

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO ÁCARO *Varroa destructor* EM ABELHAS *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADAS)

GUIDO LAÉRCIO BRAGANÇA CASTAGNINO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU - SP

Junho – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO ÁCARO *Varroa destructor* EM ABELHAS *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADAS)

GUIDO LAÉRCIO BRAGANÇA CASTAGNINO

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof^ª Dr^ª Silvia Regina Cunha Funari

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo de Oliveira Orsi

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU - SP

Junho – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Castagnino, Guido Laércio Bragança, 1960-
C346p Produtos naturais no controle do ácaro *Varroa destructor*
em abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas) / Guido Laér-
cio Bragança Castagnino. - Botucatu : [s.n.], 2008.
x, 53 f. : tabs.

Tese (Doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Facul-
dade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008
Orientador: Silvia Regina Cunha Funari
Co-orientador: Ricardo de Oliveira Orsi
Inclui bibliografia.

1. Abelha africanizada. 2. Acaricidas. 3. Ácaro - Controle natural. 4. *Varroa destructor*. 5. Abelha. I. Funari, Silvia Regina Cunha. II. Orsi, Ricardo de Oliveira. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Dedicatória

*A minha esposa Andréa Langbecker pelo
carinho, amor, dedicação e por estar sempre
ao meu lado a cada dia, acreditando sempre
no meu trabalho, muito obrigado.*

*As minhas filhas Sofia e Olga Langbecker
Castagnino pelas alegrias, ensinamentos e
pela motivação de cada dia!*

E, sobretudo, a Deus!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. **Silvia Regina Cunha Funari**, pela oportunidade concedida ao orientar-me e a amizade durante o período de convivência ao longo do curso.

Ao Prof^o. Dr. **Ricardo Oliveira Orsi** pela amizade, ensinamentos, apoio e confiança integral no meu trabalho, cujo auxílio foi indispensável para a sua execução, meu muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) por disponibilizar bolsa de estudo, permitindo que realizasse o curso.

À **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu** e à Pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do curso.

À minha família, em especial aos meus pais, **Antônio Pereira Castagnino** (*in memoriam*) e **Ércia Bragança Castagnino** e minhas irmãs **Maria Auxiliadora** e **Dora Djanira Castagnino** pela atenção, carinho e apoio dedicados a mim ao longo do tempo, muito obrigado.

Aos meus sogros **Dejalma Romeu Langbecker** (*in memoriam*) e **Ester Langbecker** pela atenção, carinho e apoio dedicados a mim e a minha família.

Ao professor **Silvio Lengler**, da Universidade Federal de Santa Maria, pelos ensinamentos e amizade durante a graduação e por despertar em mim o amor pelas abelhas.

Ao professor **Dejair Message**, da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos, a amizade e pelos conhecimentos aprofundados na área de apicultura durante o mestrado.

Aos tios **Constante e Stella Castagnino Menti** pela atenção, carinho e apoio dedicados a mim ao longo do tempo.

À amiga **Sabrina Endo** pela bela acolhida, a atenção, o carinho, os momentos agradáveis e a amizade dedicada a minha família.

Aos queridos amigos, em especial **Marleide** e **Gil, Luiz Gabriel** e **Blanca, Claudia** e **Lucinei, Luciane** e **Igo**, pelo carinho que nos acolheram e a indispensável amizade dedicada ao longo do curso, obrigado a todos.

A todos aqueles que participaram e contribuíram para a finalização desta etapa da minha vida!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	01
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	02
Referências Bibliográficas.....	08
CAPÍTULO 2.....	13
PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO ÁCARO <i>Varroa destructor</i> EM ABELHAS <i>Apis mellifera</i> L. AFRICANIZADAS	
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1- Introdução	16
2- Material e Métodos	17
2.1. Local do experimento.....	17
2.2. Testes <i>in vitro</i>	18
2.2.1. Teste <i>in vitro</i> em <i>Apis mellifera</i> L. (africanizadas).....	18
2.2.2. Teste <i>in vitro</i> nos ácaros <i>Varroa destructor</i>	18
2.3. Teste de campo.....	18
2.4. Tratamentos.....	19
2.5. Modo de aplicação dos produtos.....	19
2.6. Verificação de infestação.....	20
2.6.1. Infestação de varroa em abelhas adultas antes e após o tratamento.....	20
2.6.2. Infestação de varroa em crias de abelhas antes e após o experimento.....	20
2.7. Verificação do índice de mortalidade.....	21
2.7.1. Mortalidade das crias antes do experimento.....	21
2.7.2. Mortalidade das crias após o tratamento.....	21
2.7. Análise estatística.....	21
3-Resultados	22
3.1- Teste, <i>in vitro</i> , em abelhas <i>Apis mellifera</i> L., (africanizadas).....	22
3.2-Testes <i>in vitro</i> nos ácaros <i>Varroa destructor</i>	22
3.3-Testes de campo.....	23
3.3.1-Taxa de infestação de varroa nas crias de abelhas operárias <i>Apis mellifera</i>	23

3.3.2-Taxa de infestação de varroa em abelhas adultas.....	24
3.3.3-Taxa de mortalidade de cria de abelhas.....	25
3.3.4-Mortalidade de varroas em cartolina em cada aplicação.....	26
4-Discussão.....	26
4.1-Testes <i>in vitro</i>	26
4.2-Testes de campo.....	27
5-Conclusões.....	32
6-Referências Bibliográficas.....	32
CAPÍTULO 3.....	36
ÉSTER DE SACAROSE NO CONTROLE DO ÁCARO <i>Varroa destructor</i> EM ABELHAS <i>Apis Mellifera</i> L.(africanizadas)	
Resumo.....	37
Abstract.....	38
1-Introdução.....	39
2-Material e Métodos.....	40
2.1-Local do experimento.....	40
2.2-Testes realizados.....	41
2.2.1-Testes <i>in vitro</i> do éster de sacarose em varroas.....	41
2.2.2-Testes <i>in vitro</i> do éster de sacarose em abelhas adultas.....	41
2.2.3-Teste de campo.....	42
2.3-Modo de aplicação dos produtos.....	42
2.4-Taxa de infestação de varroa em abelhas adultas antes e após o tratamento.....	42
2.5-Taxa de mortalidade de varroas nas colméias antes e durante o tratamento.....	43
2.6-Cria aberta, operculada e alimento estocado.....	43
2.7-Análise estatística.....	43
3-Resultados.....	44
3.1-Teste <i>in vitro</i> de éster de sacarose em varroas.....	44
3.2-Teste <i>in vitro</i> de éster de sacarose em abelhas <i>Apis mellifera</i> L., (africanizadas).....	45
3-Testes de campo.....	45
3.3.1-Taxa de infestação de varroa em abelhas adultas	45
3.3.2-Mortalidade de varroas nas colméias antes e após a aplicação do éster de	46

sacarose.....	
3.3.3-Cria aberta, operculada e alimento estocado.....	47
4-Discussão.....	47
5-Conclusões.....	49
6-Referências Bibliográficas.....	50
CAPÍTULO 4.....	52
IMPLICAÇÕES.....	53

SUMÁRIO DE TABELAS**CAPÍTULO 2**

- Tabela 1 - Taxa de mortalidade de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, *in vitro*, após seis horas de observação com óleos essenciais de arruda, hortelã, timol e eucalipto 22
- Tabela 2 - Taxa de mortalidade de *Varroa destructor in vitro*, após seis horas de observação com óleos essenciais de arruda, hortelã, timol e eucalipto 23
- Tabela 3 - Taxa de infestação (%) de *Varroa destructor* em cria de abelhas *Apis mellifera* africanizadas antes e após os tratamentos com arruda, ácido oxálico, timol, eucalipto e hortelã 24
- Tabela 4 - Taxa de infestação (%) de *Varroa destructor* em abelhas adultas, antes e após os tratamentos com arruda, ácido oxálico, timol, eucalipto e hortelã e % de redução da infestação 25
- Tabela 5 - Taxa de mortalidade (%) de cria de abelhas *Apis mellifera* antes e após o tratamento com arruda, ácido oxálico, timol, eucalipto e hortelã 26

SUMÁRIO DE TABELAS**CAPÍTULO 3**

Tabela 1 - Mortalidade de <i>Varroa destructor</i> , <i>in vitro</i> , em concentrações de éster de sacarose.....	44
Tabela 2 - Mortalidade de abelhas <i>Apis mellifera</i> , <i>in vitro</i> , em concentrações de éster de sacarose.....	45
Tabela 3 - Infestação de <i>Varroa destructor</i> em abelhas adultas antes e depois do tratamento com éster de sacarose e porcentagem (%) de redução de infestação.....	46
Tabela 4 - Mortalidade do ácaro <i>Varroa destructor</i> nas colméias, para o período antes e após a aplicação de éster de sacarose.....	46
Tabela 5 - Número de quadros de cria aberta, operculada e alimento estocado em colméias antes e depois da aplicação de éster de sacarose.....	47

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A apicultura é uma ciência que estuda a criação de abelhas e a exploração de seus produtos em benefício do homem, além de exercer importante função social (geração de empregos) e ecológica (preservação ambiental). Desde a introdução no Brasil da abelha *Apis mellifera* L., em 1839, essa área tem apresentado crescente desenvolvimento, favorecido pelas floradas diversificadas e clima propício, o que possibilita elevada produção durante todo o ano (CAMARGO, 1972; COUTO; COUTO, 2002).

As abelhas cumprem ainda outro importante papel, o de polinizadoras em culturas de grãos. Embora não existam dados no país, de acordo com a Embrapa (2007), nos Estados Unidos, essa prática contribui para que a produção de grãos aumente entre 5 a 500%, gerando benefício mundial de 100 bilhões de dólares por ano.

Quanto às enfermidades apícolas, o Brasil está em situação vantajosa comparado com outros países, por apresentar enxames rústicos que, por serem mais resistentes a doenças, dispensam a utilização de antibióticos. Essa característica confere um produto isento de resíduos; mas, o grande desafio é assegurar aos consumidores e ao mercado a comprovação da qualidade exigida (SOUZA, 2006). Por isso, o combate de doenças e pragas deve ser feito evitando a contaminação dos produtos por compostos químicos.

Entretanto, diversas doenças podem afetar as colméias de abelhas africanizadas presentes no Brasil, como a cria pútrida européia, cria giz, acariose, dentre outras. Uma praga apícola mundial que vem causando preocupação aos apicultores da região Sul do país é o ácaro ectoparasita *Varroa destructor*.

Ele foi descrito pela primeira vez em 1904 por A.C. Oudemans (DELFINADO; BAKER, 1974), quando encontrado parasitando a abelha asiática *Apis cerana* (GUPTA, 1961). Renomeado posteriormente como *Varroa destructor* por Anderson e Trueman (2002), o ácaro, que afeta tanto as crias como as abelhas adultas, tornou-se parasita da *Apis mellifera* L. a partir da década de 60, possivelmente devido à transferência de quadros de colméias *Apis cerana* para *Apis mellifera* L. (DELFINADO, 1963).

O ciclo de vida da fêmea do ácaro *Varroa destructor* caracteriza-se por ter duas fases bem distintas, forética: quando ela está aderida ao corpo das abelhas adultas, e a reprodutiva: quando a fêmea adulta abandona abelhas operárias e zangões e invade suas

células de crias para realizar a postura (IFANTIDIS, 1988). A fêmea do ácaro entra na célula da cria imediatamente após abandonar o corpo da abelha adulta (BOOT et al., 1994b), quando a cria encontra-se no seu último estágio larval (DE JONG, 1997). Uma vez dentro da célula do favo, a fêmea do ácaro permanece escondida entre o alimento e a larva. Depois que o alimento é consumido pela larva, a fêmea da varroa deposita o primeiro ovo, que originará um macho. Os ovos seguintes serão postos em intervalos de 30 horas e serão fêmeas. A função do macho é copular com as fêmeas irmãs, morrendo em seguida. Quando a nova abelha emergir da célula de cria, com ela sairão os ácaros fêmeas prontos para parasitar novas abelhas adultas, reiniciando a fase forética (DE FELIPE; VANDAME, 1999).

A fêmea do ácaro é de cor marrom-avermelhada, de forma oval e plana, com dimensões de 1,0 mm de comprimento por 1,6 mm de largura. O macho não tem aparelho bucal, não se alimenta de hemolinfa da abelha, tem coloração esbranquiçada e é menor (0,7 mm de comprimento por 0,7 mm de largura) (SAMMATARO et al., 2000).

No período de florada, quando as colônias estão bem alimentadas e em fase de crescimento, as varroas distribuem-se entre as crias e as abelhas adultas. Segundo Boot et al. (1994a), o número de varroa está relacionado à estação do ano e à disponibilidade de cria na colméia, e os danos causados dependem do nível de infestação da colônia. De Jong et al. (1982) constataram que abelhas recém-nascidas, parasitadas pelo ácaro, têm redução de peso de 6,3 a 25,0%, quando comparadas com as não infestadas. Em alta infestação, as atividades das abelhas são reduzidas, ocasionando enfraquecimento gradual e destruição da colônia (MONTIEL; PIOLA, 1976).

A grande infestação do ácaro ainda está associada ao aparecimento de abelhas com má-formação nas asas, pernas, abdômen e tórax (DE JONG; GONÇALVES, 1981; DE JONG et al. 1982), redução da viabilidade de cria (AKRATANAKUL; BURGETT, 1975) e da vida da abelha (KOVAC; CRAILSHEIM, 1988). Eventualmente, também ocasiona o aparecimento de cria irregular e diminuição do número de abelhas (SHIMANUKI et al., 1994; SPIVAK, 1997).

Entre os fatores estudados sobre a preferência do ácaro na seleção entre as diferentes células de cria, estão a idade, casta da larva, sexo (DE JONG; MORSE, 1988) e tamanho da célula de cria (MESSAGE; GONÇALVES, 1995). Piccirillo e De Jong

(2003), ao compararem células de crias maiores, provenientes de favos de abelhas cárnicas (largura interna média de 5,3 mm), com os favos de cria de abelhas italianas (largura interna média de 5,15 mm), constataram que os primeiros foram cerca de 38% mais infestados que os favos de abelhas italianas, os quais, por sua vez, foram cerca de 13% mais infestados que os das abelhas africanizadas, que apresentaram favos com média de largura interna de 4,8 mm, construídos naturalmente.

A preferência do *Varroa destructor* por células de zangões também tem sido observada em abelhas africanizadas. Zangões criados em células de operárias foram menos infestados do que quando desenvolvidos em suas próprias células (maior tamanho), mas foram mais infestados do que operárias em células de zangões, indicando que há um fator inerente à larva de zangão causando essa diferença (CALDERONE; KUENEN, 2001). Segundo os mesmos autores, os níveis de infestação são influenciados por fatores ambientais, fatores intrínsecos do hospedeiro, interações entre esses fatores e a variação entre colônias. Para Fries et al. (1994), o crescimento populacional do ácaro é afetado pela taxa de reprodução, capacidade de movimentação das fêmeas varroas nas células dos favos de cria e a sua taxa de mortalidade. Esses fatores estão associados a variações de características biológicas e comportamentais de diferentes raças de *Apis mellifera*, ocasionando efeitos positivos e negativos na população de ácaros na colônia.

Atualmente, a varroatose está disseminada em várias partes do mundo, principalmente em regiões de clima temperado onde tem encontrado condições ideais para se desenvolver, ocasionando grandes prejuízos à apicultura (BAKER; PENG, 1995). Na Europa, principalmente em regiões temperadas, a perda de colônias devido à infestação por varroa pode chegar a 100% (DE JONG et al., 1982).

Entretanto, em regiões de clima tropical e subtropical, o ácaro estabeleceu-se com baixos níveis de infestação (DE JONG et al., 1984). Segundo os mesmos autores, a praga foi introduzida no Brasil, em 1972, por meio da importação de rainhas e crias infestadas vindas do Paraguai; porém, somente foi descrita pela primeira vez em 1978, na região de Piracicaba, Estado de São Paulo (ALVES et al., 1979). Em menos de 10 anos, a varroa já havia se dispersado para todos os estados que praticam a apicultura com *Apis mellifera* L. (DE JONG et al., 1984; MORETTO et al., 1991).

Gonçalves et al. (1981) constataram que, em apiários do estado de São Paulo, mais de 80,0% das áreas visitadas apresentavam infestação pelo ácaro, variando entre 2,0 a 45,0%. À medida que a varroa se dispersava pelas diversas regiões do Brasil, verificou-se que os índices de infestação diminuíram após alguns anos da infestação inicial. Atualmente, parece ter se estabelecido o equilíbrio entre o *Varroa destructor* e as abelhas africanizadas nas condições climáticas do Brasil. Entretanto, apesar de não ocasionar aparentes prejuízos às colônias de abelhas no país, há registros de altos índices de infestação em algumas regiões brasileiras (DE JONG et al., 1984; MORETTO et al., 1991) e existem relatos de que a varroa pode ser via de entrada de outras doenças na colméia.

Segundo Suchail et al. (2004), existem casos de mortalidade de *Apis mellifera* L. que podem estar relacionados indiretamente com a presença do *Varroa destructor* e do *Nosema apis*, causador da doença nosebose (BALL; ALLEN, 1988). Allen e Ball (1996) enfatizam que a sucção da hemolinfa pelo ácaro pode ser também um meio de transmissão de bactérias e vírus, tais como o vírus da paralisia aguda (ABPV), paralisia crônica (CBPV) e o vírus que deforma asas (DWV). Segundo Antúnez et al. (2006), esses mesmos vírus e o da cria ensacada (SBV) já foram identificados no Uruguai. Os mesmos autores sugerem que a presença desses vírus e do ácaro *Varroa destructor* poderiam estar associados à alta mortalidade da *Apis mellifera* L. naquele país.

Para combater o *Varroa destructor*, tornou-se usual, principalmente na Europa, a utilização de várias classes de pesticidas, como organofosforados, clorados e piretróides (MILANI, 1995; HIGES, 1999). No entanto, esses produtos vêm apresentando problemas em vários países por se tornarem menos eficazes devido ao aumento da resistência das populações de ácaros nas colônias tratadas (LODESANI et al., 1995). O uso constante desses acaricidas sintéticos também tem elevado a contaminação dos produtos da colônia, principalmente do mel e da cera (GAMBER, 1990; WALLNER, 1995).

Esses problemas apresentados pelos produtos convencionais têm sido um incentivo para pesquisadores na elaboração de novas estratégias de tratamento contra a varroa, como o uso de ácido oxálico, óleos essenciais, tais como: arruda (*Ruta graveolens*), timol (Tomilho - *Thymus vulgaris*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), hortelã (*Mentha piperita*) e éster de sacarose. Segundo Maga (1983), uma das vantagens da

utilização dos óleos essenciais é que são substâncias naturais que compõem os aromas que estão contidos no mel. Eles são líquidos voláteis com cheiro forte, elaborados pelo metabolismo secundário de espécies vegetais (BONNER, 1961) e servem a várias funções nas plantas, entre elas, a de defendê-las contra o ataque de insetos, ácaros e patógenos, exercendo efeito tóxico nesses organismos (SALISBURY; ROSS, 1992). Calderone et al. (1997) constataram que muitos deles mostraram atividade acaricida no controle da varroa, sugerindo que podem ser usados no combate dessa praga. Imdorf et al. (1999) e Lindberg et al. (2000), após testes *in vitro* com óleos vegetais, verificaram que estes são eficazes no controle do ácaro, apresentando baixa toxicidade para as abelhas.

O timol, composto farmacologicamente ativo extraído do óleo essencial do tomilho (*Thymus vulgaris*) (Farmacopéia italiana, 1998), é outro produto natural cuja eficiência acaricida já foi comprovada por diversos autores (GAL et al., 1992; IMDORF et al., 1995a; IMDORF et al., 1995b; HIGES et al., 1996; COLIN, 1990). Mikityuk e Grobov (1979) verificaram que o timol foi mais eficiente quando ocorria maior evaporação do produto devido ao aumento da temperatura. Os autores usaram 0,25g entre todos os favos contendo cria de abelhas, obtendo mortalidade nos ácaros de 55,0%. O produto ainda tem como vantagem a baixa toxicidade para as abelhas quando manejado em doses adequadas (IMDORF et al., 1995b) com reduzido poder residual no mel (IMDORF et al., 1995a).

O ácido oxálico também é uma substância natural que já vem sendo testada no combate ao *Varroa destructor*. Pesquisas mostram que esse produto é altamente eficaz no controle do ácaro quando a colônia possui pouca ou nenhuma cria operculada (IMDORF et al., 1997; GREGORC; PLANINC, 2001, 2002). Em experimento usando solução composta de 2,9% de ácido oxálico em 31,9% de açúcar, diluído em água, resultou em uma mortalidade do ácaro superior a 97,0% (GREGORC; POKLUKAR, 2003). Mutinelli et al. (1997), fazendo uso de três aplicações de 5,0% de ácido oxálico, obtiveram 95% de mortalidade, mas verificaram que a aplicação não foi eficaz durante o período de cria operculada.

Além desses produtos naturais, o éster de sacarose também vem atuando no combate de insetos e de ácaros, mas que atacam principalmente culturas e grãos. Ele pertence à classe moderna de inseticida biológico formada por compostos produzidos

pela reação de sacarose com ácidos graxos aromáticos (PUTERKA et al., 2003). É um composto que foi originalmente isolado das folhas de tabaco (*Nicotiana* sp) e, por muitos anos, tem sido utilizado no controle de algumas pragas agrícolas devido à presença de substâncias com atividades inseticidas (THURSTON; WEBSTER, 1962). Conforme Michaud e Mckenzie (2004), o éster de sacarose tem despertado grande interesse pela sua ação no controle de predadores e parasitas de culturas vegetais. Embora o seu uso no controle específico do ácaro ectoparasita ainda seja recente, Sheppard et al. (2003) desenvolveram técnica de aplicação com única pulverização nos favos com abelhas adultas, utilizando diluição de 0,25% da solução ativa, alcançando média de eficiência de 68,0% de mortalidade do ácaro. Desta forma, o uso de produtos naturais no controle do ácaro *Varroa destructor* é importante para a manutenção da sanidade das colméias de abelhas *Apis mellifera* L. além de não deixar resíduos nos produtos apícolas, garantindo qualidade ao consumidor.

Como exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, o tema foi dividido em capítulos, a saber:

- Capítulo 2: **Produtos naturais no controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas)**, o qual será submetido à publicação na revista **Boletim da Indústria Animal**, de acordo com suas normas. A meta específica deste trabalho foi avaliar o efeito de produtos naturais (arruda, timol, ácido oxálico, hortelã e eucalipto) no combate ao ácaro *Varroa destructor*.
- Capítulo 3: **Éster de sacarose no controle do ácaro *Varroa destructor* em abelhas *Apis Mellifera* L. (africanizadas)**, o qual será submetido à publicação na revista **Boletim da Indústria Animal**, de acordo com suas normas. A meta específica deste trabalho foi avaliar o efeito de éster de sacarose (produto natural) no combate ao ácaro *Varroa destructor*.
- Capítulo 4: **Implicações.**

Referências Bibliográficas

AKRATANAKUL, P.; BURGETT, M. *Varroa jacobsoni*: a prospective pest of honeybee in many parts of the world. **Bee World**, v.56, n.3, p.119-121, 1975.

ALLEN, M.F.; BALL B.V. The incidence and world distribution of honey bee viruses, **Bee World**, v.77, p.141-62, 1996.

ALVES, S.B. et al. *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904, (Acari, Mesostigmata, Varroidae) also in Brazil, **Ecosistema**, v.3, p.78-79, 1979.

ANDERSON, D.; TRUEMAN., J. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more one species. **Experimental & Applied Acarology**, v.24, p.65-89, 2002.

ANTÚNEZ. K. et al. Honeybee viruses in Uruguay. **Journal Invertebrate Pathology**, v.93, p.67-70, 2006.

BAKER, M.D; PENG, C.Y.S. *Varroa jacobsoni* and *Tropilaelaps clareae*: a perspective of live history and why Asian bee mites preferred honeybees. **American Bee Journal**, v.135, n.6, p.415-420, 1995.

BALL, B.V.; ALLEN, M.F. The prevalence of pathogen in honeybee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*, **Annals of Applied Biology**, v.113, n.2, p.237-244, 1988.

BONNER, J. The isoprenoids. In: Bonner, J.; Verner, J. E. (Ed.) **Plant biochemistry**, New York: Academic Press, 1961. p.665-692.

BOOT, J. et al. Factors affecting invasion of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) into honeybee, *Apis mellifera* (hymenoptera: Apidae), brood cells. **Bulletin of Entomological Research**, v.84, p.3-10, 1994a.

BOOT, J. et al. Behavior of varroa mites invading bee brood cells. **Experimental and Applied Acarology**, v.18, p.371-79, 1994b.

CALDERONE, N.W. et al. Plant extracts used for control of the parasitic mites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.1080-6, 1997.

CALDERONE, N.W.; KUENEN, L.P.S. Effects of western honey bee (hymenoptera: Apidae) colony, cell type, and larval sex on host acquisition by female *Varroa destructor* (Acari: Varroidae)., **Journal of Economic Entomology**, v.94, p.1022-30, 2001.

CAMARGO, J.M.F. **Manual de apicultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1972. 252p.

COLIN, M.E. Essential oils of Labiatae for controlling honey bee varroosis. **Journal of Applied Entomology**, v.110, p.19-25, 1990.

COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e produtos**. Jaboticabal: FUNEP, p.191, 2002.

DE FELIPE, M.S.; VANDAME, R. **Curso de capacitación sobre control alternativo de Varroa en apicultura**. Cordoba: Colegio de Post graduando, México, 15p., 1999.

DE JONG, D. et al. Mite pests of honey bees. **Annual Review of Entomology**, v.27, p.229-52, 1982.

DE JONG, D. et al. Dependence on climate of the virulence of *Varroa jacobsoni*. **Bee World**, v.65, p.117-21, 1984.

DE JONG, D.; GONÇALVES, L.S. The varroa problem in Brazil. **American Bee Journal**, v.121, p.186-9, 1981.

DE JONG, D. Mites: varroa and other parasites of brood. In: MORSE, R. A; FLOTTUM, K. (Ed.), **Honey bee pest, predators and diseases**. 1997. p.279-328. The A. I. Root Company, OH.

DE JONG, D.; MORSE, R.A. Utilization of raised brood cells of the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), by the mite *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae). **Entomologia Generalis**, v.14, p.103-6, 1988.

DELFINADO, M.D. Mites of the honeybees in South – East Asia. **Journal Apicultural Research**, Cardiff, v.2, p.113-14, 1963.

DELFINADO, M.D.; BAKER, E.W. Varroidae, a new family of mites on honeybees (Mesostigmata: Acarina). **Journal Washington Academy Science**, Washington, D.C., v.64, n.1, p.4-10, 1974.

EMBRAPA. Produção de mel. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/importancia.htm>.> Acesso em: 20 out. 2007.

FARMACOPEIA italiana. 10. Ed. Roma: Instituto Poligrafico e Zecco dello Stato, 1998. v.6, p. 206-210.

FRIES, I. et al. Population dynamics of *Varroa jacobsoni*: a model and a review. **Bee World**, v.75, p.5-28, 1994.

GAL, H. et al. A preliminary report on the of origanum oil and thymol applications in honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies in subtropical climate on population levels of *Varroa jacobsoni*. **Bee Science**, v.2, p.175-80, 1992.

GAMBER, W.R. Fluvalinate scare should serve as warning. **American Bee Journal**, n.130, p.629, 1990.

GONÇALVES, L.S. et al. Infestation with the acarid *Varroa jacobsoni* in apiaries in state of Sao Paulo and expansion the pest in Brazil. IN: INTERNATIONAL APICULTURAL CONGRESS, n., 1981, Bucharest. **Proceedings...** Bucharest: editora, 1981. p.364.

GREGORC, A.; PLANINC, I. Acaricidal effect of oxalic acid in *honeybee (Apis mellifera)* colonies. **Apidologie**, v.32, p.333- 40, 2001.

GREGORC, A.; PLANINC, I. The control of *Varroa destructor* using oxalic acid. **Veterinarian Journal**, v.163, p.306-10, 2002.

GREGORC, A.; POKLUKAR, J. Rotenone and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for *Varroa destructor* in honeybee colonies, **Veterinarian Parasitology**, v.11, p.351-60, 2003.

GUPTA, G.A. *Varroa jacobsoni* a mite pest of *Apis indica*. **Bee World**, v.48, p.17-18, 1961.

HIGES, M. Ensayo de campo de la eficacia del Apivar y la rotenona en el control de la varroosis de la abeja de miel. **Apiacta**, v.34, p.33-38, 1999.

HIGES, M. et al. Ensayo de la eficacia del Bayvarol contra la varroosis de la abeja melífera (*Apis mellifera*) en presencia de cría. **Vida Apícola**, v.75, p.39-43, 1996.

IFANTIDIS, M.D. Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells. **Apidologie**, Paris, v.19, p.387-96, 1988.

IMDORF, A. et al. Efficiency checking of *the Varroa jacobsoni* control methods by means of oxalic acid. **Apiacta**, v. 32, p. 89-91, 1997.

IMDORF, A. et al. apilife Var: a new varroacide with thymol as the main ingredient. **Bee World**, v.76, p.77-83, 1995a.

IMDORF, A. et al. toxisitat von thymol, capher, menthol und eucaliptol auf *Varroa jacobsoni* Oud und *Apis mellifera* L. im labortest. **Apidologie**, v.26, p.27-31, 1995b.

IMDORF, A. et al. Use of essential oils for control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. **Apidologie**, Paris, v.30, p.209-28, 1999.

KOVAC, H.; CRAILSHEIM, K. Lifespan of *Apis mellifera carnica* Pollm. infested by *Varroa jacobsoni* in relation to season and extent of infestation. **Journal Apicultural Research**, v.27, n. 4, p.230-38, 1988.

LINDBERG, C. et al. Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. **Journal of Economic Entomology**, v.93, p.189-98, 2000.

LODESANI, M. et al. Ineffectiveness of Apistan[®] treatment against the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in several districts of Lombardy (Italy). **Apidologie**, Paris, v.26, p.67-72, 1995.

MAGA, J.A. Honey flavor. **Lebensm. Wiss. U. Technology**, v.16, p.65- 8, 1983.

MESSAGE, D.; GONÇALVES, L.S. Effect of the size of worker brood cells of africanized honey bees on infestation and reproduction of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. **Apidologie**, v.26, p.381-86, 1995.

MICHAUD, J.P.; MCKENZIE, C.L. Safety of a novel insecticide, sucrose octanoate, to beneficial insects. **Florida Entomologist**, v.87, p.6-9, 2004.

MIKITYUK, V.; GROBOV, O.F. Trials of chemical for controlling *Varroa jacobsoni* infestations of bees. **Tr. Vses. Instit. Eksp. Vet.** v.50, p.120-25, 1979.

MILANI, N. The resistance of *Varroa jacobsoni* Oud. to pyrethroids: a laboratory assay. **Apidologie**, Paris, v.26, p.415-429, 1995.

MONTIEL, J.C.; PIOLA, G.A. A new enemy of bees. In: **Varroasis, a honeybee disease**. Bucharest: Apimondia Publishing House, 1976. p.36-37.

MORETTO, G. et al. Africanized honey bees are more efficient at removing *Varroa jacobsoni* preliminary data. **American Bee Journal**, p.434, 1991.

MUTINELLI, F. et al. A scientific note on oxalic acid by topical application for the control of varroosis. **Apidologie**, v.28, p.461-62, 1997.

PICCIRILLO, G.A.; DE JONG, D. The influence of brood comb cell size on the reproductive behavior of the ectoparasitic mite *Varroa destructor* in Africanized honeybee colonies. **Genetics and Molecular Research**, v.2, p.36-42, 2003.

PUTERKA, G.J. et al. Structure-function relationships affecting the insecticidal and miticidal activities of sugar esters. **Journal of Economic Entomology**, v.96, p.636-644, 2003.

SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. 1992. (CA), Wadsworth, p.682.

SAMMATARO, E. et al. Parasitic mites of honey bees: Life, History, Implications, and Impact. **Annuary Review Entomology**, v. 45, p.5119- 5148, 2000.

SHEPPARD, G. et al. Use of sucrose octanoate esters to control the parasitic honey bee mite *Varroa destructor*. **American Bee Journal**, v.143, p.982-85, 2003.

SHIMANUKI, H. et al. Parasitic mite syndrome: the symptoms. **American Bee Journal**, v.134, p.827-828, 1994.

SOUZA, D.C. Adequando a Apicultura para a Exportação. IN: CONGRESSO BRASILEIRO de APICULTURA, 16, 2006, Aracaju. Anais...Aracaju: 2006. CD-ROM.

SPIVAK, M. Honeybee hygienic behavior as a defense against *Varroa jacobsoni* mites. **Resistant Pest Management**, v.9, n.2, p.22-24, 1997.

SUCHAIL, S. et al. Metabolism of imidacloprid in *Apis mellifera*. **Pest Management Science**, v.60, p.291– 296, 2004.

THURSTON, R.; WEBSTER, J.A. Toxicity of *Nicotiana glauca* Domin to *Myzus persicae* (Sulzer). **Entomology Experimental Applied.**, v.5, p.233- 238, 1962.

WALLNER, K. The use of varroacides and their influence on the quality of bee products. **American Bee Journal**, v.135, p.817-21, 1995.

CAPÍTULO 2

PRODUTOS NATURAIS NO CONTROLE DO ÁCARO *Varroa destructor* EM ABELHAS *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADAS)

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do ácido oxálico e de óleos essenciais de plantas como arruda (*Ruta graveolens*), timol (*Thymus vulgaris*) eucalipto (*Eucalyptus* spp) e hortelã (*Mentha piperita*) na infestação do *Varroa destructor* em colônias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. Testes *in vitro* foram realizados para verificar o efeito desses produtos sobre as abelhas e os ácaros *Varroa destructor*. Vinte abelhas foram colocadas em gaiola de observação e, no seu interior, um bloco de esponja floral com 10 μ L, 50 μ L e 200 μ L dos diferentes óleos essenciais, segundo os tratamentos: T0: água, T1: óleo de arruda, T2: óleo de hortelã, T3: timol e T4: óleo essencial de eucalipto. Após, as abelhas e os ácaros foram observados por seis horas e quantificadas as mortalidades em decorrência do efeito de cada tratamento. Ambos os testes *in vitro* foram constituídos de quatro repetições por tratamento. No trabalho de campo, foram realizados seis tratamentos com cinco repetições, aplicados em 30 colônias, sendo: (T0) colméias sem tratamento; (T1) colméias tratadas com óleo essencial de arruda; (T2) timol; (T3) ácido oxálico; (T4) óleo essencial de eucalipto e (T5) óleo de hortelã. Os dados coletados antes da aplicação de cada produto foram confrontados com os obtidos após, verificando os diferentes níveis de mortalidade de varroas, taxa de mortalidade de crias de abelhas, taxa de infestação de varroas em crias e em abelhas adultas. Testes *in vitro* demonstraram que as substâncias testadas promoveram a mortalidade dos ácaros a partir de 10 μ L. Em trabalho de campo, constatou-se que as colônias tratadas com óleo de arruda, timol, ácido oxálico, óleo de eucalipto e de hortelã reduziram de forma significativa a mortalidade de crias quando parasitadas pelo ácaro. Os tratamentos com ácido oxálico e timol promoveram a redução significativa na infestação de varroas nas crias, e o ácido oxálico foi eficiente na redução da infestação do ácaro em abelhas adultas e nas colméias.

Palavras-chave: *Apis mellifera* L., *Varroa destructor*, óleos essenciais, timol, ácido oxálico.

NATURAL PRODUCTS IN CONTROL OF MITE *Varroa destructor* IN BEE *Apis mellifera* L. (AFRICANIZED)

Abstract: This study aimed to evaluate the effects of oxalic acid, and plant essential oils such as arruda (*Ruta graveolens*), thymol (*Thymus vulgaris*), eucalyptus (*Eucalyptus spp*) and mint (*Mentha piperita*) in the *Varroa destructor* infestation in hives of honeybees *Apis mellifera* africanized. *In vitro* tests were performed to determine the effect of these products on bees and *Varroa destructor* mite. Twenty bees were allocated in observational cages and inside a block of floral foam with 10 μ L, 50 μ L and L 200 μ L of different essential oils, according to the treatments: T0: water, T1: arruda oil, T2: mint oil, T3: thymol and T4: eucalyptus essential oil. Afterward, the bees and mites were observed for six hours and mortality recorded. Both *in vitro* tests were performed in quadruplicate measurements per treatment. Field study was conducted in Santana do Livramento / RS, from 20th June to 21st July, 2005. Six treatments with five repetitions were performed in 30 colonies, where: (T0) beehives without treatment; (T1) beehives treated with arruda essential oil, (T2) thymol, (T3) oxalic acid, (T4) eucalyptus essential oil, and (T5) mint oil. Data collected before the implementation of each product were confronted with those obtained after products administration, checking the different levels of varroas mortality, mortality rate of young bees, infestation rate of varroas in young and adult bees. *In vitro* tests showed that the tested substances promoted bees and mites mortality in equal or superior amounts of 10 μ L. In this context, it was found that the colonies treated with arruda oil, thymol, oxalic acid, eucalyptus and mint oil reduced significantly mortality of mite parasitized young bees. Treatments with oxalic acid and thymol promoted a significant reduction in varroas infestation in young bees, and oxalic acid was effective in reducing mite infestation of bee hives, and adult bees.

Keywords: *Apis mellifera* L., *Varroa destructor*, essential oils, thymol, oxalic acid

1. Introdução

Atualmente o ácaro ectoparasita *Varroa destructor* é uma das piores pragas apícolas mundiais. Ele foi descrito pela primeira vez em 1904 por A. C. Oudemans (Delfinado e Baker, 1974), quando foi encontrado parasitando a abelha asiática *Apis cerana* (Gupta, 1961). Inicialmente classificado como *Varroa jacobsoni* e renomeado posteriormente como *Varroa destructor* por Anderson e Trueman (2002), o ácaro afeta tanto as crias como as abelhas adultas, tornando-se parasita da *Apis mellifera* L. a partir da década de 60, possivelmente devido à transferência de quadros de colméias *Apis cerana* para *Apis mellifera* L. (Delfinado, 1963). De Jong (1982) constataram que abelhas recém-nascidas, parasitadas pelo ácaro, têm redução de peso de 6,3 a 25,0%, quando comparadas com aquelas não infestadas. Em caso de alta infestação, as atividades das abelhas são reduzidas, ocasionando enfraquecimento gradual e destruição da colônia (Montiel e Piola, 1976).

Para minimizar os efeitos da infestação da varroa, vários acaricidas sintéticos foram desenvolvidos. Entre eles, os mais utilizados nos últimos anos no controle da varroatose têm sido os à base de organofosforados, clorados e piretróides (Higes, 1999). O desenvolvimento da resistência das populações de ácaros e a contaminação da colméia têm sido um incentivo para a elaboração de estratégias de tratamento que minimizem a resistência e o acúmulo desses resíduos químicos na cera e no mel. Diante deste fato, é crescente o interesse de pesquisadores e apicultores por alternativas de combate às doenças e pragas, dentre as quais, o controle de varroa por meio de produtos naturais.

Os óleos essenciais servem a várias funções nas plantas, entre elas, a de defendê-las contra o ataque de insetos, ácaros e patógenos, exercendo efeito tóxico nesses organismos (Salisbury e Ross, 1992). Baggio et al. (2004) constatou que muitos deles mostraram atividade acaricida no controle do endoparasita *Acarapis woodi* e, segundo Calderone et al. (1997), alguns foram eficazes no controle do *Varroa destructor*, sugerindo que podem ser utilizados na redução dessa praga. Lindberg et al. (2000) realizaram testes *in vitro* com óleos vegetais no controle desse ácaro e verificaram que muitos deles têm reduzida toxicidade para as abelhas, além do baixo custo.

O timol, composto farmacologicamente ativo, é extraído do óleo essencial do tomilho (*Thymus vulgaris*), planta aromática utilizada na culinária mediterrânea (Farmacopéia italiana, 1998), cuja eficiência acaricida já foi comprovada por diversos autores (Imdorf , 1995a; Higes *et al.*, 1996). Além do sucesso no controle da varroa, esse produto tem ainda como vantagem a baixa toxicidade para as abelhas, quando manejado em doses adequadas (Imdorf *et al.*, 1995a) e baixo poder residual no mel (Imdorf , 1995b).

Outra substância natural que vem sendo testada é o ácido oxálico. Pesquisas mostram que esse produto é altamente eficaz no controle da varroa quando a colônia possui pouca ou nenhuma cria operculada (Gregorc e Planinc, 2001, 2002). Várias formas de aplicação com diferentes concentrações de ácido oxálico já foram testadas, obtendo diferentes índices de mortalidade de varroa. Em experimento usando-se solução composta de 2,9% de ácido oxálico em 31,9% de açúcar, diluído em água, resultou em uma mortalidade superior a 97,0% (Gregorc e Poklukar, 2003). Mutinelli *et al.* (1997), fazendo uso de três aplicações de 5,0% de ácido oxálico, obtiveram eficácia de 95,0%, mas verificaram que a aplicação não foi eficaz quando existia cria operculada na colméia.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do ácido oxálico e de óleos essenciais de arruda (*Ruta graveolens*), eucalipto (*Eucalyptus* spp) hortelã (*Mentha piperita*) e timol (*Thymus vulgaris*) sobre o ácaro *Varroa destructor* em abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas).

2. Material e métodos

2.1. Local do experimento

Os testes *in vitro* foram realizados na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Produção Animal, Laboratório da Área de Produção de Apicultura, Campus de Botucatu.

2.2. Testes *in vitro*

2.2.1. Testes *in vitro* em *Apis mellifera* L. (africanizadas)

Foram coletadas 20 abelhas operárias e colocadas em gaiola de observação telada (10x20 cm), contendo em seu interior um bloco de esponja floral (1cm²). Com o auxílio de uma micropipeta, foram colocados sobre cada bloco 10µL, 50µL e 200µL das diferentes substâncias, segundo os tratamentos: T0: água, T1: óleo de arruda, T2: óleo de hortelã, T3: timol e T4: óleo de eucalipto, com quatro repetições, totalizando 240 abelhas por tratamento. As abelhas foram observadas por seis horas e quantificadas as mortalidades em decorrência do efeito de cada tratamento testado. Foram consideradas abelhas mortas àquelas que permaneceram imóveis e não apresentaram movimentos nas patas quando tocadas com a pinça.

2.2.2. Teste *in vitro* nos ácaros *Varroa destructor*

Para cada tratamento foram utilizadas seis placas de Petri contendo, em cada uma, 10 ácaros *Varroa destructor* e um bloco de esponja floral (1cm²). Com auxílio de uma micropipeta, foram colocadas sobre cada bloco diferentes quantidades de óleos essenciais de 10µL, 50µL, e 200µL, segundo os tratamentos: T0: água, T1: óleo de arruda, T2: óleo de hortelã, T3: timol e T4: óleo de eucalipto, com quatro repetições, totalizando 120 ácaros por tratamento. Os ácaros foram observados pelo período de seis horas nas placas e quantificadas as mortalidades em decorrência do efeito dos produtos testados. Foram considerados mortos àqueles que permaneceram imóveis e não apresentaram movimentos nas patas quando tocadas com a pinça.

2.3. Testes de campo

O experimento foi realizado no município de Santana do Livramento, no Rio Grande do Sul, nos meses de junho e julho de 2005. O apiário está localizado a 210 metros de altitude, nas seguintes coordenadas geográficas: 30^o53'33'' de latitude Sul e 58^o31'16'' de longitude Oeste e faz parte da Região da Campanha, distante 498 km de Porto Alegre. As temperaturas registradas no local durante o experimento variaram

entre $-1,0^{\circ}\text{C}$ a $30,0^{\circ}\text{C}$, sendo que a média das temperaturas mínimas foi de $7,2^{\circ}\text{C}$ e a máxima de $21,7^{\circ}\text{C}$.

O apiário selecionado para a realização da parte experimental foi composto por 50 enxames de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas), alojadas em colméias padrão Langstroth. Destas, foram selecionadas 30 colméias, nas quais foi constatada a presença de favos com opérculos perfurados ou totalmente abertos, contendo pupas mortas com asas deformadas e abdômen reduzido, ou seja, sintomas de colméias com infestação do ácaro parasita *Varroa destructor*.

2.4. Tratamentos

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos e cinco repetições totalizando 30 colônias de abelhas L., (africanizadas) da seguinte forma: cinco colméias como controle (T0), cinco com óleo essencial de arruda (T1), cinco com ácido oxálico (T2), cinco com timol (T3), cinco com óleo essencial de eucalipto (T4) e cinco com óleo essencial de hortelã (T5). As colméias selecionadas não sofreram aplicação prévia de qualquer tipo de produto no controle do ácaro *Varroa destructor*.

Os produtos testados foram adquiridos em estabelecimentos comerciais, especializados na venda de produtos naturais.

2.5. Modo de aplicação dos produtos

O tratamento T0 (controle) não recebeu nenhuma aplicação de qualquer produto até a finalização do experimento. As colônias do T1 receberam 10 mL de essência de arruda aplicados em duas placas de vermiculita (esponja floral, 2 x 8 x 8cm), segundo método utilizado por Calderone e Spivak (1995).

As colônias do tratamento T2 (ácido oxálico) receberam solução de açúcar diluída em água, contendo ácido oxálico. Para preparar a solução, foram diluídos 100g do ácido oxálico em 1 litro de água misturado com 1kg de açúcar. Obteve-se uma solução com 4,7% de ácido oxálico e de 47,6% de sacarose, em solução (w/v). As aplicações foram por meio de um pulverizador costal com um calibrador/dosificador calculado para um volume de 20mL da mistura por colônia, perfazendo três aplicações em 16 dias.

As colônias do T3 receberam 10g de timol em pó, diluídos em 10 mL de álcool aplicados em duas placas de vermiculita (esponja floral). As colônias do tratamento T4 receberam 10 mL de essência de eucalipto aplicados em duas placas de vermiculita (esponja floral). As do tratamento T5 receberam 10 mL de essência de hortelã em duas placas de vermiculita (esponja floral). Nos tratamentos T3, T4 e T5, as duas placas de vermiculita, após serem imersas nos respectivos produtos, foram distribuídas na parte superior dos favos da colônia. As aplicações ocorreram no período da manhã, às 8h e, a cada oito dias, nova quantidade de cada produto foi aplicada nas colônias, perfazendo um total de três aplicações.

2.6. Verificação de infestação

2.6.1. Infestação de varroa em abelhas adultas antes e após o tratamento

Dois dias antes da aplicação dos produtos, o nível de infestação de varroa em abelhas adultas foi determinado por meio da remoção de aproximadamente 100 abelhas adultas aderentes de um quadro no centro das colméias e transferidas para um becker contendo 200 mL de uma mistura na proporção de 1:3 de álcool/água. Após, o frasco foi agitado e o seu conteúdo transferido para um vasilhame branco para ser feita a contagem de abelhas e de varroa, determinando o nível de infestação por colônia, segundo a técnica descrita por De Jong e Mantilla (1986).

2.6.2. Infestação de varroa em crias de abelhas antes e após o experimento

Para determinar a taxa de infestação de varroa nas crias de abelhas, foi retirado do centro de cada ninho um favo contendo pupa operculada. Com auxílio de uma pinça, cerca de 100 células foram abertas para a retirada das pupas, contando-se o número de ácaros presentes em cada célula. A taxa de infestação (o número de ácaros por célula) foi determinada por meio da divisão do número de ácaros pelo número de pupas, segundo a técnica descrita por Gonçalves *et al.* (1981).

2.7. Verificação do índice de mortalidade

2.7.1. Mortalidade das crias antes do experimento

A taxa de mortalidade das crias de abelhas antes do início do período experimental foi determinada tomando-se como parâmetro a quantidade de crias que não conseguiram completar a metamorfose, ou seja, não passando de larva de quinto ínstar para pupa.

Para fazer essa avaliação, uma semana antes da aplicação dos acaricidas, foi retirado um favo com cria desoperculada do centro de cada colônia e, sobre ele, colocado um pedaço de papel celofane de 30cm x 20cm, mapeando com uma caneta hidrocor, no papel, aproximadamente 100 células contendo crias com cinco dias de vida. Em cada um dos mapeamentos, foram identificados o favo, a colônia e a data. Após 10 dias, com a ajuda dos mapeamentos realizados anteriormente, foi feita a contagem do número de crias que haviam sido removidas ou as que estavam mortas.

2.7.2. Mortalidade das crias após o tratamento

A taxa de mortalidade das crias após o período experimental foi semelhante ao período antes do experimento, ou seja, tomando-se como parâmetro a quantidade de crias que não conseguiram completar a sua metamorfose, não emergindo do favo como abelha adulta.

2.8. Análise Estatística

Para os testes *in vitro* foi utilizada Análise de Variância seguido do teste de Kruskal-Wallis e análise de regressão linear. Para os testes de campo foi utilizada Análise de Variância seguido do teste de Kruskal-Wallis para verificar diferença entre as médias dos tratamentos para os períodos antes e após a aplicação dos produtos. Para a comparação dos dados coletados antes e após a aplicação de cada tratamento foi utilizado o teste “t” de Student pareado. Foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 5\%$ de probabilidade (SAS, 2001).

3. Resultados

3.1. Testes *in vitro* em abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas)

Pôde-se observar que o uso dos óleos essenciais testados não promoveu aumento, de forma significativa ($p < 0,05$), na mortalidade de abelhas em relação ao controle (Tabela 1).

TABELA 1: Número médio de abelhas *Apis mellifera* africanizadas mortas, *in vitro*, após seis horas de observação com óleos essenciais de arruda, hortelã, timol e eucalipto. Os resultados representam a média e os respectivos desvios-padrão.

Produtos	10 μ L	50 μ L	200 μ L
Controle	0,50 \pm 0,8a	0,58 \pm 0,7a	0,58 \pm 0,8a
Arruda	0,92 \pm 1,1a	1,42 \pm 1,2a	1,33 \pm 1,8a
Hortelã	0,58 \pm 0,8a	0,58 \pm 0,9a	0,92 \pm 1,1a
Timol	0,67 \pm 0,9a	1,08 \pm 1,0a	1,16 \pm 1,1a
Eucalipto	1,00 \pm 0,8a	1,33 \pm 1,1a	1,33 \pm 1,3a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os tratamentos e controle ($p < 0,05$).

3.2. Testes *in vitro* nos ácaros *Varroa destructor*

Pôde-se observar que o uso dos óleos essenciais testados promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) na mortalidade de abelhas em relação ao controle, em todas as concentrações testadas (Tabela 2).

TABELA 2: Número médio de mortalidade de *Varroa destructor*, *in vitro*, após seis horas de observação com óleos essenciais de arruda, hortelã, timol e eucalipto. Os resultados representam à média e os respectivos desvios-padrão.

Produtos	10μL	50μL	200μL
Controle	0,42 \pm 0,7a	0,58 \pm 0,60a	0,67 \pm 0,8a
Arruda	5,67 \pm 1,10b	6,92 \pm 1,4b	9,20 \pm 0,8b
Hortelã	5,75 \pm 0,9b	6,91 \pm 1,6b	9,50 \pm 0,6b
Timol	6,83 \pm 1,2b	9,42 \pm 0,8b	9,83 \pm 0,4b
Eucalipto	4,41 \pm 0,8b	6,83 \pm 1,1b	9,25 \pm 1,0b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre tratamentos e controle ($p < 0,05$).

3.3. Testes de campo

3.3.1. Infestação de varroa nas crias de abelhas operárias de *Apis mellifera*

Comparando-se o período antes e após a aplicação dos produtos, pôde-se verificar que os tratamentos com ácido oxálico (T2) e timol (T3) promoveram redução significativa ($p < 0,05$) no número de ácaros *Varroa destructor* em crias de abelhas operárias, na ordem de 89,0 e 67,1%, respectivamente. (Tabela 3).

Os tratamentos com arruda (T1), eucalipto (T4) e hortelã (T5) apresentaram redução do número de ácaro de 40,0; 30,0 e 66,6%, respectivamente, embora não tenha sido estatisticamente significativa. No grupo controle, a taxa de redução na mortalidade do ácaro foi de 5,6%. Pôde-se verificar ainda que a taxa de infestação pelo ácaro, antes da aplicação dos produtos, foi semelhante em todos os grupos (Tabela 3).

Com relação ao controle, verificou-se que os tratamentos com ácido oxálico e timol apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na taxa de infestação após o tratamento. Os demais tratamentos apresentaram redução no número de varroas em comparação com o controle, embora não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 3).

TABELA 3: Infestação (%) de *Varroa destructor* em cria de abelhas *Apis mellifera* africanizadas antes e após os tratamentos com arruda, ácido oxálico, timol, eucalipto e hortelã e a porcentagem de redução (%). Os resultados representam a média e os respectivos desvios-padrão de cinco colméias.

Produtos	Antes	Após	% Redução
Controle	11,96±8,9aA	9,61±3,3aA	19,6%
Arruda	9,03±5,6aA	5,43±4,4aA	40,0%
Ácido Oxálico	18,41±8,2aA	2,04±3,1bB	89,0%
Timol	17,50± 8,2aA	5,75±1,7bB	67,1%
Eucalipto	10,03±6,2aA	7,03±4,5aA	30,0%
Hortelã	21,83±14,3aA	7,29±6,3aA	66,6%

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3.3.2. Infestação de varroa em abelhas adultas

Comparando-se o período antes e após os tratamentos, pôde-se verificar redução na taxa de infestação do ácaro em abelhas adultas em todos os tratamentos testados. Entretanto, essa redução foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos tratamentos com arruda (T1), ácido oxálico (T2) e timol (T3), na ordem de 68,1%; 87,4% e 70,0%, respectivamente. Nos tratamentos controle, eucalipto (T4) e hortelã (T5), a redução foi de 6,8, 37,1 e 34,8%, respectivamente (Tabela 4).

Pôde-se verificar ainda que a taxa de infestação pelo ácaro, antes da aplicação dos produtos, foi semelhante em todos os grupos (Tabela 4). Entretanto, após a aplicação dos produtos, verificou-se que o tratamento com ácido oxálico apresentou redução significativa na taxa de infestação, em relação ao grupo controle. Os demais tratamentos reduziram a taxa de infestação em abelhas adultas, quando comparados ao controle, embora essa redução não tenha sido estatisticamente significativa (Tabela 4).

TABELA 4: Infestação (%) de *Varroa destructor* em abelhas adultas, antes e após os tratamentos com arruda, ácido oxálico, timol, eucalipto e hortelã e porcentagem de redução (%) da infestação. Os resultados representam a média e os respectivos desvios-padrão de cinco colméias.

Produtos	Antes	Após	% de Redução
Controle	6,92±3,14aA	6,45±1,54aA	6,8%
Arruda	10,34±4,40aA	3,29±3,46bA	68,1%
Ácido Oxálico	7,09±4,37aA	0,89±1,73bB	87,4%
Timol	9,84±3,49aA	2,96±4,17bA	70,0%
Eucalipto	7,64±4,34aA	4,8±2,18aA	37,1%
Hortelã	6,72±3,76aA	4,38±2,39aA	34,8%

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3.3.3. Mortalidade de cria de abelhas

Comparando-se os períodos antes e após a aplicação dos produtos, pôde-se constatar que em todos os tratamentos ocorreu redução significativa ($p < 0,05$) da mortalidade de crias de abelhas, com os seguintes valores em porcentagem: arruda (T1) de 83,3%; ácido oxálico (T2) de 92,1%; timol (T3) de 81,7%; eucalipto (T4) de 86,4% e hortelã (T5) de 81,3% (Tabela 5).

No grupo controle, verificou-se redução de mortalidade de 44,3%, embora não significativa. Entretanto, ao comparar os demais grupos com o controle, constatou-se que todos apresentaram maior redução na mortalidade de cria de abelha, embora não significativa (Tabela 5).

TABELA 5: Taxa de mortalidade de cria (%) de abelhas *Apis mellifera* antes e após o tratamento com arruda, ácido oxálico, timol, eucalipto e hortelã. Os resultados representam a média e os respectivos desvio-padrão de cinco colméias.

Produtos	Antes	Após	(%) Redução
Controle	35,21±16,73aA	19,61±15,18aA	44,3%
Arruda	33,17±10,09aA	5,53±4,57bA	83,3%
Ácido Oxálico	32,32±6,15aA	2,55±3,33bA	92,1%
Timol	31,43±3,35aA	5,75±1,73bA	81,7%
Eucalipto	51,67±36,02aA	7,03±0,77bA	86,4%
Hortelã	39,00±23,00aA	7,29±6,32bA	81,3%

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística antes e após o tratamento $p < 0,05$.

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

4. Discussão

4.1. Teste *in vitro*

Os óleos essenciais testados não tiveram efeito significativo na mortalidade das abelhas, em comparação com o controle. Isso mostra que esses produtos não apresentaram toxicidade, indicando que podem ser usados nas colméias.

Os resultados dos testes *in vitro* dos óleos essenciais nos ácaros *Varroa destructor* mostraram que todos os tratamentos que utilizaram dosagem igual ou superior a 10µL apresentaram mortalidade significativa do ácaro, de acordo com Martins et al. (1998) e Carvalho e Fonseca (2006). Os autores citam que esses produtos são formados por compostos naturais, como os monoterpenóides e arilpropanóides que servem a várias funções nas plantas, entre elas, a de defendê-las contra ataques de insetos, ácaros e patógenos, o que explicaria tal ação.

Ruiz et al. (1998), ao testarem *in vitro* o efeito dos óleos essenciais de arruda (*Ruta graveolens*, urtiga (*Urtiga dioica*) e menta (*Mentha piperita*) em *Apis mellifera* européias, constataram que arruda e menta apresentaram grande eficácia na mortalidade

do *Varroa destructor*. Segundo Calderone et al. (1997), os metabólicos secundários de algumas plantas como o mentol e o salacilato de metila são eficientes no controle do ácaro endoparasita *Acarapis woodi*, em abelhas *Apis mellifera* L. Entretanto, há ainda poucos trabalhos com os óleos essenciais, o que enfatiza a importância de estudos, no sentido de se verificar o seu efeito acaricida.

4.2. Testes de campo

Os resultados nos testes *in vitro* demonstraram o efeito acaricida dos óleos essenciais no *Varroa destructor*, indicando a necessidade desses produtos serem testados também em campo.

A taxa de infestação média de varroas nas crias de abelhas operárias, nos seis tratamentos, antes da aplicação dos produtos foi de 14,8%. Esse índice elevado de infestação nas crias pode estar relacionado ao período do ano. Na época em que foi realizado o experimento, devido à baixa temperatura e à falta de alimento, as rainhas reduziram a postura, acarretando a diminuição de crias na colônia. Desta forma, essas poucas crias tornaram-se as únicas disponíveis para as fêmeas do *Varroa destructor* parasitar, aumentando a frequência de crias contendo o ectoparasita e, conseqüentemente, elevando a taxa de infestação nas crias. Segundo Baker (1988), o nível de infestação da varroa depende do clima, do estágio fisiológico das abelhas, do ácaro e da presença de zangão na colméia.

Entre os produtos testados, o ácido oxálico foi o que apresentou melhor eficácia no controle da varroa. Este resultado também refletiu na redução da taxa de infestação e mortalidade nas crias de abelhas, na ordem de 89,0 e 92,1%, respectivamente demonstrando que esta diminuição é em decorrência da redução da população de ácaros nas colméias. Estes resultados positivos sugerem que a aplicação desse produto é uma alternativa eficiente no controle do ácaro varroa, quando aplicado em colônias no período com pouca ou sem cria.

Gregorc e Planic (2001) constataram a eficácia do ácido oxálico, alcançando média de 99,4% de mortalidade dos ácaros totais na colônia. Segundo os mesmos autores, o efeito do produto torna-se limitado quando as crias estão operculadas, uma vez que as fêmeas do ácaro permanecem 12 dias dentro das células com as crias até o seu desenvolvimento completo. Nessa fase de desenvolvimento da abelha, o opérculo

(camada de cera colocada pelas abelhas operárias para selar células de crias), protegeria a varroa, não permitindo, assim, o contato direto com os produtos aplicados para o seu controle. Desta forma, as varroas que estariam parasitando as larvas operculadas poderiam ficar protegidas, não tendo contato com o ácido oxálico. Entretanto, como foram realizadas, neste estudo, aplicações diretas do produto a cada sete dias, totalizando 21 dias, pôde-se inferir que grande parte das varroas entrou em contato com o produto, mesmo aquelas que estavam protegidas pelo opérculo na aplicação anterior. Assim, verificou-se que o uso de três aplicações, no mínimo, é uma importante prática de manejo para aumentar a eficácia de produtos acaricidas.

Deve-se considerar também outros fatores que fizeram com que a aplicação do ácido oxálico fosse mais eficiente: a média das temperaturas mínimas durante a fase experimental foi de 7,2^oC. Essas baixas temperaturas ocasionaram o agrupamento de grande quantidade de abelhas operárias a formar o “clusters” ao redor da cria para protegê-la das baixas temperaturas. Como o produto foi aplicado às 8h, ainda havia grande quantidade de abelhas presentes na colméia, favorecendo o contato direto com o produto.

Outro fator importante foi o estágio fisiológico das abelhas, pois a pequena quantidade de crias operculadas nessa época do ano fez com que a maior parte das fêmeas do *Varroa destructor* estivesse na fase forética, parasitando as abelhas adultas. Essas condições permitiram que elas estivessem mais expostas e vulneráveis à ação tóxica do produto. Vários autores enfatizam a importância da época correta do ano para fazer aplicação de acaricidas, visando a maior eficácia do produto. Gregorc e Planinc (2001), ao fazerem três aplicações de ácido oxálico, obtiveram eficácia de 39,2%, quando a colônia estava com cria nos favos; no entanto, quando estava sem cria, conseguiram 99,4% de mortalidade dos ácaros. Observação semelhante a essa foi verificada por Schulz (1984), que obteve melhores resultados quando aplicou esse produto em regiões de clima temperado, durante a ausência de cria nos meses de outono.

O timol também se mostrou eficaz na redução da taxa de infestação em abelhas adultas para 70,0%. Esses resultados sugerem que o controle efetivo da população de varroa em abelhas adultas terá como consequência a redução da taxa de mortalidade das crias de abelhas. Vários autores têm demonstrado que, entre os produtos alternativos no

combate ao ácaro *Varroa destructor*, o timol vem se destacando como acaricida eficaz (Imdorf *et al.*, 1995a; Higes *et al.*, 1996). Além desse resultado positivo, esses mesmos autores ressaltam a baixa toxicidade para as abelhas, quando manejado em doses adequadas, como outra característica favorável ao seu uso.

Mesmo que o timol seja volátil e se disperse uniformemente por toda a colméia, é provável que muitas fêmeas varroas que se encontravam parasitando as crias operculadas ficassem protegidas, não sendo expostas a níveis letais do produto. Flores *et al.* (1997) sugerem que a eficácia da aplicação do timol é maior se não existirem crias operculadas nas colméias, porque as varroas ficam protegidas dentro de células operculadas.

Outras formas de aplicação visando à lenta e constante liberação do timol foram testadas por Flores *et al.* (1997), utilizando-o diluído em azeite de oliva por 30 dias. Os autores alcançaram 97,0% de eficácia no controle da varroa. No presente trabalho, foram aplicados 10g de timol diluídos em 10mL de etanol, sendo que os resultados positivos desse tratamento foram de encontro aos de Pajuelo (2003). O autor verificou que esse produto, quando exposto à temperatura inferior a 15,0°C, apresentou volatilização parcial, não sendo eficaz no combate ao ácaro.

A mortalidade do ectoparasita pode ainda ser explicada pela ação tóxica desse produto nas varroas que estavam aderidas ao corpo das abelhas adultas. Também é possível que ele tenha mascarado a ação dos feromônios liberados pelas crias abertas antes de serem operculadas, dificultando a sua localização pelo ectoparasita, tornando-o mais exposto ao ataque das abelhas adultas por meio do comportamento denominado de “grooming”. Ele está associado à capacidade das abelhas operárias de atacarem as varroas, retirando-as do seu próprio corpo ou do corpo de uma abelha vizinha (Boecking e Descher, 1994). A aplicação do timol pode ter provocado irritação nas abelhas, aumentando o comportamento de grooming e, conseqüentemente, reduzindo a taxa de infestação nas abelhas adultas. Esses resultados concordam com os encontrados por Stanghellini e Raybold (2004) que verificaram um aumento nas taxas de remoção de ácaros pelas abelhas motivo pela aplicação de produtos, sendo o timol o principal componente.

Além de sua característica acaricida, Grobov *et al.* (1981) citam que é também um produto promissor no combate de infestações paralelas que surgem como

conseqüência do enfraquecimento de colônias devido à varroatose, como o controle do fungo *Ascospaera apis*, causador da doença Cria Giz (Colin *et al.*, 1990).

Entre os óleos essenciais, no presente trabalho, o de eucalipto apresentou o melhor resultado na redução de mortalidade de cria de abelhas. Isso pode estar relacionado à substância citronela que tem ação acaricida e inseticida, sendo um dos principais componentes do óleo de algumas espécies de *Eucalyptus* sp. (Prates *et al.*, 1998). Os mesmos autores constataram o efeito inseticida e acaricida de óleos essenciais de eucalipto cuja ação está relacionada possivelmente a substâncias secundárias como o eucaliptol e a citronela. A ação acaricida do óleo essencial de hortelã (*Mentha piperita* L) pode estar relacionada à presença do mentol, pois é o principal componente volátil identificado, variando entre 33 a 60%.

Esta mortalidade nos tratamentos com óleos essenciais talvez esteja vinculada ao possível efeito indireto destes sobre os ácaros, além da ação acaricida. Segundo Kraus *et al.* (1994), como o olfato é o principal fator de reconhecimento de abelhas adultas pelas varroas, é possível que, a exemplo do timol, os demais óleos essenciais causem alterações na orientação olfatória das varroas pelas crias e abelhas adultas e, dessa forma, estejam mais exposta e veneráveis ao ataque das abelhas.

Os resultados obtidos na mortalidade de varroas nas colônias tratadas com óleo essencial de arruda foram significativos, concordando com os encontrados por Flores (2000), ao realizarem testes experimentais em laboratório. Os autores obtiveram 94,8% de mortalidade em 24 horas, constatando a sua eficiência como acaricida. Ruiz *et al.* (1998), ao fazerem testes *in vitro* com o *Varroa destructor*, verificaram que o óleo de arruda em doses de 0,1 mL foi capaz de matar 100,0% dos ácaros.

Quanto ao grupo controle, mesmo não sendo aplicado nenhum produto, observou-se redução da mortalidade de cria em 44,3%, embora não tenha sido estatisticamente significativa, comparando-se o período antes e após a aplicação dos produtos. Essa diminuição pode estar relacionada ao comportamento higiênico das colméias, que é a habilidade genética das abelhas de detectar, desopercular e remover crias mortas, doentes ou com ácaro dentro de suas células de cria para fora da colônia. Este comportamento é uma defesa natural das abelhas, principalmente contra doenças de crias (Spivak e Gilliam, 1993), além de ser um mecanismo de defesa que atua contra a população do ácaro *Varroa destructor* (Spivak e Reuter, 2001). Marques *et al.* (2000),

em estudo de coleta da varroa em colméias de abelhas africanizadas, observaram que várias partes do corpo dos ácaros estavam mutiladas, indicando ataque das abelhas adultas devido ao comportamento de “grooming”.

Outra possibilidade é que a mortalidade de crias e de abelhas adultas não seja exclusivamente da ação direta dos ácaros e, sim, de outros patógenos no local do experimento que tenham como vetor o *Varroa destructor*. Recentemente, após relatos de perdas de colméias no Uruguai por razões desconhecidas, Antúnez *et al.* (2006) constataram a presença de quatro tipos de vírus nas amostras de abelhas. Os autores relacionaram as perdas de colônias com a presença do ácaro *Varroa destructor* como vetores desses vírus, configurando o primeiro relato da presença do patógeno na América do Sul. No Brasil, ainda não foi constatada a sua presença; entretanto, como a prática da apicultura migratória é comum na divisa do Estado do Rio Grande do Sul com o Uruguai, há um grande risco de introdução dessa enfermidade em território nacional.

Com a aplicação do acaricida no presente trabalho, ocorreu diminuição da população do parasita e, conseqüentemente, uma redução nos sintomas da enfermidade. Estes resultados indicam que o controle do vetor *Varroa destructor* é de extrema importância para a manutenção da sanidade das colméias, evitando a introdução de novas doenças. Segundo Castagnino *et al.* (2006), algumas formas de atenuar a dispersão de doenças é a revisão periódica nas áreas de cria, reconhecimento de sintomas das doenças, cuidado na prática da apicultura migratória para regiões onde houve constatação de doença e seleção genética de colméias mais resistentes para prevenir novas enfermidades.

O apicultor não deve utilizar produtos sintéticos para o controle de quaisquer doenças, sob o risco de contaminar o mel e a cera, ocasionando resistência aos patógenos. Os manejos de controle do ácaro *Varroa destructor* somente se justificam em áreas com risco de introdução de doenças, tendo a varroa como vetor. Dessa forma, a diminuição da população do ácaro iria, conseqüentemente, reduzir a carga de patógenos sobre as abelhas.

5. Conclusões

- Pôde-se concluir que o uso dos óleos essenciais (arruda, eucalipto, hortelã, timol) e do ácido oxálico são eficientes na redução da mortalidade de crias de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas) parasitadas com o ectoparasita *Varroa destructor*.
- O ácido oxálico e timol promoveram redução significativa na infestação de varroas nas crias de abelhas, e o ácido oxálico foi eficiente na redução da infestação do *Varroa destructor* em abelhas adultas e nas colméias de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas.
- Indicam-se fazer três aplicações de acaricida para o controle do *Varroa destructor*, quando existir pouca cria operculada na colônia e pelo período mínimo de 12 dias.

6. Referências Bibliográficas

- ANDERSON, D.; TRUEMAN, J. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more one species. **Experimental Applied Acarology**, v.24, p.165-89, 2002.
- ANTÚNEZ, K. et al. Honeybee viruses in Uruguay. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 93, p. 67–70, 2006.
- BAGGIO, A. et al. Field trials with different thymolbased products for the control of varroosis. **American Bee Journal.**, Hamilton, v. 140, p.898-900, 2004.
- BAKER, M.D. Variability and biotype of *Varroa jacobsoni* Oudemans. **American Bee Journal**. Hamilton, v.128, p.590-93, 1988.
- BOECKING, O.; DRESCHER, W. Rating of signals which trigger *Apis mellifera* L. bees to remove mite-infested brood, **Apidologie**, v.25, p.459-61, 1994.
- CALDERONE, N.W.; SPIVAK, M.A. Plant extracts for control of parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Tarsondemidae) in colonies of the western honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal Economic Entomology**, v.88, p.1211-15, 1995.
- CALDERONE, N.W. et al. Plant extracts used for control of the parasitic mites *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) and *Acarapis woodi* (Acari: Tarsonemidae) in colonies of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Journal Economic Entomology**, v.90, p.1080-6, 1997.
- CARVALHO, C.C.R.; FONSECA, M.M.R. Carvone: why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemica**, v.95, p.413–22, 2006.

- CASTAGNINO, G.L.B. et al. Doença Cria Giz *Ascospaera apis* (Maassen ex Claussen) Olive & Spiltoir em abelhas *Apis mellifera* L. na Depressão Central do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n.6, p.1909-11, 2006.
- COLIN, M.E. Essential oils of Labiatae for controlling honey bee varroosis. **Journal Applied Entomology**, v.110, p.19-25, 1990.
- DE JONG, D. et al. Weight loss and other damages developing worker honeybees from infestation with *Varroa jacobsoni*. **Journal Apicultural Research**, Cardiff, v.21, p.165-167, 1982.
- DE JONG, D.; MANTILLA, Y.C. *Varroa jacobsoni*. **Informe sobre biología, diagnóstico y evaluación de infestaciones**. FMRP-USP, Brasil. Mimeo. p. 8, 1986.
- DELFINADO, M.D. Mites of the honeybees in South – East Asia. **Journal Apicultural Research**, Cardiff, v.2, p.113-114, 1963.
- DELFINADO, M.D.; BAKER, E.W. Varroidae, a new family of mites on honeybees (Mesostigmata: Acarina). **Journal of Washington Academy of Sciences**, Washington, v. 64, n. 1, p. 4-10, 1974.
- FARMACOPEIA italiana. 10. Ed. Roma: Instituto Poligrafico e Zecco dello Stato, 1998. v.6, p.206-210.
- FLORES, J.M., et al. Control de varroosis. Investigaciones sobre tratamientos alternativos en el Sur de España. **Vida Apícola**, Córdoba, v. 84, p.45-49, 1997.
- FLORES, J.M., et al. Situación actual y perspectivas de los tratamientos en el control de *Varroa jacobsoni* Oud. en Andalucía. **Vida Apícola**, Córdoba, v. 104, p.27-31, 2000.
- GONÇALVES, L.S. et al. Estudo sobre o ácaro parasita de abelhas *Varroa jacobsoni*. I. Grau de infestação em apiários do Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA E III LATINO IBERO-AMERICANO DE APICULTURA, 5, Viçosa, 1981. Anais...Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1981. CD-ROM.
- GREGORC, A.; PLANINC, I. Acaricidal effect of oxalic acid in honeybee (*Apis mellifera*) colonies. **Apidologie**, v.32, p.333-340, 2001.
- GREGORC, A.; PLANINC, I. The control of *Varroa destructor* using oxalic acid. **Vet. Journal**, Hamilton, v. 163, p.306-310, 2002.

- GREGORC, A.; POKLUKAR, J. Rotenone and oxalic acid as alternative acaricidal treatments for *Varroa destructor* in honeybee colonies, **Veterinary Parasitology**, v.111, p.351–360, 2003.
- GROBOV O.F. et al. Le thymol, substance à spectre large d`activité. **Apiacta**, v.16, p.64- 65, 1981.
- GUPTA, G.A. *Varroa jacobsoni* a mite pest of *Apis indica*. **Bee World**, v.48, n.1, p.17-18, 1961.
- HIGES, M. Ensayo de campo de la eficacia del Apivar y la rotenona en el control de la varroosis de la abeja de miel. **Apiacta**, v.34, p.33-38, 1999.
- HIGES, M. et al. Ensayo de la eficacia del Bayvarol contra la varroosis de la abeja melífera (*Apis mellifera*) en presencia de cría. **Vida Apícola**, v.75, p.39-43, 1996.
- IMDORF, A. et al. Apilife Var: a new varroacide with thymol as the main ingredient. **Bee Wrold**, v.76, p.77-83, 1995b.
- IMDORF, A. et al. Toxizitat von thymol, capher, menthol und eucaliptol auf *Varroa jacobsoni* Oud und *Apis mellifera* L. im labortest. **Apidologie**. v.26, p.27-31, 1995a.
- KRAUS, B. et al. Screening of substances for their effect on *Varroa jacobsoni*: attractiveness, repellency, toxicity and masking effects of etheral oils. **Journal Apiculture Research**, Cardiff, v. 33, p.34-43, 1994.
- LINDBERG, C. et al. Laboratory evaluation of miticides to control *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae), a Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) parasite. **Journal Economic Entomology**., v.93, n.2, p.189-198, 2000.
- MARQUES, M.H. et al. Classification and quantification of damaged *Varroa destructor* found in the debris of honey bee colonies as a criterion for selection? **American Bee Journal**, Hamilton, v.140, p.820-824, 2000.
- MARTINS, A.P. et al. Essential oils from four Piper species. **Phytochemistry**, v.49, n.2019-2023, 1998.
- MONTIEL, J.C.; PIOLA, G.A. A new enemy of bees. In: **Varroosis, a honeybee disease**. Bucharest: Apimondia Publishing House, 1976. p.36-37.
- MUTINELLI, F. et al. A scientific note on oxalic acid by topical application for the control of varroosis. **Apidologie**, v.28, p.461-62, 1997.
- PAJUELO, A. Timol para o controle de *Varroa jacobsoni* nas abelhas melíferas. **O Apicultor**, v. 40, p.17-20, 2003.

- PRATES, H.T. et al. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal Stored Products Research**, v.34, p.243-249, 1998.
- RUIZ, J.A. et al. Eficacia de plantas medicinales contra *Varroa jacobsoni* Oud. en laboratorio una alternativa para el mundo rural del tercer milenio. **Vida Apícola**, v. 96. p.513-519, 1998.
- SALISBURY, F.B.; ROSS, C.W. **Plant physiology**. Belmont: 1992. (CA), Wadsworth, p.682.
- SAS INSTITUTE. **Sas/Stat. 2001. Users Guide Statistics**. 6 Ed. Cary, NC. 2: 943p.
- SCHULZ, A.E. Reproduction and population dynamics of the parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud and its dependence of the brood cycle of its host *Apis mellifera* L. **Apidologie**, Paris, v. 15, p. 401- 20, 1984.
- SPIVAK, M.; GILLIAM, M. Facultative expression of behaviour of honey bees in relation to disease resistance. **J.Apic.Res.**, v. 32, p.147-157, 1993.
- SPIVAK, M.; REUTER, G. *Varroa destructor* infestation in untreated honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies selected for hygienic behavior. **J. Econ. Entomol.** v. 9, p.326-331, 2001.
- STANGHELLINI, M.S.; RAYBOLD, P. Evaluation of selected biopesticides for the late fall control of varroa mites in a northern temperate climate. **ABJ**, v.144, n.6, p.475, 2004. Disponível em: <http://www.mitegone.com/forms/Dr%20M%20Stanghellini%20Report%20Edited.pdf>. Acessado em 12 fev. 2008.

CAPÍTULO 3

**ÉSTER DE SACAROSE NO CONTROLE DO ÁCARO *Varroa destructor* EM
ABELHAS *Apis mellifera* L. (AFRICANIZADAS)**

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do éster de sacarose no controle da infestação do ácaro *Varroa destructor* em abelhas *Apis mellifera* africanizadas. Foram realizados testes *in vitro* para testar o efeito desse produto sobre as abelhas, utilizando cinco diferentes concentrações diluídas em água destilada. Com auxílio de uma pipeta automática, foram depositados sobre o tórax de 20 abelhas 10 μ L, 50 μ L e 200 μ L, segundo cada tratamento: T0: 100% de água destilada; T1: 0,5%; T2: 1%; T3: 2,0%; T4: 5% e T5: 10% de éster de sacarose. As abelhas foram observadas por 6 horas e quantificadas as mortalidades em decorrência do efeito de cada tratamento. Foram realizados testes *in vitro* nos ácaros, utilizando as mesmas concentrações e quantidades testadas nas abelhas. Seis ácaros foram colocados em placas de Petri contendo papel filtro de 8,5cm de diâmetro, umedecido com 0,5 mL de solução de éster de sacarose, segundo a concentração de cada tratamento. A cada 60 minutos, pelo período de seis horas, os ácaros foram observados com o auxílio de uma lupa e verificado se apresentavam alguma mobilidade. Realizou-se ainda o experimento de campo no apiário da Área de Produção do Setor de Apicultura da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições, totalizando 28 colônias, sendo sete delas como controle, sete com 0,1% de éster de sacarose, sete com 0,2% de éster de sacarose e sete colméias com 0,5% éster de sacarose. Todas as concentrações foram diluídas em água. Nos testes *in vitro* com concentração de 0,5%, o éster de sacarose promoveu a mortalidade dos ácaros e das abelhas. Os testes em campo demonstraram que o produto reduziu a infestação do *Varroa destructor* em abelhas na concentração de 0,2% e pode ser uma ferramenta no controle dessa praga. Nas concentrações de 0,1, 0,2, e 0,5%, não prejudicou o desenvolvimento de área de cria aberta, operculada e de alimento estocado na colméia, sugerindo que não é tóxico para as abelhas.

Palavras-chave: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, bioacaricida, éster de sacarose.

SUCROSE ESTER ON THE MITE *Varroa destructor* CONTROL IN BEE *Apis mellifera* L. (AFRICANIZED)

Abstract: This study aimed to determine the effect of sucrose ester in controlling the infestation of the mite *Varroa destructor* in *Apis mellifera* africanized bees. *In vitro* tests were conducted to verify the effect of this product on bees, using five different concentrations diluted in distilled water. Using a pipette automatic, were deposited on the chest of 20 bees 10 μ L, 50 μ L and 200 μ L, according to each treatment: T0: 100% distilled water; T1: 0.5%; T2: 1%, T3: 2.0 %; T4: 5%; T5: 10% and T6: 100% of sucrose ester. The bees were observed for six hours and quantified the mortalities due to the effect of each treatment. *In vitro* tests were conducted in mites, using the same quantities and concentrations tested on bees. Six mites were placed in Petri dishes containing filter paper of 8.5 cm in diameter, moistened with 0.5 mL of solution of sucrose ester, according to the concentration of each treatment. Every 60 minutes, for six hours, the mites were observed using a magnifying glass and checked if had some mobility. Was conducted an experiment of field in the apiary of area of production sector of Beekeeping of Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus of Botucatu. The experimental design was completely randomized, with four treatments and seven repetitions, totaling 28 colonies of bees, and seven of them as control, seven with 0.1% of sucrose ester, seven with 0.2% of sucrose ester and seven beehives with 0.5% sucrose ester. All concentrations have been diluted in water. 0.5% of the sucrose ester promoted the death of the mites and bees. The tests in the field showed that the product have an acaricide effect with concentrations above of 0.2% and can be a tool in the control of this pest. At concentrations of 0.1, 0.2, and 0.5% it did not impair the development of the area, brood open and close and food stored in the hive, suggesting that it is not toxic to bees.

Keywords: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, bioacaricide, sucrose ester.

1. Introdução

A varroatose é uma parasitose causada pelo ácaro *Varroa destructor*, que afeta tanto as crias como as abelhas adultas. Esta praga foi introduzida no Brasil em 1972 por meio da importação de rainhas e crias infestadas vindas do Paraguai, sendo descrita pela primeira vez em 1978, no Estado de São Paulo (Alves *et al.* 1979). A varroatose se dispersou para as demais regiões, sendo hoje encontrada em todo o país (Moretto *et al.*, 1991).

O ciclo reprodutivo da varroa começa quando as fêmeas adultas abandonam operárias e zangões adultos e invadem células de crias de operárias ou zangões para realizarem a postura (Boot *et al.*, 1994b). Nessa fase, a cria encontra-se no seu último estágio larval (De Jong, 1997). Segundo Boot *et al.* (1994a), o número de varroa na colméia está relacionado à estação do ano e à disponibilidade de cria de abelhas na colméia.

Os danos que os ácaros causam dependem do nível de infestação da colônia; entre os principais sintomas estão a redução no peso e na longevidade das operárias e zangões, comprometendo a população do enxame (De Jong e Gonçalves, 1998). Existem ainda casos em que a infestação acarreta má-formação em diversos órgãos como asas, pernas, abdômen e tórax (De Jong *et al.*, 1982b) e redução da viabilidade de cria (Akkratanakul e Burgett, 1975). Segundo Ball e Allen (1988), o ácaro pode servir como vetor ao transmitir bactérias e vírus pela sucção da hemolinfa e ocasionar várias doenças.

Para minimizar os efeitos da infestação da varroa em abelhas *Apis mellifera*, vários acaricidas foram desenvolvidos. Entretanto, os produtos químicos não têm obtido sucesso em erradicar a praga. Ao contrário, há relatos de desenvolvimento de resistência a certos acaricidas usados contra a varroa além da possibilidade desses produtos contaminarem o mel e a cera (Boot *et al.*, 1995).

Desta forma, pesquisas têm sido feitas na busca de novas estratégias para combater a varroatose, por meio do uso de óleos essenciais e controle biológico, como a produção de zangões e a sua eliminação durante a fase de pupa (Imdorf *et al.*, 1996). Hoje, com o mercado de produtos apícolas orgânicos em ascensão, tais produtos são importante ferramenta no combate à praga, pois, além de apresentarem controle

eficiente e de baixo custo, não deixam resíduo nos produtos apícolas, assegurando a sua qualidade.

O éster de sacarose é um biopesticida que vem se destacando no combate de insetos e de ácaros que atacam culturas e grãos. Composto originalmente isolado das folhas de tabaco (*Nicotiana* sp) tem sido utilizado, por muitos anos, no controle de algumas pragas agrícolas devido a sua atividade inseticida (Michaud e Mckenzie 2004). Pertence à classe moderna de inseticida biológico formado por compostos produzidos pela reação de sacarose com ácidos graxos aromáticos (Puterka *et al.*, 2003). O princípio ativo com atividade inseticida foi aprovado pela Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos (EPA) para ser comercializado para os apicultores como biopesticida no controle do ácaro *Varroa destructor* (EPA, 2007).

A maioria das pesquisas com o éster de sacarose para o controle do *Varroa destructor* tem sido realizada na Europa e nos Estados Unidos, locais que empregam modelos de colméias e possuem condições ambientais diferentes das brasileiras. Entretanto, o éster de sacarose ainda não foi utilizado no Brasil para o controle do ectoparasita *Varroa destructor*, podendo esse produto se tornar útil para a apicultura nacional.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo verificar o efeito do éster de sacarose em diferentes concentrações no controle da infestação do ácaro *Varroa destructor* em colônias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas.

2. Material e Métodos

2.1. Local do experimento

O experimento foi realizado na Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Produção Animal, na Área de Produção de Apicultura, Campus de Botucatu, no período de 17 de julho a 14 de agosto de 2006, com as seguintes coordenadas geográficas: 22°49' de latitude Sul e 48°24' de longitude Oeste, com clima Cfa e altitude média de 623 metros. As temperaturas registradas no local durante o experimento variaram entre 9,4⁰C a 30,8⁰C, sendo que a média das temperaturas mínimas foi de 14,9⁰C e a máxima de 26,2⁰C.

2.2. Testes realizados

2.2.1. Testes *in vitro* do éster de sacarose em varroas

Para verificar o efeito *in vitro* do éster de sacarose¹ nos ácaros *Varroa destructor*, foram utilizados os seguintes tratamentos: T0: água pura; T1: 0,5%; T2: 1,0%; T3: 2,0%; T4: 5,0% e T5: 10% de éster de sacarose.

Seis ácaros *Varroa destructor* foram colocados em placas de Petri contendo papel filtro de 8,5 cm de diâmetro, umedecido com 0,5mL de solução de éster de sacarose, segundo a concentração de cada tratamento, totalizando 120 ácaros. A cada 60 minutos, durante o período de seis horas, os ácaros foram observados com o auxílio de um microscópio ótico e verificado se apresentavam alguma mobilidade. Foram considerados mortos os ácaros que permaneceram imóveis e não apresentaram movimentos nas patas quando tocadas com a pinça. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

2.2.2. Testes *in vitro* do éster de sacarose em abelhas adultas

Para verificar se o éster de sacarose apresentava algum efeito sobre as abelhas *Apis mellifera* africanizadas, foram preparados, com auxílio de proveta de 10mL e becker de vidro, cinco diferentes concentrações do produto diluídas em água destilada: T0: 100% de água destilada; T1: 0,5%; T2: 1%; T3: 2,0%; T4:5% e T5:10% de éster de sacarose. Após, as soluções foram agitadas vigorosamente por um minuto e deixadas em repouso por 12 horas.

Aproximadamente 100 abelhas foram retiradas de um quadro do centro da colméia, colocadas em um pote plástico e levadas ao freezer a -18⁰C por 3 minutos, para serem anestesiadas. Vinte abelhas foram retiradas do pote e, com auxílio de micropipeta eletrônica, foram aplicados 10µL da solução de éster de sacarose de cada tratamento sobre o tórax das abelhas. Estas foram transferidas para uma gaiola telada (10x20cm) e foram observadas a cada duas horas, pelo período total de seis horas. Para obtenção da taxa de mortalidade, foram consideradas mortas as abelhas que permaneceram imóveis e não apresentaram movimentos nas patas quando tocadas com a pinça. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.

41 _____

¹ As amostras de éster de sacarose foram cedidas pelo Departamento Fitossanitário da Universidade Estadual Paulista, campus São José do Rio Preto.

2.2.3. Teste de campo

Foram selecionadas 28 colméias de abelhas *Apis mellifera* africanizadas, alojadas em colméias modelo Langstroth e os ninhos padronizados quanto ao número de quadros de cria e alimento. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e sete repetições totalizando 28 colônias de abelhas africanizadas, distribuídas da seguinte forma: sete colméias como controle (T0), sete com 0,1% de éster de sacarose (T1), sete com 0,2% de éster de sacarose (T2) e sete com 0,5% éster de sacarose (T3). Todas as concentrações foram diluídas em água.

2.3. Modo de aplicação dos produtos

Para o preparo das soluções dos tratamentos T1, T2 e T3, foram adicionados 1mL, 2mL e 5mL de éster de sacarose diluídos, respectivamente, em 1 litro de água destilada (v/v). Após o preparo das soluções, estas foram armazenadas à temperatura ambiente até o momento do uso. Nas colônias do tratamento T0, foi aplicada somente água destilada.

A aplicação foi realizada no período da manhã, às 9h30min, por meio de pulverizador portátil, com aproximadamente 5mL da solução em cada um dos lados dos favos, com abelhas aderentes. A cada sete dias, uma nova quantidade foi aplicada nas colônias, perfazendo o total de três aplicações em 14 dias.

2.4. Infestação de varroa em abelhas adultas antes e após o tratamento

Antes e após a aplicação do éster de sacarose, a taxa de infestação de varroa em abelhas adultas de cada colméia foi determinada por meio da remoção de aproximadamente 200 abelhas adultas de um quadro central das colônias. Estas foram transferidas para copos plásticos individualizados, contendo uma mistura de álcool/água, na proporção de 1:3. A contagem de abelhas e de varroa foram realizadas, determinando-se o nível de infestação por colônia, segundo a técnica descrita por De Jong e Mantilla (1986).

2.5. Mortalidade de varroas nas colméias antes e durante o tratamento

Antes da aplicação do éster de sacarose, foi colocada, no fundo de cada colméia, uma cartolina de cor branca e, sobre ela, uma armação de madeira com tela mosquiteira de 2mm de abertura, para evitar que as abelhas removessem as varroas mortas (Calderone e Spivak, 1995). A cada dois dias, as cartolinas foram retiradas para a contagem das varroas mortas, obtendo-se, assim, a taxa de mortalidade nas colméias.

Durante a aplicação dos produtos, a cada três dias, foram removidas as cartolinas de cada colônia para a mensuração da quantidade de varroas mortas aderidas sobre elas. A contagem foi pelo período de 14 dias, totalizando sete coletas.

2.6. Cria aberta, operculada e alimento estocado

Antes e após a aplicação do éster de sacarose nas colméias, foi quantificado o número de quadros contendo cria aberta, operculada e alimento estocado para se verificar o efeito do éster de sacarose no desenvolvimento das colméias.

2.7. Análise estatística

Para os testes *in vitro* foi utilizada Análise de Variância seguido do teste de Kruskal-Wallis e análise de regressão linear. Para os testes de campo foi utilizada Análise de Variância seguido do teste de Kruskal-Wallis para verificar diferença entre as médias dos tratamentos para os períodos antes e após a aplicação dos produtos. Para a comparação dos dados coletados antes e após a aplicação de cada tratamento foi utilizado o teste “t” de Student pareado. Foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 5\%$ de probabilidade (Sas, 2001).

3. Resultados

3.1. Teste *in vitro* de éster de sacarose em varroas

Verificou-se que, nas concentrações testadas, o éster de sacarose promoveu aumento significativo ($p < 0,05$) na mortalidade dos ácaros *Varroa destructor*, em comparação com o controle (Tabela 1).

TABELA 1: Número médio de mortalidade de *Varroa destructor*, *in vitro*, em concentrações de éster de sacarose. Os resultados representam a média, os respectivos desvio-padrão e as porcentagens de mortalidade em seis horas.

ÉSTER DE SACAROSE (%)	ÁCAROS MORTOS	MORTALIDADE (%)
T0- Controle	0,2±0,5a	4,2%
T1- 0,5%	5,2±0,9b	87,5%
T2- 1%	6,0±0,0b	100%
T3- 2%	6,0±0,0b	100%
T4- 5%	6,0±0,0b	100%
T5- 10%	6,0±0,0b	100%

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

3.2. Teste *in vitro* de éster de sacarose em abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas)

Pôde-se verificar que todas as concentrações de éster de sacarose testadas promoveram mortalidade significativamente ($p < 0,05$) maior de abelhas adultas em comparação com o controle, sendo este efeito dependente da dose utilizada (Tabela 2).

TABELA 2: Número médio de mortalidade de abelhas *Apis mellifera* adulta *in vitro*, em concentrações de éster de sacarose. Os resultados representam a média, os respectivos desvio-padrão e as porcentagens de mortalidade em seis horas.

ÉSTER DE SACAROSE (%)	ABELHAS MORTAS	MORTALIDADE (%)
T0-Controle	8,83±1,0a	44,2
T1- 0,5%	14,0±0,9b	70,0
T2- 1%	17,2±1,3b	86,0
T3- 2%	18,5±1,4b	92,5
T4- 5%	19,5±1,2b	97,5
T5- 10%	19,7±0,5b	98,5

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

3.3. Testes de campo

3.3.1. Infestação de varroa em abelhas adultas

Pôde-se verificar que a taxa de infestação de varroa em abelhas adultas, antes e depois da aplicação do éster de sacarose, não apresentou diferença estatística no tratamento controle (Tabela 3). Verificou-se, neste trabalho, que o tratamento com 0,1% de éster de sacarose não teve efeito significativo na mortalidade dos ácaros, embora tenha reduzido em 32,0% a taxa de infestação em abelhas adultas. As aplicações do éster de sacarose, nas concentrações de 0,2% e 0,5%, reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) a infestação do ácaro, na ordem de 47,5% e 55,5%, respectivamente (Tabela 3).

TABELA 3: Infestação de *Varroa destructor* em abelhas adultas antes e depois do tratamento com éster de sacarose e porcentagem (%) de redução de infestação. Os resultados representam a média, os respectivos desvios-padrão e as porcentagens de redução do ácaro em abelhas adultas.

ÉSTER DE SACAROSE (%)	Antes	Depois	% de Redução
Controle	9,245±5,9aA	9,29±4,37Aa	0,5
0,1%	11,31±3,28aA	7,69±4,25aA	32,0
0,2%	12,48±4,76aA	6,54±3,03bA	47,5
0,5%	12,91±6,19aA	5,74±4,78bA	55,5

Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).
Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3.3.2. Mortalidade de varroas nas colméias antes e após a aplicação do éster de sacarose

Pôde-se verificar, para todos os grupos, que não houve diferença significativa entre as médias, para os períodos antes e depois dos tratamentos. Comparando-se as médias da mortalidade natural de varroas, antes da aplicação, verificou-se que não houve diferença estatística entre os grupos. No entanto, depois da aplicação do éster de sacarose, constatou-se redução significativa ($p < 0,05$) na mortalidade de varroas para os tratamentos com 0,1%, 0,2% e 0,5% de éster de sacarose, em relação ao grupo controle (Tabela 4).

TABELA 4: Número médio de ácaros *Varroa destructor* mortos nas colméias, para o período antes e após a aplicação de éster de sacarose. Os resultados representam a média, os respectivos desvio-padrão e as porcentagens de mortalidade dos ácaros *Varroa destructor* encontrados nas colméias.

Período	ÉSTER DE SACAROSE (%)			
	Controle	0,1%	0,2%	0,5%
Antes	48,0±23,5Aa	32,1±20,7Aa	43,7±38,3Aa	29,6±10,3Aa
Depois	69,8 ±48,7Aa	37,8±27,8Ab	43,7±41,4Ab	27,4±19,3Ab

Letras minúsculas diferentes, na linha, indicam diferença estatística entre as médias ($P < 0,05$).
Letras maiúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença estatística entre os tratamentos ($P < 0,05$).

3.3.3. Cria aberta, operculada e alimento estocado

Pôde-se verificar que não houve diferença significativa para o número de quadros de área de cria aberta, operculada e alimento, quando comparado o período antes e depois para todos os tratamentos, com exceção do tratamento com 0,2% de éster de sacarose para a cria operculada (Tabela 5). No entanto, pôde-se observar que houve aumento para cria operculada em todos os tratamentos com éster de sacarose, embora não significativo (Tabela 5).

TABELA 5: Número de quadros de cria aberta, operculada e alimento estocado em colméias antes e depois da aplicação de éster de sacarose. Os resultados representam a média, os respectivos desvio-padrão e a média de números de quadros.

Éster de sacarose (%)	Cria Aberta		Cria Operculada		Alimento	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Controle	1,67±0,3a	2,5±1,4a	1,83±0,9a	2,75±1,2a	2,83±1,2a	2,25±1,0a
0,1%	2,25±0,5a	1,75±1,4a	1,92±1,1a	2,83±0,7a	2,42±3,0a	2,17±1,2a
0,2%	2,08±1,2a	2,0±1,4a	1,33±0,7a	3,58±0,6b	2,33±1,0a	2,92±1,4a
0,5%	2,58±0,7a	2,58±1,3a	1,67±0,7a	2,08±2,0a	2,0±0,6a	2,58±2,8a

Letras minúsculas diferentes, na linha, indicam diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$).

4. Discussão

Apesar de pesquisas sobre o éster de sacarose serem recentes e com poucos experimentos voltados para o controle do *Varroa destructor*, a sua eficácia no combate a algumas pragas agrícolas já tem sido comprovada (Liu e Stansly, 1995; Neal *et al.*, 1994). Essa constatação é semelhante à encontrada no presente trabalho. O ensaio *in vitro* indica que, em todos os tratamentos em que se utilizou o éster de sacarose, foi significativa a mortalidade dos ácaros quando comparada com o grupo controle. A mortalidade no tratamento T1 demonstra a ação do produto mesmo quando aplicado em baixa concentração, sugerindo a atuação do éster de sacarose nesses organismos, a partir de 0,5% de concentração. Nos testes em campo, comparando o período antes e após a

aplicação, as concentrações de 0,2% e 0,5% atuaram na redução da infestação do ácaro em abelhas adultas, sugerindo que 0,2% ou concentrações maiores têm ação acaricida.

Os resultados obtidos nos dois experimentos demonstram que o éster de sacarose foi eficaz no controle do *Varroa destructor*, o que indica o efeito acaricida do produto, sendo semelhante aos verificados por Sheppard *et al.* (2003) ao estudarem o efeito do éster de sacarose em abelhas européias nos Estados Unidos. Os autores observaram média de 68,0% de mortalidade de varroa, quando aplicada uma solução de 0,25% de concentração de éster de sacarose diretamente nos favos com abelhas sob a forma spray. Neal *et al.* (1994) utilizaram o mesmo produto no controle de ácaros que atacam culturas agrícolas, verificando que o éster de sacarose foi eficiente, o que garante a sua viabilidade no combate aos ácaros. Pesquisas também apontam a sua ação no controle de insetos (Michaud e McKenzie, 2004; Liu e Stansly, 1995). Já a ausência de mortalidade de varroas de modo significativo, no tratamento com 0,1% de éster de sacarose, pode ser explicada devido à baixa concentração do produto aplicado nas colméias, evidenciando a sua ineficácia quando usado em concentrações muito baixa.

A não diferença estatística da mortalidade de varroas coletadas nas cartolinas, quando comparado o período antes com o após o tratamento, pode ser devido à mortalidade de varroas ocorrida fora da colméia. Isso significa que grande parte das varroas estava na fase forética, aderida ao corpo das abelhas adultas. Ao se desprenderem do corpo das abelhas ao longo do dia, a cartolina não pôde reter os ácaros para serem quantificados.

Segundo Puterka *et al.* (2003), apesar da ação do éster de sacarose na morte de insetos ainda não ser totalmente esclarecida, as causas podem estar relacionadas à desidratação do organismo por meio da remoção da camada protetora da cutícula e pela obstrução nos espiráculos respiratórios. Nos casos dos ácaros, esse produto pode causar os mesmos danos fisiológicos que ocorrem nos insetos. Além da ação acaricida verificada no experimento, segundo Boscolo e Feres (2007), o éster de sacarose tem ação tópica, agindo apenas na estrutura do exoesqueleto, impedindo que esses organismos desenvolvam resistência contra esse tipo de biopesticida, enquanto os similares sintéticos têm ação sistêmica, interferindo no funcionamento das células dos animais.

Comparando o período antes com o depois da aplicação, observou-se, no tratamento controle, um aumento do número de ácaros retidos nas cartolinas, o que pode ser explicado pelo uso de água destilada nas aplicações, substância inerte, sem nenhuma ação acaricida, que permitiu o aumento populacional dos parasitas nessas colméias. Outro fator pode estar relacionado à elevação da temperatura na região. Durante o experimento, a máxima foi de 26,2^oC, devido à proximidade do final do inverno, o que possibilitou o aumento de crias de abelhas e, conseqüentemente, da população de varroas, corroborando com a constatação de Baker (1988). Segundo o autor, o nível de infestação da varroa está relacionado à estação do ano e à disponibilidade de cria na colméia.

O tratamento 0,2% de éster de sacarose apresentou aumento significativo na ordem de 62,8% na área de cria operculada, quando comparado o período antes com após a aplicação. Esse fato pode estar relacionado à redução significativa de infestação de varroas em abelhas adultas nos tratamentos em que houve aplicação de 0,2% e 0,5% de éster de sacarose e, conseqüentemente, aumento de quadros de alimento estocado, embora não significativo. Isso evidencia que manejos de controle de colméias com alta infestação de *Varroa destructor* favorecem o desenvolvimento populacional de abelhas campeiras, disponibilizando-as para coleta de alimento e, conseqüentemente, aumentando o número de quadros de alimento estocado na colméia.

5. Conclusões

- Os testes *in vitro* demonstraram que aplicações com concentrações a partir de 0,5% de éster de sacarose promoveram a mortalidade do ácaro *Varroa destructor* em abelhas *Apis mellifera* africanizadas.
- Os testes em campo demonstraram que o éster de sacarose apresenta efeito acaricida para o ácaro *Varroa destructor* a partir de concentrações de 0,2% e pode ser uma ferramenta no controle dessa praga.
- Os testes em campo demonstraram que as concentrações utilizadas de éster de sacarose testadas não prejudicam o desenvolvimento de área de cria aberta, cria operculada e alimento estocado na colméia.

6. Referências Bibliográficas

AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AO MEIO AMBIENTE DOS ESTADOS UNIDOS (EPA). Disponível em:

http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_035300.pdf

Document 035300. Washington, DC, USA. Acessado em: 29 out. 2007.

AKRATANAKUL, P.; BURGETT, M. *Varroa jacobsoni*: a prospective pest of honeybee in many parts of the world. **Bee World**, v.56, n. 3. p.119-21, 1975.

ALVES, S.B. et al. *Varroa jacobsoni* Oudemans, 1904, (Acari, Mesostigmata, Varroidae) also in Brazil. **Ecossistema**, v.3, p.78-9, 1979.

BALL, B.V.; ALLEN, M.F. The prevalence of pathogen in honeybee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*. **Annuary Applied Biology**, v.113, n.2, p.237-44, 1988.

BAKER, M.D. Variability and biotype of *Varroa jacobsoni* Oudemans. **American Bee Journal**, Hamilton, v. 128, p.590-93, 1988.

BOOT, J. et al. Factors affecting invasion of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) into honeybee, *Apis mellifera* (hymenoptera: Apidae), brood cells. **Bulletin Entomology Research**. v. 84, p.3-10, 1994a.

BOOT, J. et al. Behavior of varroa mites invading bee brood cells. **Experimental & Applied Acarology**, v.18, p.371-79, 1994b.

BOOT, J. et al. Why do *varroa mites* invade worker brood cells of the honey bee despite lower reproductive success. **Behaviour Ecology Sociobiology**, v.36, p.283-289, 1995.

BOSCOLO, M; FERES, R.J. (2007). Um pesticida à base de açúcar e óleo de soja. **Jornal UNESP**. 2005 - Ano XIX - nº 203. Disponível em: <http://www.ibilce.unesp.br/destaques/120206.php>. Acessado em: 19 dez. 2007.

CALDERONE, N.W.; SPIVAK, M.A. Plant extracts for control of parasitic mite *Varroa jacobsoni* (Acari: Tarsondemidae) in colonies of the western honey bee (Hymenoptera: Apidae). **Journal Economic Entomology**, v. 88, p.1211-15, 1995.

DE JONG, D. et al. Mite pests of honey bees. **Annuary Review Entomology**, v. 27, p.229-52, 1982.

- DE JONG, D.; MANTILLA, Y.C. *Varroa jacobsoni*. **Informe sobre biología, diagnóstico y evaluación de infestaciones**. FMRP-USP, Brasil. Mimeo. p.8, 1986.
- DE JONG, D. Mites: varroa and other parasites of brood. In: MORSE, R. A; FLOTTUM, K. (Ed.), **Honey bee pest, predators and diseases**. 1997. p.279-328. The A.I. Root Company, OH.
- DE JONG, D.; GONÇALVES, L.S. The africanized bees of Brazil have become tolerant to varroa. **Apiacta**, v. 33, p. 65-70, 1998.
- IMDORF, A. et al. Alternative Varroa control. **American Bee Journal**., v. 135, p.189-193, 1996.
- LIU, T.X.; STANSLY, P.A. Toxicity and repellency of some biorational insecticides to *Bemisia argentifolii* on tomato plants. **Entomology Experimental Applied**, v.74, p.137-143, 1995.
- MICHAUD, J.P.; MCKENZIE, C.L. Safety of a novel insecticide, sucrose octanoate, to beneficial insects. **Florida Entomology**, v.87, p.6-9, 2004.
- MORETTO, G. et al. Africanized honey bees are more efficient at removing *Varroa jacobsoni* preliminary data. **American Bee Journal**, p.434, 1991.
- NEAL JR., J.W. et al. Novel sucrose esters from mite *Varroa jacobsoni* Oud. In several districts of Lombardy (Italy). **Apidologie**, v.26, p.67- 72, 1994.
- PUTERKA, G.J. et al. Structure-function relationships affecting the insecticidal and miticidal activities of sugar esters. **Journal Economic Entomology**, v.96, p.636-644, 2003.
- SAS INSTITUTE. Sas/Stat. 2001. **Users Guide Statistics**. 6 ed. Cary, NC. 2: 943p.
- SHEPPARD, W.S. et al. Use of sucrose octanoate esters to control the parasitic honey bee mite *Varroa destructor*. **American Bee Journal**, v.143, p.982-985, 2003.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

O uso intensivo de acaricidas sintéticos, na tentativa de minimizar os efeitos da infestação do *Varroa destructor*, promove o desenvolvimento de resistência nas populações do ácaro, além de ocasionar a contaminação dos produtos das abelhas. Além disso, o *Varroa destructor* também pode atuar como vetor de patógenos como vírus, fungos, bactérias e nosema; desta forma, o controle do ácaro com produtos naturais (timol, ácido oxálico, óleos essenciais de arruda, eucalipto, hortelã e o éster de sacarose) pode representar uma ferramenta a ser utilizada para evitar os riscos de dispersão ou introdução de novas enfermidades apícolas em áreas com alta taxa de infestação de varroas. Doenças apícolas podem estar relacionadas à presença do ácaro varroa nas colônias de abelhas *Apis mellifera*, justificando o seu controle nos locais de risco sem o uso de acaricidas sintéticos. Desta forma, a elaboração de novas alternativas de combate às doenças e pragas, dentre as quais, o controle de do ácaro *Varroa destructor* por meio de produtos naturais, é de extrema importância para a apicultura nacional e mundial.

Para as condições ambientais em que foram testados os produtos, sugere-se o uso do ácido oxálico e do óleo essencial timol (*Thymus vulgaris*) no controle da infestação do ácaro *Varroa destructor* em colônias de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas.