriedades; aplicação de aditivos, de forma a controlar a sua localização e taxa de libertação; contribuindo assim para a segurança, estabilidade e qualidade do produto final.

A composição dos filmes pode ser dividida em três categorias: hidrocoloidais, lipídicos e compostos. Os hidrocoloidais incluem proteínas, derivados de celulose, alginatos, pectinas, amidos e outros polissacáridos, possuindo uma boa barreira a gases, no entanto, são pouco resistentes ao vapor de água, devido à sua natureza hidrofílica. O grupo dos lipídicos que compreende as ceras, acilgliceróis e ácidos gordos são caracterizados por uma natureza hidrofóbica e por isso, apresentam maior resistência ao vapor de água. Os filmes compostos contêm ambos os grupos anteriores, dando prioridade às vantagens dos dois tipos de filmes e minorizando as suas desvantagens.

Os filmes podem ser formulados por três tipos de mecanismos: coacervação, remoção do solvente e solidificação (Krotcha *et al.*, 1994).

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Aquisição do óleo essencial de *Mentha cervina*

O OE utilizado na parte prática deste trabalho foi o mesmo de um estudo anterior na mesma linha de investigação (Silva, 2010). Esse óleo foi extraído no Edifício João Inácio Ferreira Lapa, do Instituto Superior de Agronomia. O material vegetal foi cultivado em Torres Vedras, colhido na floração no ano de 2009 e armazenado em laboratório até à extração do OE. A extracção foi feita a partir das folhas e flores, por hidrodestilação em aparelho de arrastamento por vapor. Após extracção o óleo essencial foi conservado a -18°C , de forma a conservar as suas propriedades.

O encapsulado e o filme foram igualmente feitos no Edifício João Inácio Ferreira Lapa. O encapsulado teve como base uma suspensão de amido, desidratada por spray drying, sendo armazenado sob a forma de pó num recipiente de vidro. Por cada preparação foi utilizado 4g de OE e 27,5g de amido, obtendo-se aproximadamente 10g de encapsulado, uma vez que existem sempre perdas durante o processo.

Quanto ao filme optou-se por um filme hidrofílico tendo como base o quitosano (figura 3). Foram preparados filmes com três concentrações de OE: 1% (0,04g de OE), 5% (0,17g de OE) e 10% (0,35g de OE).



Figura 3 – Filmes utilizados no ensaio de campo (fonte: autora)

2. Aquisição do material biológico (abelhas, zângãos e varroas)

O material biológico foi adquirido e utilizado no Posto Apícola da Tapada da Ajuda pertencente ao INRB (Instituto Nacional de Recursos Biológicos). Foram atribuídas seis colónias para colecta de material para os ensaios laboratoriais e de campo. As seis colónias seleccionadas não tiveram qualquer tipo de tratamento químico desde o momento da sua selecção para não comprometer os resultados. Os níveis de infestação de varroa foram controlados com a aplicação de açúcar em pó, de forma a manter as colónias equilibradas até à data dos ensaios. A colecta de varroas e zângãos foi previamente assegurada, pelo recurso a dois quadros de zângãos (figura 4). Estes foram vigiados até à data dos ensaios, dependendo a realização destes do estado de desenvolvimento dos zângãos. O recurso ao quadro de zângãos justifica-se pelo facto das células de zângãos serem uma maior fonte de varroa e pela maior facilidade em manipular os zângãos.



Figura 4 - Quadro zângãos utilizado para a recolha de varroas (fonte: autora)

3. Testes ao nível laboratorial do óleo essencial de *Mentha cervina*

3.1 Teste da actividade do OE em varroas

Neste primeiro ensaio avaliou-se o efeito acaricida do OE de *Mentha cervina* sobre a varroa. Com base num estudo anterior (Silva, 2010), foram testadas cinco doses: 1 µl; 2,5 µl; 5 µl; 7,5 µl e 10 µl. Para cada dose foram feitas quatro repetições tal como para o grupo de controlo (0 µl), perfazendo 24 caixas. Foram preparadas esponjas (1,5 cm²), provenientes de panos absorventes de cozinha, para a aplicação do OE, que foram posteriormente coladas com fita-cola de dupla face na tampa de caixas plásticas (figura 5). O óleo foi aplicado na parte inferior da esponja, ou seja, a parte que não tinha fita-cola, para facilitar a libertação dos OE. As caixas eram transparentes para permitir a observação contínua, tinham um volume de 716,6 cm³ (10,5x10,5x6,5 cm).

Em cada caixa foram colocadas 12 varroas juntamente com dois ou três zângãos (figura 6), que serviram de alimento durante o ensaio. As varroas e os zângãos foram distribuídos pelas 24 caixas com o auxílio de uma pinça e só depois se foi colocando o óleo em cada grupo, de forma a tapar em simultâneo as caixas do mesmo grupo e assim registar o tempo. Foram realizadas observações de 15 em 15 minutos até perfazer os 90 minutos. Após os 90 minutos foram feitas mais duas observações: 3 horas e 18 horas após o começo do ensaio. As observações eram feitas de forma a avaliar o comportamento das varroas em três categorias (adesão/libertação do hospedeiro, hiperactividade, inactividade e morte). Era considerada a morte quando ao tocar na varroa não havia qualquer tipo de movimento. O ensaio foi realizado com uma temperatura ambiente de 20°C, permanecendo-se constante.



Figura 5-Pormenor de varroas sobre o corpo dos zângãos (fonte: autora)



Figura 6 - Pormenor de uma caixa (fonte: autora)

Foi realizado um segundo ensaio onde se seguiu praticamente a mesma metodologia do ensaio anterior, havendo apenas alterações nas doses testadas e na última observação das caixas. As doses de OE utilizadas neste ensaio foram 0,1 µl; 0,25 µl; 0,5 µl; 0,75 µl e 1 µl, uma vez que havia interesse em testar doses inferiores às testadas no primeiro ensaio. A última observação neste ensaio ocorreu às 24 horas.

3.2 Teste da actividade do OE em abelhas

Neste ensaio pretendeu-se testar o efeito do óleo essencial nas abelhas. A metodologia relativamente à colocação do óleo e tipo de caixa foi idêntica aos ensaios anteriores com varroas. As doses testadas neste ensaio foram: 0,1 µl; 0,5 µl e 1 µl. Fizeram-se quatro repetições para cada dose, três no grupo de controlo (0 µl). No total foram utilizadas 15 caixas plásticas. Em cada caixa foram colocadas 15 abelhas. As abelhas foram colectadas à entrada de uma colmeia (tábua de voo) com o auxílio de um frasco. À medida que se batia levemente na colmeia, as abelhas entravam no frasco. A colmeia usada para a colecta das abelhas fazia parte do grupo de colónias seleccionadas para os ensaios, não tendo sido submetida a qualquer tipo de tratamento químico nos cinco meses antecedentes. No laboratório as abelhas foram anestesiadas no frasco com um algodão embebido em éter, para facilitar a sua manipulação. Assim que as abelhas iam acordando o óleo era colocado nas esponjas e registado o tempo. Foram efectuadas observações de 15 em 15 minutos. Os aspectos a observar eram essencialmente comportamentais, tendo sido considerado dois tipos: normal (sem alteração) e morte. Mais uma vez era considerada a morte quando ao tocar na abelha não havia qualquer tipo de movimento.

3.2.1 Teste de confirmação de resultados

No ensaio de confirmação de resultados as caixas sofreram uma pequena alteração: em vez da tampa de plástico foi colocada uma rede com a esponja para a aplicação do óleo, havendo mais

arejamento (figura 7). Por outro lado, as caixas foram colocadas na estufa a 35°C, de forma a reproduzir as condições do ninho da colónia (figura 8). Neste ensaio foi testada apenas uma dose (0,1 µl) com quatro repetições. O grupo de controlo (0 µl) tinha igualmente quatro repetições. Em cada caixa foram colocadas 15 abelhas, num total de 8 caixas. Foi ainda colocado mel na rede das caixas para as abelhas se puderem alimentar. Foram efectuadas observações de 15 em 15 minutos até aos 105 minutos, sendo feita uma última observação às 24h. Os aspectos a observar continuaram a ser os mesmos: normal e morte.

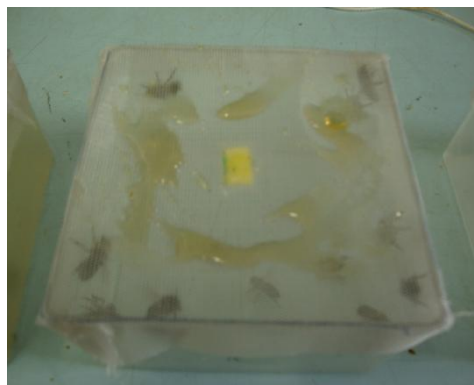


Figura 7 - Pormenor caixa (fonte: autora)

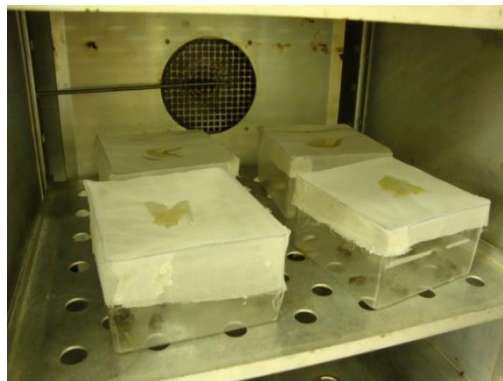


Figura 8 - Pormenor caixas na estufa (fonte: autora)

4. Extracção e análise cromatográfica do OE

A cromatografia foi realizada com o objectivo de identificar e quantificar os compostos presentes no óleo essencial, tal como o tempo de libertação desses compostos. Para a extracção da fracção volátil foi simulado as exactas condições dos ensaios com as varroas e abelhas.

A fracção volátil emitida pelo óleo essencial foi feita por microextracção por fase sólida (SPME), utilizando uma fibra de 100 µm polidimetil siloxano (PDMS), introduzida no interior da caixa que continha a esponja com óleo. Para tal, foi feito um pequeno buraco na tampa, apenas para permitir a entrada da fibra. A extracção foi realizada por 45 minutos.

A análise da fracção volátil foi efectuada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e a identificação dos seus componentes foi realizada por espectrometria de massas acoplada a cromatografia gasosa (GC/MS), utilizando um analisador de massas de “tempo-de-voo” (ToF). Nas análises de espectrometria de massa foram utilizadas duas técnicas de ionização: i) ionização electrónica (EI; 70eV) para identificação dos voláteis e ionização de campo (FI+; 12kV) para obter a informação das massas e das classes de compostos presentes na fracção volátil. As separações dos compostos voláteis foram realizadas em colunas capilares não polares de 5% phenilo- 95% metilsiloxano:

- i) GC-FID - coluna DB-5 com 30 m × 0.32 mm I.D. e 1.0 µm de espessura de filme (J &W Scientific, Folsom, USA).
- ii) GC/MS coluna ZB-5 com 30 m × 0.25 mm I.D. e 0.25 µm de espessura de filme (Phenomenex, Torrance, USA).

As condições operacionais utilizadas foram: temperatura inicial do forno (°C): 50; tempo inicial (min): 1.00; rampa #1 (deg.min-1): 4.0; temperatura Final #1 (°C): 125; isotérmica #1 (min): 0.00; rampa #2 (deg.min-1): 6.0; temperatura Final #2 (°C): 250; isotérmica#2 (min): 5.00; rampa #3 (deg.min-1): 10.0; temperatura Final #3 (°C): 295 em GC-FID e 250 em GC/MS; isotérmica#3 (min): 0.00; gás de arraste: GC-FID: hidrogénio a 1.7 mL min-1 (pressão constante), GC/MS: Hélio

a 1.0 mL min⁻¹ (fluxo constante); modo de injeção: split (purge) 1:20; temperatura do injetor: 250°C; e temperatura do FID: 250°C.

Em GC-FID os dados foram recolhidos utilizando um integrador Merck-Hitach D-2500 Chromato-integrator e em GC/MS a temperatura da linha de transferência foi 250°C e a da fonte de 220°C.

5. Aplicação do OE em colónias infestadas

Este último ensaio constou na aplicação dos OE em colónias, quer na forma de encapsulado em pó quer em filme (tiras).

Primeiro, fez-se a monitorização das seis colónias, que teve início nas três semanas anteriores à data dos ensaios. Nesta monitorização registou-se a queda natural da varroa e a mortalidade das abelhas. Para registar a queda das varroas foram colocados tabuleiros, forrados com papel branco, nos estrados das colmeias, de forma a facilitar as contagens. Os suportes das colmeias estavam equipados de “copos” onde se colocou óleo queimado, impedindo que as formigas se deslocassem aos tabuleiros e levassem as varroas, adulterando os resultados. Os quadros foram retirados nos dias de contagem e colocados de novo, já limpos, nesses mesmos dias. Estas contagens foram efectuadas directamente do papel, sendo este substituído quando necessário. A mortalidade das abelhas foi monitorizada com o auxílio de telas plásticas transparentes, assentes na frente das colmeias, forrando o chão por completo. As abelhas foram contabilizadas do plástico e posteriormente retiradas. Esta monitorização continuou durante todos os ensaios, permitindo comparar os dados pré e pós ensaios.

Posto isto, foi feito um ensaio preliminar para testar o efeito numa só colónia (número 5), de modo a evitar prejudicar as seis colónias na totalidade, se fosse esse o caso. A tira foi colocada num quadro central da colmeia. Neste primeiro ensaio pretendeu-se apenas avaliar aspectos comportamentais das abelhas (mortalidade, arejamento na colónia, entre outros que pudessem surgir), ou seja, se toleravam os óleos e de que forma. A dose utilizada foi a intermédia (5% - 0,17g) e o ensaio teve a duração de 9 horas. As observações foram feitas continuamente durante as primeiras quatro horas. Para tal, foi colocado um banco perto das colmeias, onde o observador podia visualizar as tábuas de voo e respectiva frente das colmeias e onde permaneceu sentado na maioria do tempo, para destabilizar o mínimo possível.



Figura 9 - Sacos de rede (fonte:autora)

No ensaio, propriamente dito, foram utilizadas as outras cinco colónias: 1, 2, 3, 4 e 6. Nas colónias 1 e 2 foi aplicado a tira, mas agora de concentração mais baixa (1%) e introduzida num saco de rede (figura 9) para que as abelhas não a roessem. Na colmeia 3 foi aplicado o encapsulado na mesma proporção (0,2g), admitindo que cada grama de encapsulado continha 0,05g de OE. O encapsulado foi introduzido num saco de chá e só depois no saco de rede, visto este saco ter uma malha demasiado grande para o pó. As colónias 4 e 6 serviram de controlo. Este ensaio teve a duração de duas semanas, onde, quer as tiras quer o encapsulado, permaneceram dentro da colmeia. Para além das contagens da queda de varroa e mortalidade das abelhas foram também registados os aspectos comportamentais, tal como no ensaio preliminar. Sendo que, no primeiro dia foi feita uma observação mais cuidada das colónias, verificando-as de meia em meia hora.

6. Tratamento estatístico

Os dados foram tratados em Excel e *software* SPSS. No SPSS utilizou-se o teste Kaplan-Meier para a análise de sobrevivência de forma a comparar as mortalidades no final dos ensaios. Este teste estima a taxa de sobrevivência e desvio padrão associado aos diferentes momentos do tempo em cada tratamento, o tempo médio e mediana de sobrevivência, desvio padrão e um intervalo de confiança para o tempo médio de sobrevivência a 95%, para cada tratamento. Com os dados do Kaplan-Meier foram construídas curvas de sobrevivência no Excel.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Caracterização do óleo essencial de *Mentha cervina*

Com base nos resultados obtidos (figura 10 e 11) foi apurado que a fração volátil é essencialmente constituída por monoterpenos oxigenados (monoterpenoides) com peso molecular de 152 ($C_{10}H_{16}O$) como a pulegona (p-Menth-4(8)-en-3-one), sendo o componente maioritário destes óleos (76%). Outros componentes encontrados são monoterpenos ($C_{10}H_{16}$; peso molecular 136), sesquiterpenos ($C_{15}H_{24}$; peso molecular 204), e outros monoterpenoides de pesos moleculares 154, 166 (ex. "Carvone oxide") e 168 (ex. "Piperitone epoxide") ($C_{10}H_{18}O$; $C_{10}H_{14}O_2$; $C_{10}H_{16}O_2$).

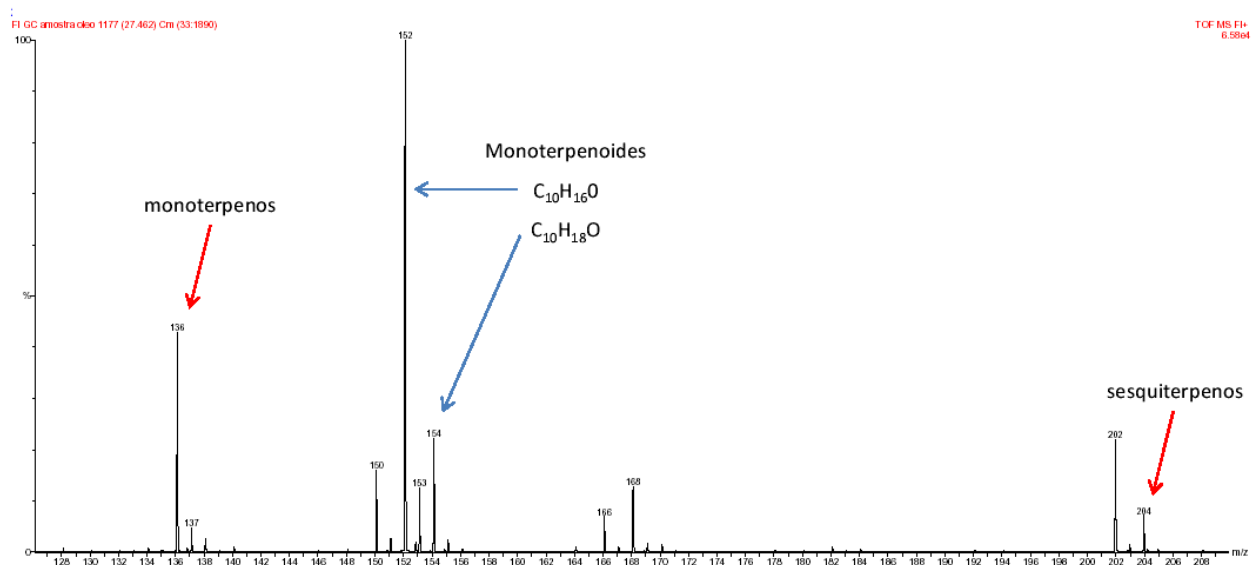


Figura 10 - Espectro de massas obtido para a amostra de OE na análise por GC/MS mediante ionização de campo (GC/FI-MS), com a identificação das classes de compostos predominantes.

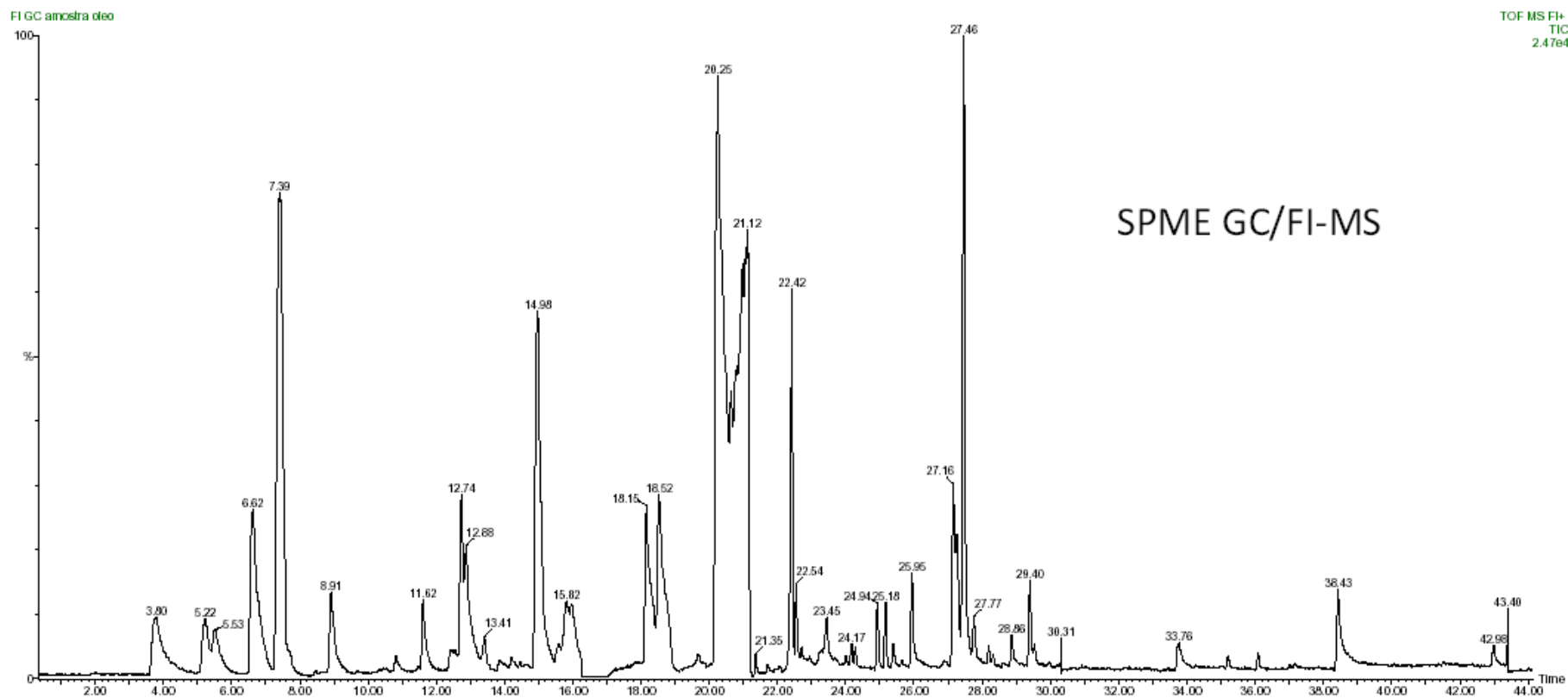


Figura 11 - Cromatograma para a análise em GC/MS mediante ionização de campo (GC/FI-MS)

O componente maioritário, a pulegona, teve um tempo de retenção de 22.30 minutos.

O segundo maior componente, com o tempo de retenção de 17.80 minutos foi identificado como sendo predominantemente “*iso*-menthone” (*iso*-mentona) (figura 12).

Outros compostos identificados foram: *a*-pineno (4.42), *b*-pineno (6.28), *a*-felandreno (6.72), *a*-terpinene (8.07), limonene (8.90), 1,8 cineol (9.22), “butyl tiglate” (15.47), mentona (16,97), acetato de benzilo/acetato de cresol (17.56) e piperitenone (29.57).

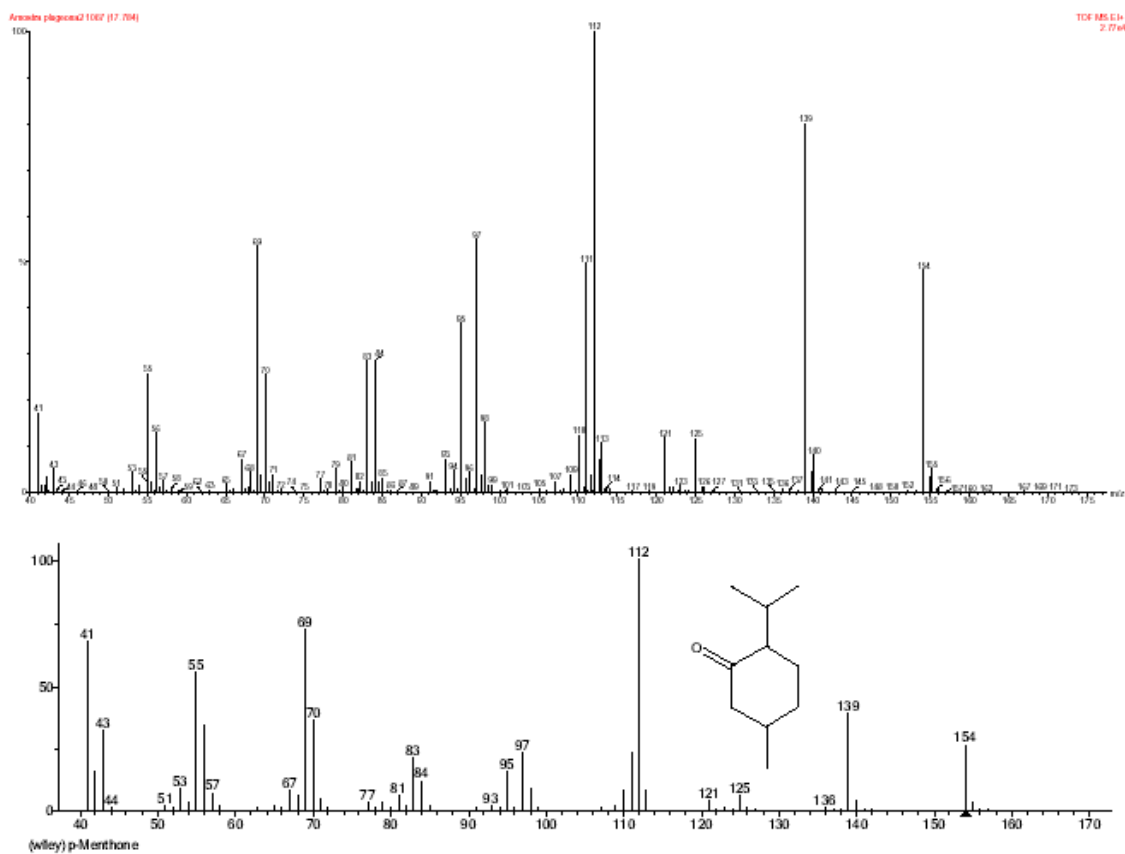


Figura 12 - Espectro de massa obtido para o segundo maior pico e respectivo espectro de referência para a mentona.

2. Testes ao nível laboratorial do óleo essencial de *Mentha cervina*

2.1 Teste da actividade do OE em varroas

Relativamente aos aspectos comportamentais, 15 minutos após a aplicação dos óleos essenciais observou-se alguma agitação das varroas, em ambos os ensaios. As varroas, que até ao momento apresentavam pouca actividade, passaram a movimentar-se no fundo das caixas, sendo este efeito mais visível no primeiro ensaio. Aos 30 minutos, aquelas que se encontravam nos corpos dos hospedeiros começaram a abandoná-los e a circular pela caixa como as restantes, apresentando alguma hiperactividade. Esta actividade fora do normal é um sinal da acção dos óleos no sistema nervoso destes animais, levando-os a comportamentos anormais de locomoção, o que não ocorreu nos grupos de controlo. Este comportamento terminou, aproximadamente, ao fim de 2 horas, iniciando-se um período de inactividade. As varroas nesta fase movimentavam-se muito pouco ou mesmo nada, reagindo apenas ao toque da pinça. O movimento que as varroas executavam ao toque era na sua maioria muito discreto, mexendo ligeiramente as patas sem qualquer deslocação, motivo pelo qual recorremos ao auxílio de uma lupa. Este período de inactividade prolongou-se até às penúltimas observações (2 horas no primeiro ensaio e 3 horas no ensaio seguinte).

Em ambos os ensaios verificou-se uma maior taxa de mortalidade logo nas primeiras duas horas (figura 14 e 16) após a aplicação do produto, coincidindo com o período de maior actividade das varroas, como se pode ver nas figuras 13 e 14. Este resultado leva a crer que a componente responsável pela toxicidade dos óleos é libertada neste período de tempo. De acordo com o cromatograma a pulegona é um dos compostos de peso molecular intermédio entre os terpenos constituintes do OE, correspondendo este período à sua volatilização, originando a hiperactividade das varroas e, em alguns casos, a subsequente morte. Por outro lado, as varroas parecem estar mais vulneráveis aos 30 minutos, pois no grupo de controlo também se registou alguma mortalidade nesta fase, ainda que pouco significativa e muito inferior aos grupos tratados. Esta vulnerabilidade pode ser resultado da adaptação ao ambiente adverso em que se encontravam, as caixas, ou de alguma susceptibilidade prévia, resultante do seu

desenvolvimento. Em todo o caso, a taxa de sobrevivência das varroas no grupo de controlo foi elevada até ao final do ensaio ao contrário dos grupos tratados (figura 13 e 14), despistando esses factores como causa da mortalidade nos outros grupos, essencialmente após esse período de adaptação. Após as 2 horas, período em que as varroas manifestam pouca ou nenhuma actividade, a taxa de sobrevivência foi diminuindo gradualmente nos grupos em tratamento, sendo nula às 18 horas para o primeiro ensaio e às 24 horas para o segundo ensaio (figura 13 e 14, respectivamente).

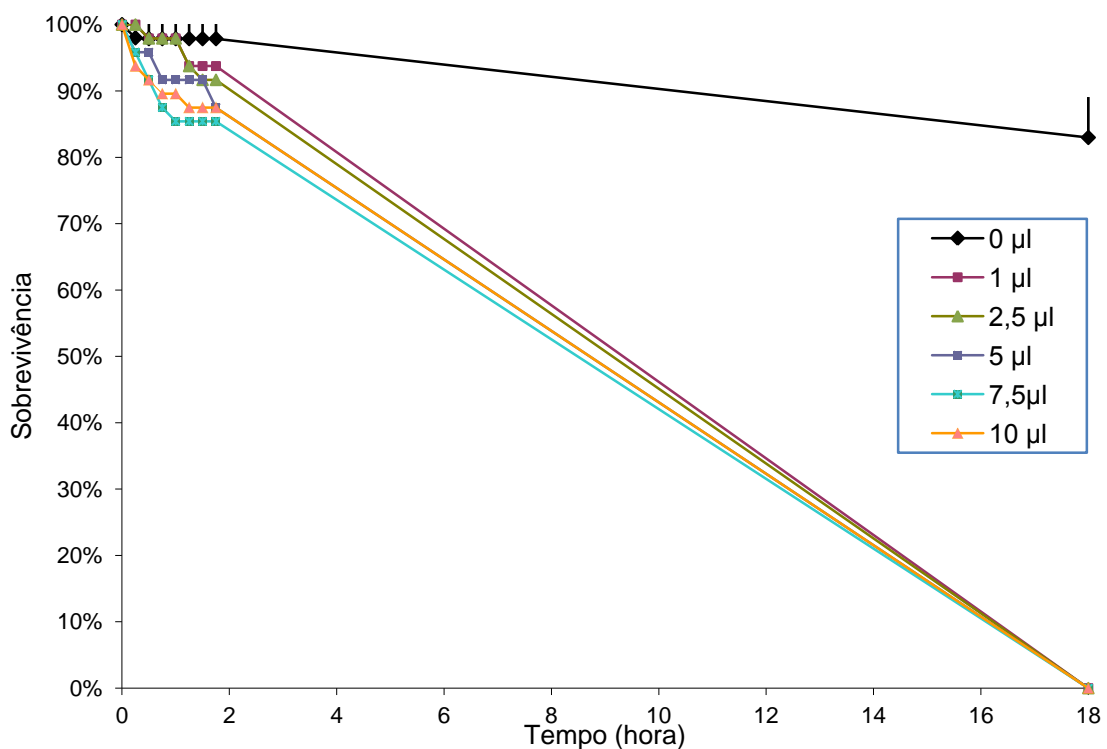


Figura 13 – Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm³ com diferentes doses de óleo essencial de *Mentha cervina* (1 a 10 µl) e controlo (0 µl) no período de 18 horas.

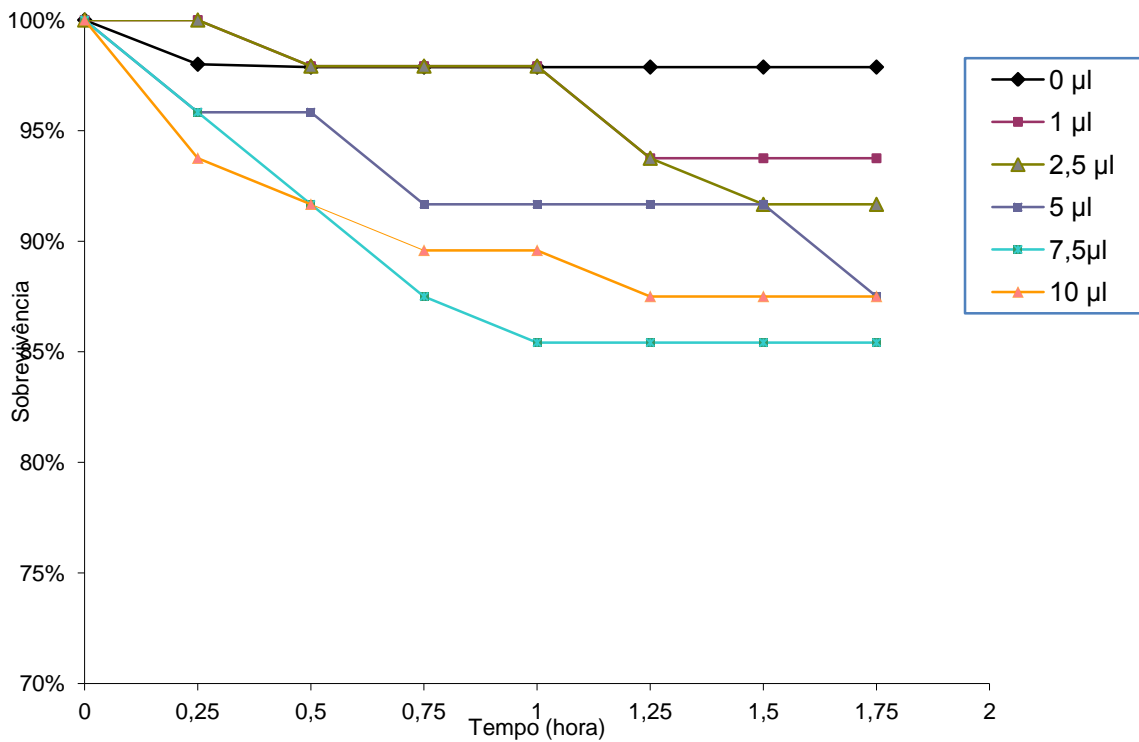


Figura 14 - Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm³ com diferentes doses de óleo essencial de *Mentha cervina* (1 a 10 µl) e controle (0 µl) nas primeiras duas horas de ensaio.

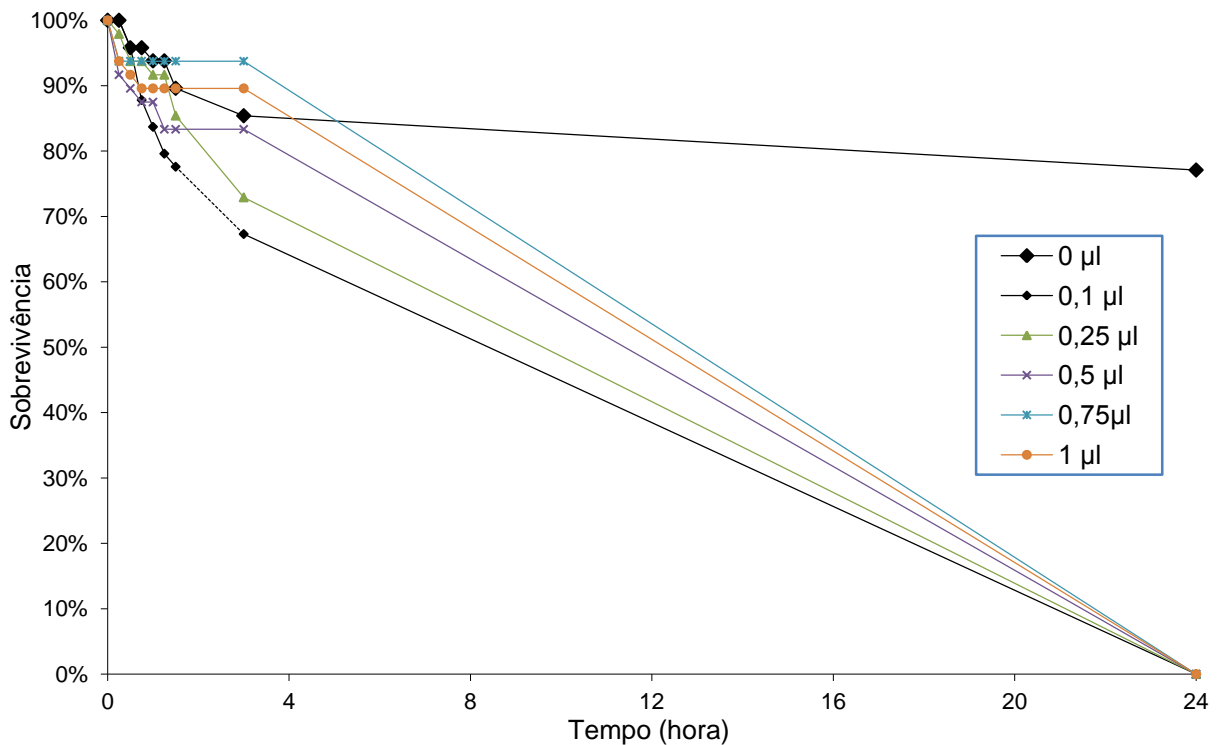


Figura 15 - Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm³ com diferentes doses de óleo essencial de *Mentha cervina* (0,1 a 1 µl) e controle (0 µl) no período de 24 horas.

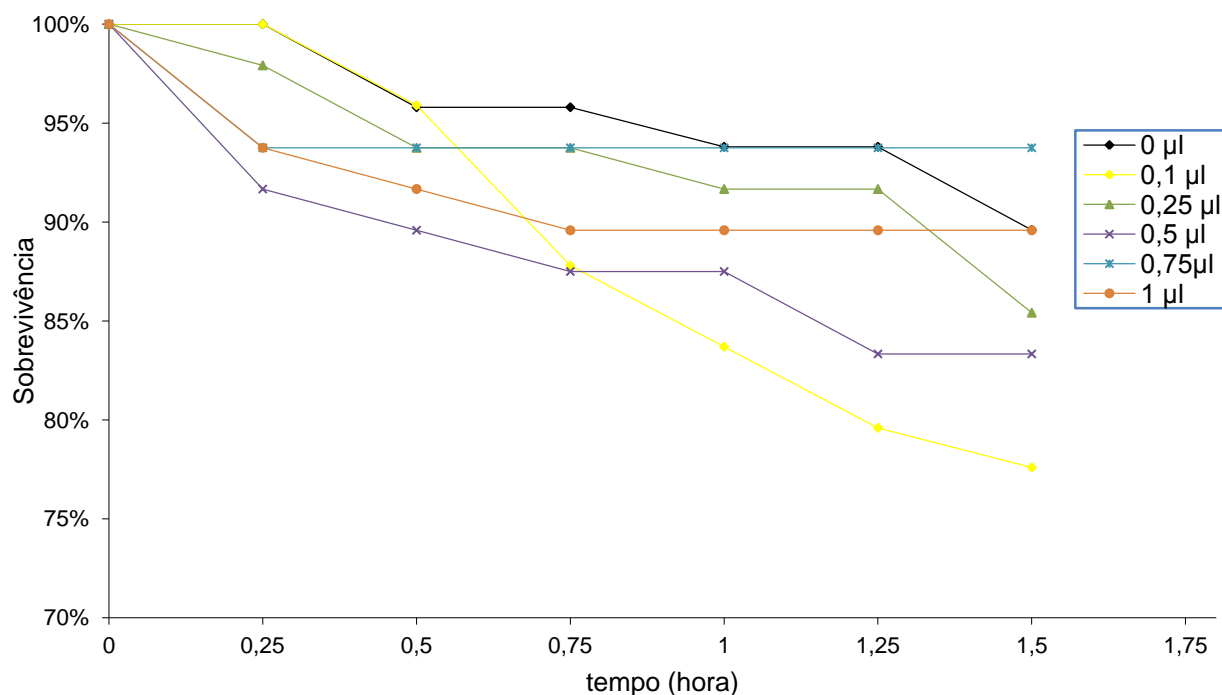


Figura 16 - Curvas de sobrevivência de varroas tratadas em caixas de 716,6 cm³ com diferentes doses de óleo essencial de *Mentha cervina* (0,1 a 1 µl) e controlo (0 µl) nas primeiras duas horas de ensaio.

No que diz respeito ao efeito dose, no segundo ensaio não foi notório ao contrário do que ocorreu no ensaio anterior. Uma das razões que poderá justificar este facto é a diferença entre as doses em cada ensaio, sendo muito pouco significativa no ensaio com as doses inferiores (figura 15). Podemos observar claramente esse efeito dose no primeiro ensaio, onde a média das taxas de sobrevivência das varroas decresce à medida que a dose aumenta, ainda que, inesperadamente, a dose mais alta apresente uma taxa de sobrevivência mais elevada que a dose anterior (figura 16).

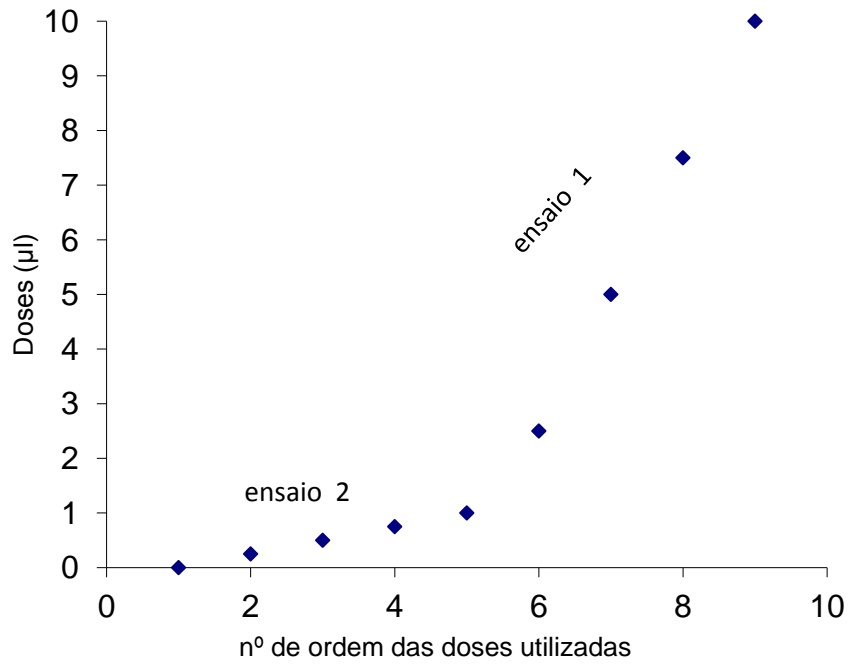


Figura 17 – Proporção das doses de óleo essencial de *Mentha cervina* utilizadas nos ensaios 1 e 2.

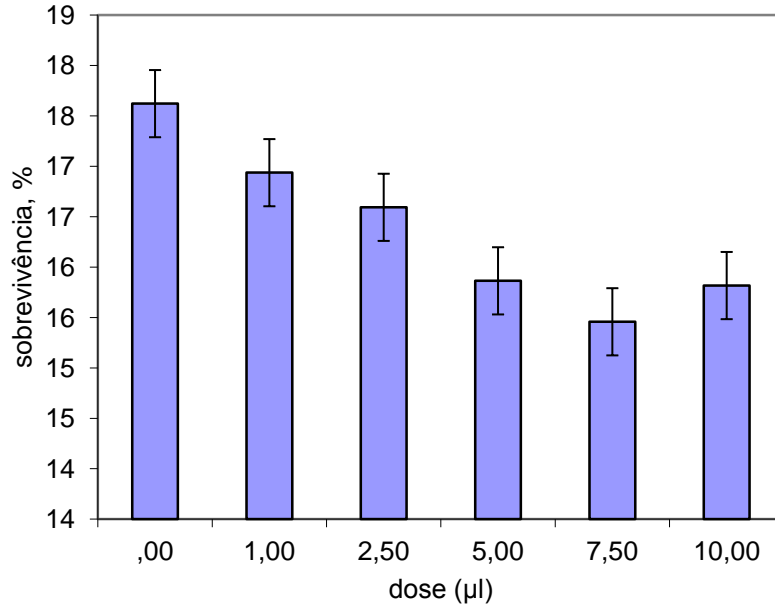


Figura 18 - Média global (+e.p.) das taxas de sobrevivência no primeiro ensaio de óleo essencial de *Mentha cervina*, doses de 1 a 10 µl e controlo (0 µl).

No entanto, neste primeiro ensaio as diferenças entre as doses não foram significativas ($p > 0.05$), ou seja, os resultados obtidos foram idênticos apesar da aplicação de diferentes doses. Assim sendo, e uma vez que a taxa de mortalidade das varroas atingiu os 100% no final de ambos os ensaios podemos afirmar que o óleo essencial manifestou um evidente efeito acaricida, mesmo a doses muito baixas.

2.2 Teste da actividade do OE em abelhas

O primeiro ensaio com as abelhas não correu como previsto, visto todas as abelhas terem morrido ao fim de 3 horas, inclusive o grupo de controlo. As condições em que se encontravam provaram não ser as ideais, apontando uma das razões para a mortalidade a falta de ventilação dentro das caixas. Contudo, é interessante observar que as abelhas do grupo de controlo morreram ligeiramente mais cedo que as abelhas sujeitas aos OE. Uma explicação para este facto é a existência de uma redução do metabolismo nas abelhas sujeitas ao OE, prolongando o tempo de sobrevivência, como podemos ver na figura 17. No entanto, os resultados deste ensaio serviram para adequar o protocolo de ensaios futuros, uma vez que não foi possível assegurar a sobrevivência das abelhas nas condições inicialmente previstas. Por outro lado, ficou a suspeita de que os OE podem ter algum efeito nas abelhas, pelo menos numa fase inicial.

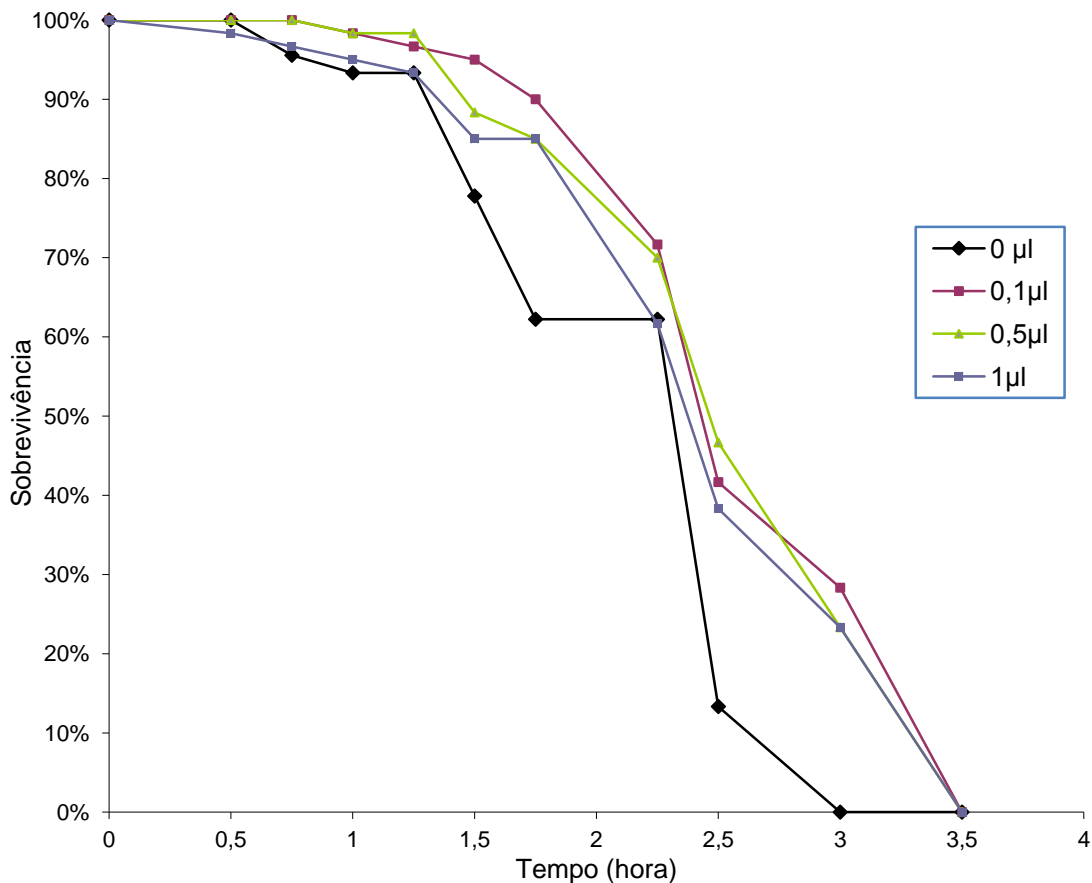


Figura 19 – Curvas de sobrevivência de abelhas obreiras tratadas, em caixas de 716,6 cm³, com diferentes doses de óleo essencial de *Mentha cervina* (0,1, 0,5 e 1 µl) e controle (0 µl) em três horas e meia de ensaio.

2.2.1 Teste de confirmação de resultados

No ensaio de confirmação de resultados, já em estufa e com as alterações das caixas, as abelhas reagiram positivamente à dose aplicada, apresentando uma taxa de sobrevivência elevada ao longo de todo o ensaio, como se pode ver na figura 18. Assim sendo, fica confirmado que a mortalidade no ensaio deveu-se à falta de ventilação das caixas. À semelhança do ensaio anterior, as abelhas do grupo do controlo manifestaram um tempo médio de sobrevivência inferior.

As abelhas reagiram inicialmente ao produto, tal como no ensaio anterior, permanecendo agitadas na parte superior da caixa, mas ao fim de 30-45 minutos começaram a estabilizar gradualmente, ocupando o fundo da caixa e alimentando-se do mel disponível.

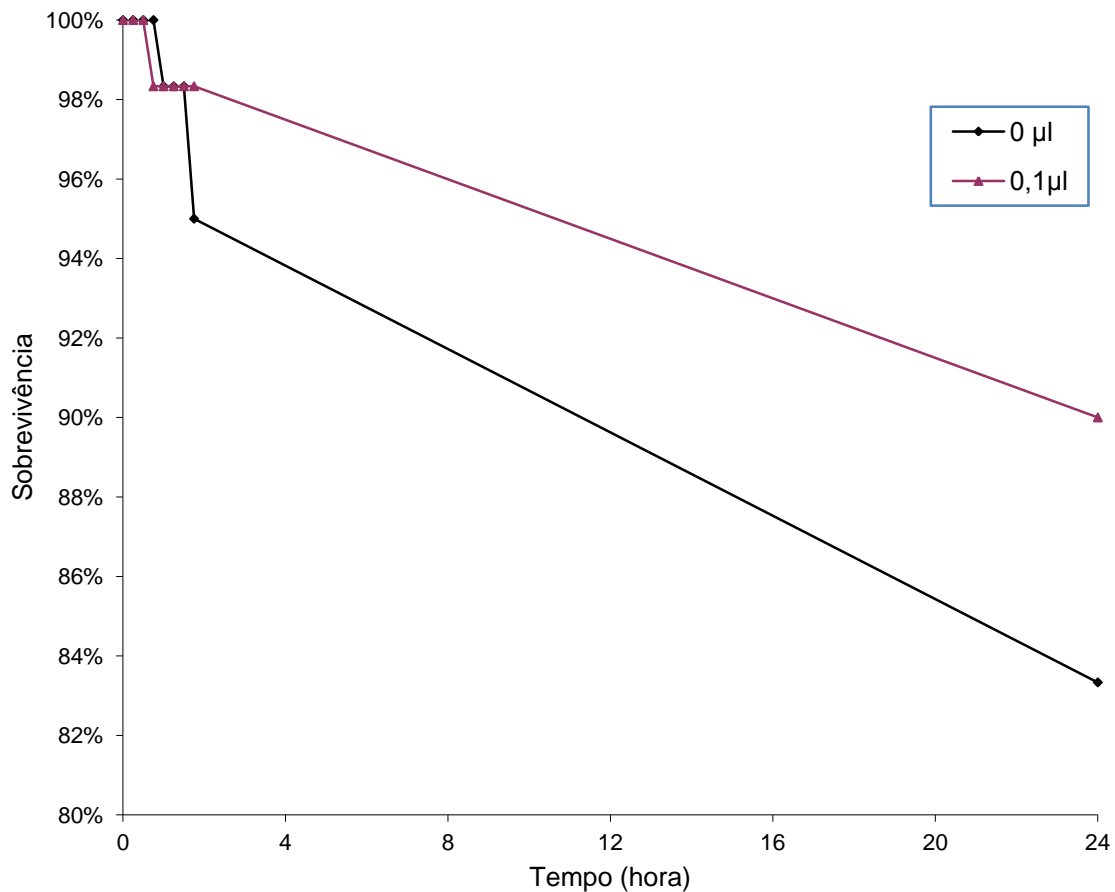


Figura 20 – Curvas de sobrevivência de abelhas obreiras tratadas, em câmara climática, com óleo essencial de *Mentha cervina* (0,1 µl) e controlo (0 µl) durante 24 horas de ensaio.

Como mencionado anteriormente, às 24 horas a sobrevivência foi elevada, quer no grupo de controlo (83%) quer no grupo tratado (92%), indicando-nos que os OE nas doses utilizadas não serão letais para as abelhas, ainda que estas detectem e reajam aos óleos. Quando comparamos os dois tratamentos, verificamos que não são significativamente diferentes ($p=0,276$), sugerindo que a toxicidade dos OE poderá ser residual.

3. Aplicação do OE em colónias infectadas

Como indicado nos materiais e métodos, antes do ensaio foi realizado um teste preliminar, que decorreu no dia 13 de Maio, no sentido de aferir a reacção das abelhas aos OE no seu ambiente natural (a colónia) já que em laboratório as condições são algo diferentes, sendo difícil simular devidamente as condições de colónia. Foi usada uma tira 5%, correspondendo a 0,0425g OE, que no final do ensaio se encontrava roída (figura 19), justificando o uso dos sacos de rede no ensaio seguinte.

Ao fim de 30 minutos após a aplicação dos óleos na colmeia iniciou-se uma grande agitação, tal



Figura 21 - Pormenor do filme roído pelas abelhas; fonte: autora

como nos ensaios laboratoriais. As abelhas permaneceram no fundo do ninho, arejando a colmeia com grande intensidade (figura 20). Este período aparenta corresponder à fase de libertação dos compostos em maior concentração nestes OE, em particular a pulegona, como foi provado nos ensaios laboratoriais, justificando a acção das abelhas. Nesta fase não se observou abelhas a saírem para a colecta mas apenas a regressar, como que protegendo a colónia. Observou-se ainda alguns conflitos entre abelhas na tábua de voo. Após 1 hora da aplicação registou-se abelhas mortas a serem retiradas da colmeia por outros elementos, tal como, abelhas com dificuldades de locomoção, podendo ter origem na acção indirecta dos óleos, isto é, fruto da agitação da colónia. No entanto, estas mortes apresentaram números pouco expressivos, sendo registadas 24 mortes neste primeiro dia de ensaio, número ligeiramente superior à mortalidade natural das colónias registado nas outras colónias durante todo o período dos ensaios, que foi cerca de 4 mortes por dia. Relativamente à queda da varroa no tabuleiro, esta foi acentuada ao fim desta primeira hora, uma vez que rondou as 33 varroas. Esta queda abrupta de varroa pode resultar igualmente da agitação da colmeia e não apenas da acção directa dos OE. No final do ensaio, 7 horas depois da aplicação dos OE, a colmeia já se

encontrava normalizada. Durante o ensaio a temperatura média foi de 23,5 °C, atingindo o máximo de 28,5 °C.

O ensaio final iniciou-se dia 19 de Maio e acabou dia 2 de Junho, podendo ser consultados os dados meteorológicos no anexo 19 referentes a esse período de tempo. Quanto aos aspectos comportamentais, estes foram idênticos ao ensaio preliminar, caracterizando-se essencialmente pelo intenso arejamento das colónias tratadas, embora a dose utilizada tenha sido inferior (1% - 0,2g). Em relação à mortalidade das abelhas nessas colónias, houve um ligeiro pico no dia da aplicação do produto como seria esperado, mas não foi significativo, como podemos ver na figura 20.

Em relação à varroa o efeito acaracida não foi visível, quer em filme quer em pó. Houve um pequeno pico da queda de varroa no dia da aplicação mas nos dias seguintes a varroa seguiu o seu ciclo normal de desenvolvimento (figura 21). Observou-se ainda um crescimento da varroa nas colónias tratadas muito superior às não tratadas, o que poderá ter estado associado ao facto destas colónias serem mais populosas, como sugere a mortalidade diária de abelhas (figura 20) e não por alguma correlação com o tratamento aplicado.

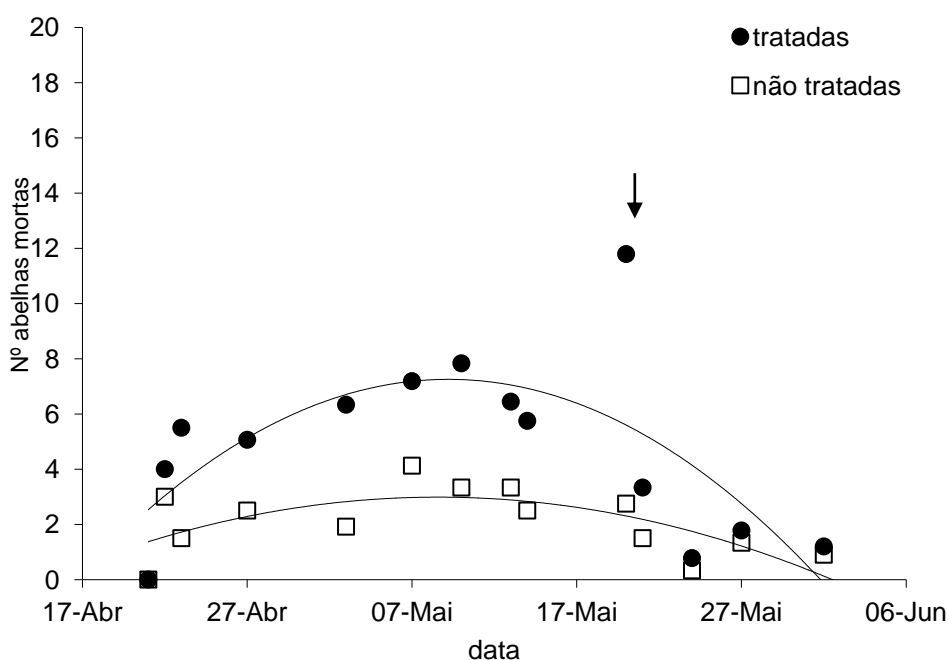


Figura 22 - Mortalidade das abelhas durante o período de ensaios com óleo essencial de *Mentha cervina*. Momento do tratamento do ensaio final assinalado com a seta.

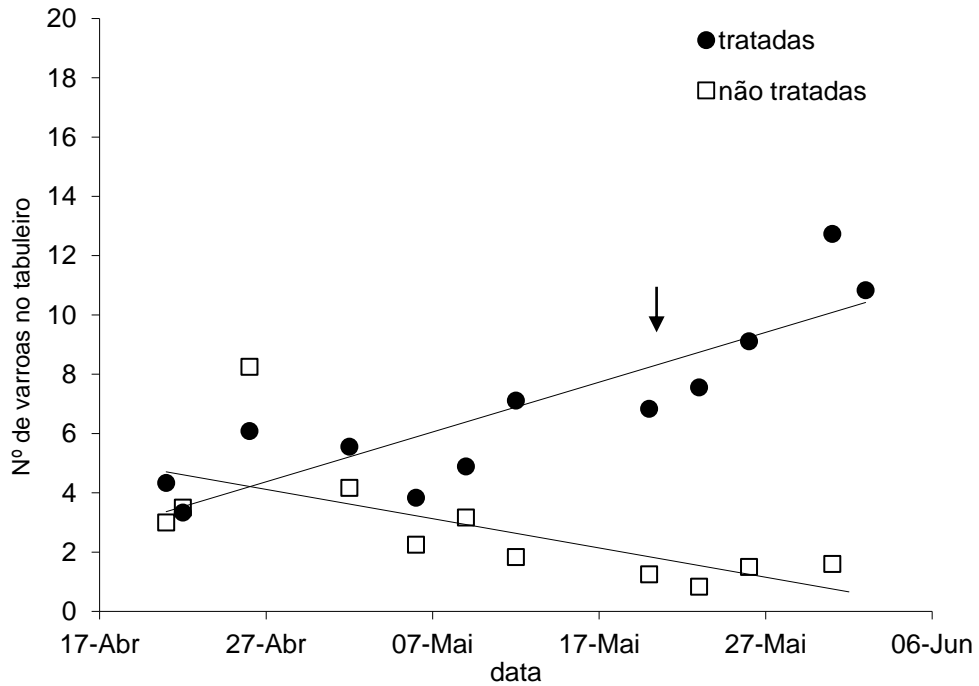


Figura 23 – Queda de varroa durante o período de ensaio com óleo essencial de *Mentha cervina*. Momento do tratamento do ensaio final assinalado com a seta.

Podemos observar de forma mais clara o insucesso do tratamento individualmente nas colónias tratadas: figura 22, 23 e 24. De facto, a população de varroa continuou a aumentar sem ser, aparentemente, afectada pela aplicação dos OE.

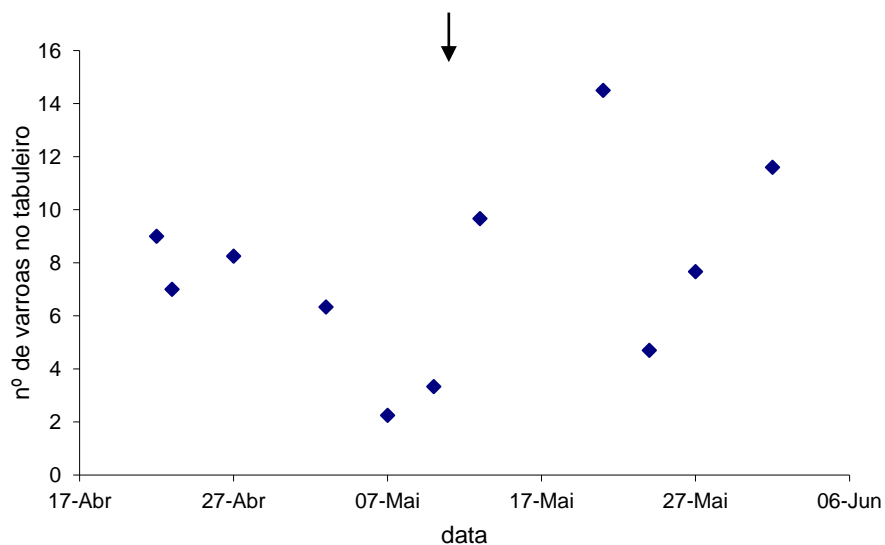


Figura 24 - Queda varroa: colmeia 1 tratada com óleo essencial de *Mentha cervina*. Momento do tratamento assinalado com a seta.

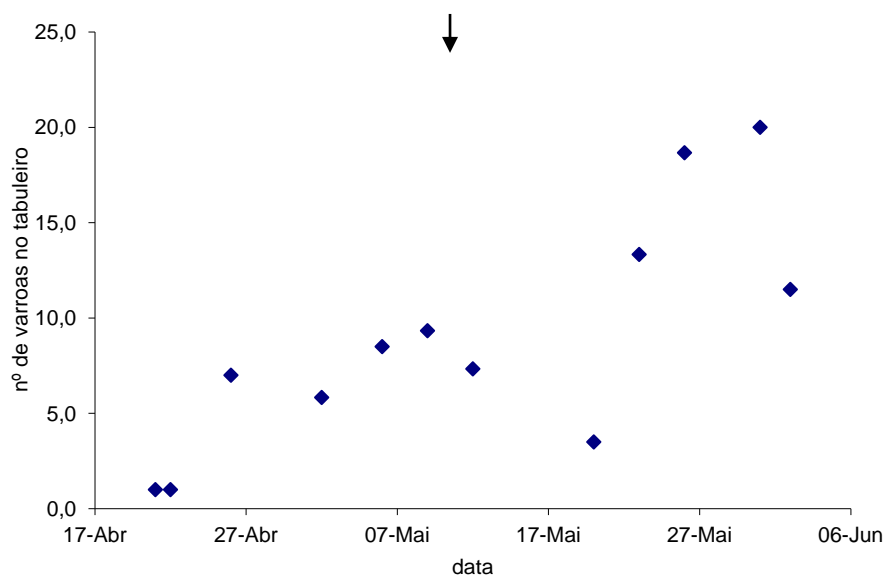


Figura 25 - Queda varroa: colmeia 2 tratada com óleo essencial de *Mentha cervina*. Momento do tratamento assinalado com a seta.

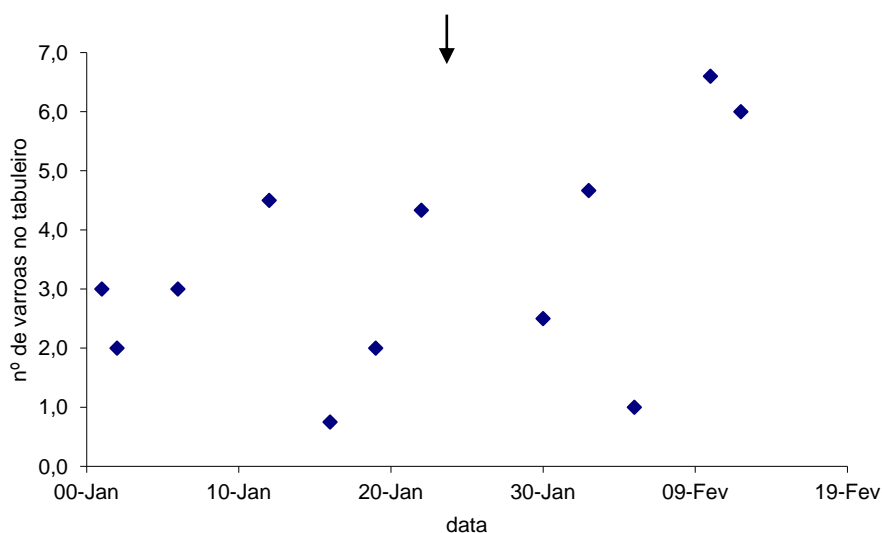


Figura 26 - Queda varroa: colmeia 3 tratada com óleo essencial de *Mentha cervina*. Momento do tratamento assinalado com a seta.

Uma vez que o efeito acaricida foi nulo pode haver duas explicações possíveis. Por um lado a dose utilizada pode não ter sido a mais adequada (1% - 0,2g), sendo interessante usar doses superiores em ensaios futuros. Por outro lado, a matriz terá de ser repensada, pois aparentou ser demasiado volátil. As abelhas, ao arejarem a colónia no momento inicial, poderão ter expulso os componentes de maior toxicidade para a varroa, contribuindo assim para o fracasso do tratamento. Será inclusivamente razoável admitir que a varroa poderá nem ter tido contacto

significativo com o OE e aquele pico inicial de queda ter sido consequência da imensa agitação da colónia.

IV. Dificuldades encontradas no trabalho

Infelizmente as dificuldades encontradas neste trabalho foram algumas. Encontrar um apicultor disponível para dispensar um número significativo de colónias provou não ser tarefa fácil. A investigação nem sempre é compatível com a produção, ainda para mais na época em que decorreu o ensaio. Por outro lado, acordar um valor monetário que compensasse o apicultor acabava por ser demasiado dispendioso. Uma vez encontrado o apiário, foram atribuídas 6 colónias muito gentilmente, sendo o mínimo para se realizar os ensaios de campo. O número reduzido de colónias complicou a realização dos ensaios, pois teríamos de utilizá-las todas, não havendo margem para eliminar nenhuma se necessário e correndo o risco de as colónias não serem homogéneas, o que veio a suceder.

Por outro lado, manter as colónias infestadas até à data do ensaio sem qualquer tratamento químico, também não foi simples.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de estratégias biológicas no tratamento de doenças como a varroose vai de encontro às preocupações actuais, que são essencialmente ambientais, de saúde animal e de segurança alimentar. O uso de produtos sintéticos terá então de ser evitado pelas razões que foram mencionadas anteriormente neste trabalho.

Apesar dos ensaios em colónias não terem sido inteiramente bem sucedidos, os óleos essenciais de *Mentha cervina* demonstraram em laboratório ter um excelente efeito acaricida e baixa toxicidade para as abelhas. Por outro lado, o efeito acaricida foi observado a doses muito reduzidas o que indica que poderá ser um produto bastante rentável em termos de mercado, restando ainda desenvolver uma matriz mais adequada para a sua dispersão na colónia. Outra questão relevante é a importância de realizar estudos futuros apenas com a pulegona, uma vez que esta é a componente principal do óleo essencial e por isso talvez a principal responsável pela toxicidade verificada.

Posto isto, os resultados deste trabalho são claramente um contributo importante para esta linha de investigação e um alerta para as dificuldades que a apicultura atravessa em termos de convivência com as principais patologias apícolas.

Para o desenvolvimento de estudos desta natureza será essencial haver apiários experimentais dedicados à investigação desta problemática, dadas as dificuldades associadas ao controlo de tratamentos experimentais em colónias cuja propriedade não se detém.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, D.; Trueman J. (2000). *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental & Applied Acarology*, 24: 165–189
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - a review. *Food and chemical toxicology*, 46: 446-475
- Becher, M.; Hildenbrandt, H.; Hemelrijk, C.; Moritz, R. (2010). Brood temperature, task division and colony survival in honeybees: A model. *Ecological Modelling*, 221: 769-776
- Belchior, S. (2009). *Mentha cervina* L.: Insectos e fungos associados. Propriedades insecticidas do óleo essencial. Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia
- Boecking, O.; Spivak, M. (1999). Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*, 30: 141-158
- Boot, W.; Calis, J.; Shoenmaker, J.; Beetsma, J. (1995). Invasion of *Varroa jacobsoni* into drone brood cells of honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 26: 109-118
- Bradbear, N. (2009). Bees and their role in forest livelihoods. A guide to the services provided by bees and the sustainable harvesting, processing and marketing of their products. Food and Agriculture Organization of the United Nations: 13-16
- Branco, M. (1997). Population dynamics of iberian honeybee (*Apis mellifera* L. iberica Goetze) in relation to the parasite, *Varroa jacobsoni* Oud. University of Wales, Cardiff (United Kingdom)
- Calderone, N.; Spivak, M. (1995). Plant extracts for control of parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Tarsondemidae) in colonies of the western honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal Economic Entomology*, 88: 1211-1215
- Degen, J.; Gewecke, M.; Roeder, T. (2000). Octopamine receptors in the honey bee and locust nervous system: pharmacological similarities between homologous receptors of distantly related species. *British Journal of Pharmacology*, 130: 587-594
- Donzé, G.; Guerin, P. (1994). Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honey bee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 34: 305-319
- Enan, E. (2005). Molecular and pharmacological analysis of an octopamine receptor from American cockroach and fruit fly in response to plant essential oils. *Archives of Insect biochemistry and Physiology*, 59: 161-71
- Fluri, P. (1983). Mensuration de la glande nourricière poids sec sur des abeilles d'été et d'hiver? *Journal Suisse d'Apiculture*, 80: 355-360
- Franco, J. (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. Volume II. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa: 660 pp
- Fuchs, M.; Turchiuli, C.; Bohin, M.; Cuvelier, M.; Ordonnaud, C.; Peyratmaillard, M.; Dumoulin, E. (2006). Encapsulation of oil in powder using spray drying and fluidised bed agglomeration, *Journal of Food Engineering*, 75: 27-35

- Ghamdi, A.; Hoopingarner, R. (2004). Modeling of honey bee and Varroa mite population dynamics. *Saudi Journal Biological Sciences*, 11: 1
- Imdorf, A.; Bogdanov, S.; Ochoa, R.; Calderone, N. (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30: 209-228
- Isman, M. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19: 603-608
- Isman, M. (2002). Problèmes et perspectives de commercialization des insecticides d'origine botanique. *Biopesticides d'Origine Végétale*: 301-310
- Kanakdande, D.; Bhosale, R.; Singhal, R. (2007). Stability of cumin oleores in microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modiWed starch. *Analysis*, 67: 536-541
- Krotcha, J.; Baldwin, E.; Nisperos-Carriedo, M. (1994). Edible coatings and films to improve food quality: 379 pp
- Le Conte, Y.; Ellis, M.; Ritter, W. (2010). Varroa mites and honey bee health: can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41: 353-363
- Lindberg, C. (2000). Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a honey bee (Hymenoptera : Apidae) parasite. *Journal Economic Entomology*, 93: 189-198
- Loksuwan, J. (2006). Characteristics of microencapsulated b-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*. 21: 928–935
- Maga, J. (1983). Honey flavor. *Lebmit. Wiss. Technol.*, 16: 65-68
- Maurizio, A. (1968). Évolution et longévité des adultes. *Traité de Biologie de l'Abeille*: 129-144
- Milani, N. (1995). The resistance of *Varroa jacobsoni* to pyrethroids: A laboratory assay. *Apidologie*, 26: 415-429
- Milani, N. (1999). The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to acaricides. *Apidologie*, 30: 229-234
- Murilhas, A.; Casaca, J. (2004). Conviver com a varroa em Portugal - Um contributo para a adopção de boas práticas apícolas de convivência com a varroa. 32 pp
- Murilhas, A.; Casaca, J. (2005). Utilização do timol na luta contra a varroa em Portugal. 2 pp
- Regnault-Roger, C.; Hamraoui, A. (1993). Efficiency of plants from south France used as traditional protectants of *Phaseolus vulgaris* L. against its bruchid *Acanthoscelides obtectus*. *Journal of Stored Products Research*, 29: 259-264
- Rodrigues, L.; Monteiro, P.; Póvoa, O.; Teixeira, G.; Moldão, M.; Figueiredo, A.; Monteiro, A. (2008). Morphology of secretory structures and essential oil composition in *Mentha cervina* L. from Portugal. *Flavour and Fragrance Journal*, 23: 340–347

- Rodrigues, L.; Póvoa, O.; Monteiro, P.; Monteiro, A.; Martins, M.; Figueredo, A. (2007). Quantificação e caracterização do óleo essencial de *Mentha cervina* L. *Livro de Actas do II Colóquio Nacional de Plantas Aromáticas e Medicinais*: 187-194
- Roeder, T.; Seifert, M.; Kaler, C.; Gewecke, M. (2003). Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 54: 1-13
- Rueppell, O.; Kaftanoglu, O.; Page, R. (2009). Honey bee (*Apis mellifera*) workers live longer in small than in large colonies. *Experimental Gerontology*, 44: 447-452
- Ruffinengo, S.; Maggi, M.; Faverin, C.; Rosa, S.; Bailac, P.; Principal, J.; Eguaras, M. (2007). Essential oils toxicity related to *Varroa destructor* and *Apis mellifera* under laboratory conditions. *Zootecnia Tropical*, 25: 63-69
- Schmickl, T.; Crailsheim, K. (2004). Review article Inner nest homeostasis in a changing environment with special emphasis on honey bee brood nursing and pollen supply. *Apidologie*, 35: 249-263
- Silva, C. (2010). Luta contra *Varroa destructor* Anderson & Trueman: avaliação de estratégias biotécnicas e bioquímicas com o óleo de *Mentha cervina*. Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia: 90 pp
- Silva, V.; Póvoa, O.; Espírito-Santo, M.; Vasconcelos, T.; Monteiro, A. (2009). *Mentha cervina* communities in Portugal. *Lazaroa*, 30: 73-79
- Spürgin, A. (1997). As abelhas e a polinização. *Apicultura*: 24-28
- Van den Broucke, C. (1983). The therapeutic value of *thymus* species. *Fitoterapia*, 54: 171-174
- Woyciechowski, M.; Kozłowski, J. (1998). Division of labor by division of risk according to worker life expectancy in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 29: 191-205

VII. ANEXOS

Anexo 1- Contagens da mortalidade das varroas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores)

qt óleo	caixa	total varroas vivas	contagem varroas mortas															
			15 min	tx mort	30 min	tx mort	45 min	tx mort	60 min	tx mort	75 min	tx mort	90 min	tx mort	180 min	tx mort	24 horas	tx mort
0 µl	1	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%
	2	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	16,7%	4	33,3%
	3	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%
	4	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	3	25,0%
0,1µl	1	12	0	0,0%	2	16,7%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	12	100,0%
	2	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	4	33,3%	12	100,0%
	3	12	1	8,3%	2	16,7%	3	25,0%	4	33,3%	4	33,3%	4	33,3%	5	41,7%	12	100,0%
	4	12	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	4	33,3%	12	100,0%
0,25 µl	1	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	25,0%	5	41,7%	12	100,0%
	2	12	0	0,0%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	4	33,3%	12	100,0%
	3	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	8,3%	12	100,0%
	4	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	3	25,0%	12	100,0%
0,5 µl	1	12	2	16,7%	2	16,7%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	12	100,0%
	2	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	3	12	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	12	100,0%
	4	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
0,75 µl	1	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	12	100,0%
	2	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	3	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	4	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%

1 µl	1	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	2	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	3	12	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
	4	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%

Anexo 2 - Taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores)

tempo-horas	S_0	e.p.	S_0.1	e.p.	S_0.25	e.p.	S_0.50	e.p.	S_0.75	e.p.	S_1	e.p.
0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
0,25	1	0	1	0	0,979167	0,020615	0,916667	0,039893	0,9375	0,034939	0,9375	0,034939
0,5	0,958	0,029	0,959	0,028	0,9375	0,034939	0,895833	0,044092	0,9375	0,034939	0,916667	0,039893
0,75	0,958	0,029	0,878	0,047	0,9375	0,034939	0,875	0,047735	0,9375	0,034939	0,895833	0,044092
1	0,938	0,035	0,837	0,053	0,916667	0,039893	0,875	0,047735	0,9375	0,034939	0,895833	0,044092
1,25	0,938	0,035	0,796	0,058	0,916667	0,039893	0,833333	0,053791	0,9375	0,034939	0,895833	0,044092
1,5	0,896	0,044	0,776	0,06	0,854167	0,050942	0,833333	0,053791	0,9375	0,034939	0,895833	0,044092
3	0,854	0,051	0,673	0,067	0,729167	0,064142	0,833333	0,053791	0,9375	0,034939	0,895833	0,044092
24	0,771	0,061	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 3 - Teste de log-rank e a comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores)

Pairwise Comparisons

dose	,00		,10		,25		,50		,75		1,00	
	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,00		46,136	,000	42,859	,000	41,209	,000	38,769	,000	39,735	,000
	,10	46,136	,000		,725	,395	2,805	,094	9,936	,002	6,297	,012
	,25	42,859	,000	,725	,395		1,037	,309	6,840	,009	3,693	,055

,50	41,209	,000	2,805	,094	1,037	,309			2,473	,116	,754	,385
,75	38,769	,000	9,936	,002	6,840	,009	2,473	,116			,526	,468
1,00	39,735	,000	6,297	,012	3,693	,055	,754	,385	,526	,468		

Anexo 4 - médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses inferiores)

Means and Medians for Survival Time

dose	Meana				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
,00	20,729	1,200	18,378	23,081
,10	16,464	1,563	13,402	19,527	24,000	,000	.	.
,25	18,016	1,435	15,204	20,828	24,000	,000	.	.
,50	20,099	1,273	17,605	22,593	24,000	,000	.	.
,75	22,516	,839	20,872	24,159	24,000	,000	.	.
1,00	21,542	1,052	19,480	23,603	24,000	,000	.	.
Overall	19,882	,519	18,866	20,899	24,000	,596	22,831	25,169

Anexo 5 - Contagens da mortalidade das varroas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores)

qt óleo	caixa	total varroas vivas	contagem varroas mortas																			
			15 min	tx mort	30 min	tx mort	45 min	tx mort	60 min	tx mort	75 min	tx mort	90 min	tx mort	105 min	tx mort	120 min	tx mort	18 horas	tx mort		
0 µl	1	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	25,0%
	2	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	16,7%
	3	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%
	4	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	16,7%
1 µl	1	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	12	100,0%
	2	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	3	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	4	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
2,5 µl	1	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
	2	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
	3	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	12	100,0%
	4	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	12	100,0%
5 µl	1	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	12	100,0%
	2	12	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	12	100,0%
	3	12	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	12	100,0%
	4	12	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	3	25,0%	3	25,0%	3	25,0%	12	100,0%
7,5 µl	1	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
	2	12	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
	3	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	4	12	0	0,0%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
10 µl	1	12	0	0,0%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%
	2	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
	3	12	1	8,3%	1	8,3%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	2	16,7%	12	100,0%
	4	12	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	1	8,3%	12	100,0%

Anexo 6 - Taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores)

tempo-horas	S_0	e.p.	S_1	e.p.	S_2.5	e.p.	S_5	e.p.	S_7,5	e.p.	S_10	e.p.	
	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
0,25	0,978723	0,021049	1	0	1	0	0,958333	0,028842	0,958333	0,028842	0,9375	0,034939	
0,5	0,978723	0,021049	0,979167	0,020615	0,979167	0,020615	0,958333	0,028842	0,916667	0,039893	0,916667	0,039893	
0,75	0,978723	0,021049	0,979167	0,020615	0,979167	0,020615	0,916667	0,039893	0,875	0,047735	0,895833	0,044092	
1	0,978723	0,021049	0,979167	0,020615	0,979167	0,020615	0,916667	0,039893	0,854167	0,050942	0,895833	0,044092	
1,25	0,978723	0,021049	0,9375	0,034939	0,9375	0,034939	0,916667	0,039893	0,854167	0,050942	0,875	0,047735	
1,5	0,978723	0,021049	0,9375	0,034939	0,916667	0,039893	0,916667	0,039893	0,854167	0,050942	0,875	0,047735	
1,75	0,978723	0,021049	0,9375	0,034939	0,916667	0,039893	0,875	0,047735	0,854167	0,050942	0,875	0,047735	
18	0,829787	0,054819	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Anexo 7 - Teste de log-rank e comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores)

Pairwise Comparisons

dose	,00		1,00		2,50		5,00		7,50		10,00	
	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,00		61,933	,000	61,816	,000	61,930	,000	61,969	,000	62,008	,000
	1,00	61,933	,000		,146	,702	1,100	,294	1,896	,169	1,181	,277
	2,50	61,816	,000	,146	,702		,454	,501	1,046	,306	,522	,470
	5,00	61,930	,000	1,100	,294	,454	,501		,110	,740	,002	,968
	7,50	61,969	,000	1,896	,169	1,046	,306	,110	,740		,079	,778
	10,00	62,008	,000	1,181	,277	,522	,470	,002	,968	,079	,778	

Anexo 8 - Médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em varroas com as doses superiores)

Means and Medians for Survival Time

dose	Meana				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
,00	17,622	,399	16,839	18,405
1,00	16,938	,600	15,761	18,114	18,000	,000	.	.
2,50	16,594	,680	15,260	17,928	18,000	,000	.	.
5,00	15,865	,825	14,248	17,481	18,000	,000	.	.
7,50	15,458	,897	13,700	17,217	18,000	,000	.	.
10,00	15,818	,842	14,167	17,469	18,000	,000	.	.
Overall	16,378	,298	15,794	16,962	18,000	,427	17,163	18,837

Anexo 9 - Contagens da mortalidade das abelhas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em abelhas)

qt óleo	caixa	total abelhas vivas	contagem abelhas mortas																							
			15 min	tx mort	30 min	tx mort	45 min	tx mort	60 min	tx mort	75 min	tx mort	90 min	tx mort	105 min	tx mort	135 min	tx mort	2h30	tx mort	3h	tx mort	3h30	tx mort		
0 µl	1	15	0	0%	0	0%	1	7%	1	7%	1	7%	3	20%	5	33%	7	47%	15	100%	15	100%	15	100%		
	2	15	0	0%	0	0%	1	7%	2	13%	2	13%	2	13%	5	33%	8	53%	12	80%	15	100%	15	100%		
	3	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	5	33%	7	47%	9	60%	12	80%	15	100%	15	100%		
0,1 µl	1	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	3	20%	7	47%	9	60%	15	100%		
	2	15	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	2	13%	3	20%	4	27%	8	53%	14	93%	14	93%	15	100%		
	3	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	3	20%	9	60%	9	60%	15	100%		
	4	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	3	20%	5	33%	11	73%	15	100%		

0,5 µl	1	15	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	1	7%	7	47%	7	47%	10	67%	11	73%	14	93%	15	100%
	2	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	13%	6	40%	13	87%	15	100%	15	100%
	3	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	3	20%	10	67%	15	100%
	4	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	13%	5	33%	7	47%	15	100%
1 µl	1	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	5	33%	11	73%	15	100%	15	100%
	2	15	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	1	7%	4	27%	6	40%	8	53%	11	73%	13	87%	15	100%
	3	15	0	0%	1	7%	2	13%	2	13%	3	20%	5	33%	7	47%	9	60%	12	80%	14	93%	15	100%
	4	15	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	7%	1	7%	3	20%	4	27%	15	100%

Anexo 10 - Taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas)

tempo-horas	S_0	e.p.	S_0.1	e.p.	S_0.5	e.p.	S_1	e.p.
0	1	0	1	0	1	0	1	0
0,5	1	0	1	0	1	0	0,983333	0,016527
0,75	0,955556	0,030721	1	0	1	0	0,966667	0,023174
1	0,933333	0,037185	0,983333	0,016527	0,983333	0,016527	0,95	0,028137
1,25	0,933333	0,037185	0,966667	0,023174			0,933333	0,032203
1,5	0,777778	0,061975	0,95	0,028137	0,883333	0,041444	0,85	0,046098
1,75	0,622222	0,072274	0,9	0,03873	0,85	0,046098	0,85	0,046098
2,25	0,622222	0,072274	0,716667	0,058174	0,7	0,059161	0,616667	0,062768
2,5	0,133333	0,050674	0,416667	0,063647	0,466667	0,064406	0,383333	0,062768
3	0	0	0,283333	0,058174	0,233333	0,054603	0,233333	0,054603
3,5			0	0	0	0	0	0

Anexo 11 - Teste de log-rank e a comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em abelhas)

Pairwise Comparisons

dose								
	,00		,10		,50		1,00	
	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,00		19,558	,000	17,790	,000	10,492	,001
	,10	19,558	,000		,125	,724	1,057	,304
	,50	17,790	,000	,125	,724		,439	,508
	1,00	10,492	,001	1,057	,304	,439	,508	

Anexo 12 - Médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas)

Means and Medians for Survival Time

dose	Meana				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
,00	2,144	,089	1,971	2,318	2,250	,114	2,026	2,474
,10	2,704	,082	2,544	2,864	2,500	,053	2,396	2,604
,50	2,663	,085	2,495	2,830	2,500	,104	2,297	2,703
1,00	2,517	,100	2,320	2,713	2,500	,067	2,368	2,632
Overall	2,531	,047	2,439	2,623	2,500	,030	2,442	2,558

Anexo 13 - Contagens da mortalidade das abelhas e respectivas taxas de mortalidade (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados)

tempo		15 min	tx mort	30 min	tx mort	45 min	tx mort	60 min	tx mort	75 min	tx mort	90 min	tx mort	105 min	tx mort	24h	tx mort	
caixa abelhas																		
controlo	1	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	6,67
	2	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	6,7%	1	6,7%	1	6,7%	2	13,3%	5	33,33
	3	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	13,33
	4	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	6,7%	2	13,33
óleo (0,1 µl)	1	15	0	0,0%	0	0,0%	1	6,7%	1	6,7%	1	6,7%	1	6,7%	1	6,7%	1	6,67
	2	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	6,67
	3	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	6,67
	4	15	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	20,00

Anexo 14 - taxas de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados)

tempo- horas	S_0	e.p.	S_0.1	e.p.
0	1		0	1
0,25	1		0	1
0,5	1		0	1
0,75	1		0	0,983333
1	0,9833	0,016527	0,983333	0,016527
1,25	0,9833	0,016527	0,983333	0,016527
1,5	0,9833	0,016527	0,983333	0,016527
1,75	0,95	0,028137	0,983333	0,016527
24	0,8333	0,048113	0,9	0,03873

Anexo 15 - Teste de log-rank e a comparação entre tratamentos (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados)

Pairwise Comparisons

dose	,00		,10	
	Chi-Square	Sig.	Chi-Square	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	,00 ,10	1,188 ,276	1,188	,276

Anexo 16 - Médias e medianas do tempo de sobrevivência (teste da actividade do OE em abelhas – confirmação de resultados)

Means and Medians for Survival Time

dose	Meana				Median			
	Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval		Estimate	Std. Error	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound			Lower Bound	Upper Bound
,00	22,875	,667	21,567	24,183
,10	23,613	,421	22,787	24,438
Overall	23,244	,384	22,491	23,996

Anexo 17 – Monitorização da queda diária de varroa nas colónias infestadas (aplicação do OE em colónias)

colónia	21-Abr	22-Abr	23-Abr	24-Abr	25-Abr	26-Abr	27-Abr	28-Abr	29-Abr	30-Abr
1	9,0	7,0	8,3	8,3	8,3	8,3	6,3	6,3	6,3	6,3
2	1,0	1,0	7,0	7,0	7,0	7,0	5,8	5,8	5,8	5,8
3	3,0	2,0	3,0	3,0	3,0	3,0	4,5	4,5	4,5	4,5
4	3,0	4,0	14,0	14,0	14,0	14,0	6,3	6,3	6,3	6,3
5	10,0	3,0	6,0	6,0	6,0	6,0	13,8	13,8	13,8	13,8
6	3,0	3,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,0	2,0	2,0	2,0

colónia	01-Mai	02-Mai	03-Mai	04-Mai	05-Mai	06-Mai	07-Mai	08-Mai	09-Mai	10-Mai	11-Mai	12-Mai	13-Mai	14-Mai	15-Mai	16-Mai	17-Mai	18-Mai	19-Mai	20-Mai	21-Mai	22-Mai	23-Mai	24-Mai	25-Mai	26-Mai	27-Mai	28-Mai	29-Mai	30-Mai	31-Mai	
1	6,3	6,3	2,3	2,3	2,3	2,3	3,3	3,3	3,3	9,7	9,7	9,7							14,5	14,5	4,7	4,7	4,7	7,7	7,7	7,7	11,6	11,6	11,6	11,6	11,6	
2	5,8	5,8	8,5	8,5	8,5	8,5	9,3	9,3	9,3	7,3	7,3	7,3							3,5	3,5	13,3	13,3	13,3	18,7	18,7	18,7	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	
3	4,5	4,5	0,8	0,8	0,8	0,8	2,0	2,0	2,0	4,3	4,3	4,3							2,5	2,5	4,7	4,7	4,7	1,0	1,0	1,0	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	
4	6,3	6,3	3,5	3,5	3,5	3,5	1,7	1,7	1,7	2,7	2,7	2,7							1,5	1,5	0,7	0,7	0,7	0,0	0,0	0,0	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
5	13,8	13,8	38,8	38,8	38,8	38,8	31,3	31,3	31,3	15,3	15,3	15,3	33,0	10,7	10,7	10,7	10,7	10,7	10,7													
6	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	4,7	4,7	4,7	1,0	1,0	1,0							1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	3,0	3,0	3,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	

colónia	01-Jun	02-Jun
1	15,0	15,0
2	11,5	11,5
3	6,0	6,0
4	1,0	1,0
5		
6	1,0	1,0

Anexo 18 - Monitorização da mortalidade diária de abelhas nas colónias infestadas (aplicação do OE em colónias)

colónia	21-Abr	22-Abr	23-Abr	24-Abr	25-Abr	26-Abr	27-Abr	28-Abr	29-Abr	30-Abr
1	6,0	8,0	8,0	8,0	8,0	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
2	8	10	7,0	7,0	7,0	7,0	8,3	8,3	8,3	8,3
3	1	1	3	3	3	3	4,5	4,5	4,5	4,5
4	2	1	1,8	1,8	1,8	1,8	2,3	2,3	2,3	2,3
5	1	3	2,8	2,8	2,8	2,8	2,2	2,2	2,2	2,2
6	4	2	3,3	3,3	3,3	3,3	1,5	1,5	1,5	1,5

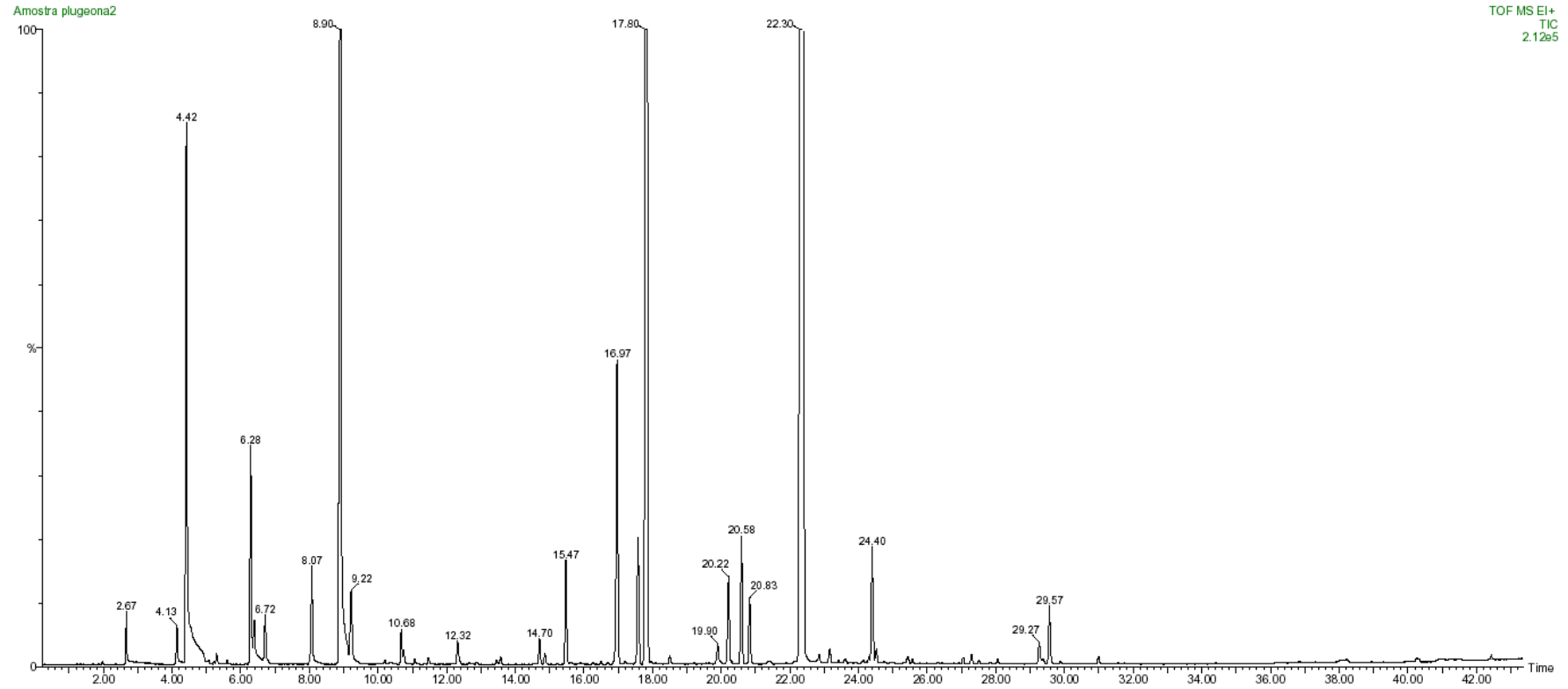
colónia	01-Mai	02-Mai	03-Mai	04-Mai	05-Mai	06-Mai	07-Mai	08-Mai	09-Mai	10-Mai	11-Mai	12-Mai	13-Mai	14-Mai	15-Mai	16-Mai	17-Mai	18-Mai	19-Mai	20-Mai	21-Mai	22-Mai	23-Mai	24-Mai	25-Mai	26-Mai	27-Mai	28-Mai	29-Mai	30-Mai	31-Mai
1	7,5	10,3	10,3	10,3	10,3	10,8	10,8	10,8	12,3	12,3	12,3	12,3	7	7	7	7	7	7	10,3	4	4	4	1,7	1,7	1,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,4
2	8,3	8,3	11,3	11,3	11,3	11,3	9,7	9,7	9,7	7,7	7,7	7,7	9	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	8,7	4	0,3	0,3	0,3	1,7	1,7	1,7	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
3	4,5	4,5	3,8	3,8	3,8	3,8	6	6	6	7,3	7,3	7,3	3	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	2	0,3	0,3	0,3	2,7	2,7	2,7	1	1	1	1	1
4	2,3	2,3	4,3	4,3	4,3	4,3	2,7	2,7	2,7	3,3	3,3	3,3	3	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	1	0	0	0	2,3	2,3	2,3	1	1	1	1	1
5	2,2	2,2	3	3	3	3	3,3	3,3	3,3	4,3	4,3	4,3	4																		
6	1,5	1,5	4	4	4	4	4	4	4	3,3	3,3	3,3	2	3	3	3	3	3	3	2	0,7	0,7	0,7	0,3	0,3	0,3	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8

colónia	01-Jun	02-Jun
1	1,4	1,5
2	1	1
3	1,5	1,5
4	0	0
5		
6	0,5	0,5

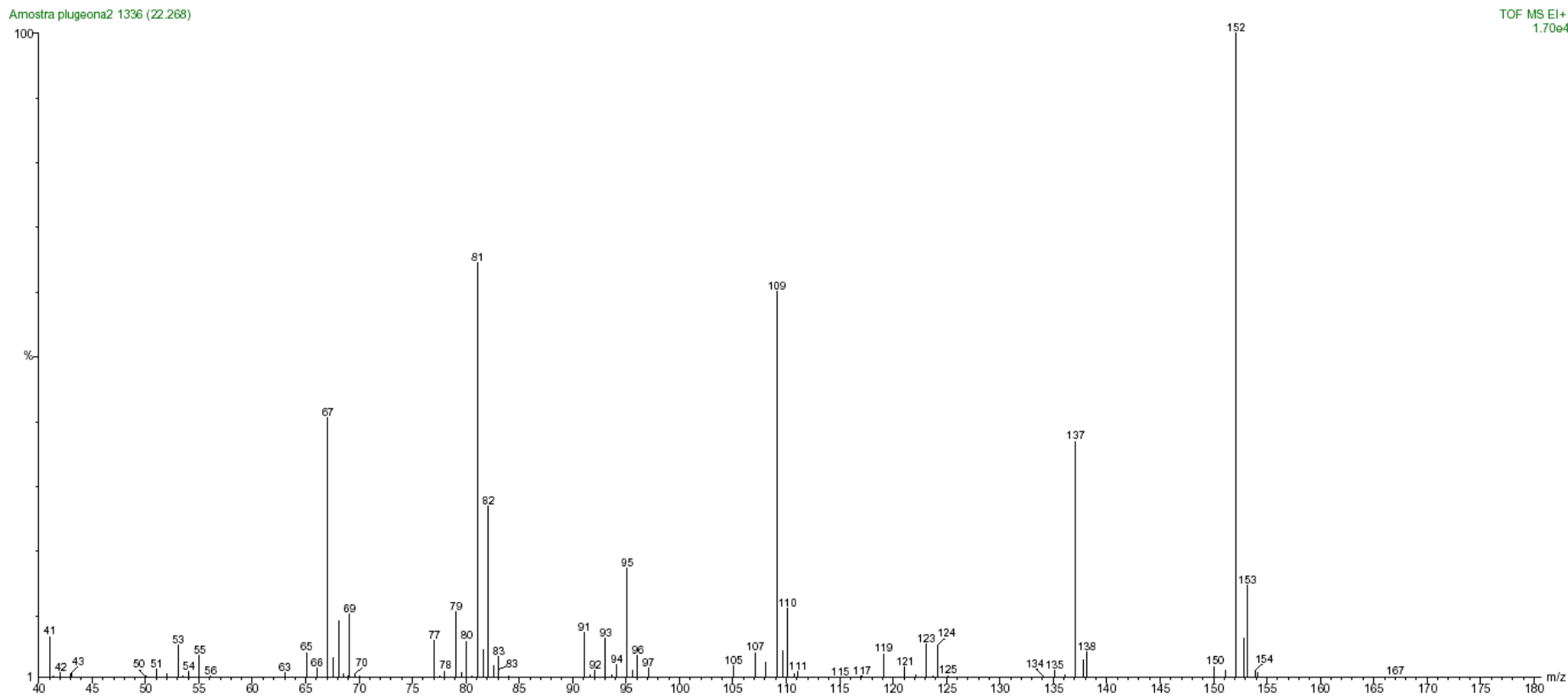
Anexo 19 - Dados meteorológicos da tapada da ajuda referente ao período de ensaios.

Latitude: 38° 42'N; Longitude: 9° 11'N; Altitude: 60 m					
Data	Temperatura		Precipitação (mm)	Insolação diária	
	Média	Máxima		Horas	%
Abril					
21	15,4	18,2	20,1	6,6	48
22	13,9	16,8	6,0	0,5	3
23	16,6	20,7	3,2	4,4	32
24	19,5	24,0	0,0	7,9	58
25	19,9	25,2	0,0	12,0	88
26	19,7	25,0	0,0	12,3	90
27	19,9	25,2	0,0	8,8	64
28	18,6	23,2	0,0	11,0	80
29	19,5	23,5	0,0	2,6	18
30	18,6	23,5	15	1,1	8
Maio					
1	17,0	23,4	0,0	5,3	38
2	17,3	21,6	6,5	5,2	37
3	15,9	20,7	3,0	12,1	87
4	15,1	19,6	0,0	7,4	53
5	15,5	20,5	0,0	11,6	83
6	16,0	20,0	0,0	4,1	29
7	16,1	19,5	0,0	11,2	80
8	18,3	20,5	0,0	10,0	71
9	18,3	25,0	0,0	12,7	90
10	20,1	28,0	0,0	12,6	89
11	19,8	27,5	0,0	12,0	85
12	22,0	28,5	0,0	12,2	85
13	23,5	28,5	0,0	12,8	90
14	22,5	29,0	0,0	9,7	68
15	22,5	29,0	0,0	12,2	85
16	22,0	28,5	0,0	6,6	46
17	21,5	25,0	7,6	7,6	54
18	19,3	22,0	7,2	0,3	2
19	21,0	26,0	1,7	12,4	86
20	22,5	27,5	0,0	13,0	90
21	20,3	26,0	0,0	13,0	90
22	19,9	26,5	0,0	13,0	90
23	21,8	29,5	0,0	11,8	83
24	24,5	33,0	0,0	12,2	85
25	22,5	29,0	0,0	4,8	33
26	20,0	22,0	0,0	0,0	0,0
27	21,2	26,8	1,0	10,8	73
28	24,0	27,5	0,0	6,8	46
29	21,6	27,2	25,6	10,2	69
30	21,7	27,3	45,2	5,8	39
31	13,2	22,5	0,0	12,9	88
Junho					
1	20,8	28,0	0,0	13,1	89
2	22,0	26,5	0,0	12,6	85
3	22,0	28,0	0,0	12,6	85

Anexo 20 - Cromatograma obtido por gc/ms mediante ionização electrónica (extracção e análise cromatográfica)



Anexo 21 - Espectro de massa obtido para a pulegona (pico com tempo de retenção 22.30 min) (extração e análise cromatográfica)



Anexo 22 - Espectro de referência para a pulegona (extração e análise cromatográfica)

