



## Avaliação *in vitro* da eficácia do óleo essencial do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) no combate a varroase em *Apis mellifera* L.

### *In vitro* evaluation of essential oil effectiveness of Alecrim Pimenta (*Lippia sidoides*) in against varroase on *Apis mellifera* L.

Stephano Bismark Lopes Cavalcante Moreira<sup>1\*</sup>, Michelle de Oliveira Guimarães-Brasil<sup>2</sup>, João Paulo de Holanda-Neto<sup>3</sup>, Márcio Cleivo de Moraes Souza<sup>4</sup>, Eduardo Alves de Souza<sup>5</sup>

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de análise *in vitro*, o potencial acaricida do óleo essencial extraído de folhas da planta do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) na mortalidade de *Apis mellifera* e do ácaro *Varroa destructor*, parasita destas abelhas. A extração do óleo essencial foi realizada através o método de SOXHLET. Os ácaros foram retirados com auxílio de uma pinça de células de zangões infestadas, enquanto que as abelhas foram coletadas em recipientes de boca larga nos quadros do ninho das colmeias, ambos provenientes do apiário do IFRN. Os ácaros foram transferidos para uma placa de petri e as abelhas para gaiolas de observação, ambos contendo em seu interior uma esponja com área média de 1cm<sup>2</sup> contendo os volumes T<sub>0</sub> 0µL, T<sub>1</sub> 100µL e T<sub>2</sub> 200µL de óleos essenciais, sendo cada volume um ensaio. As abelhas e os ácaros foram observados por seis horas para a quantificação da mortalidade em função dos tratamentos utilizados. As quantidades de volumes não influenciaram na mortalidade do hospedeiro e do parasita, mesmo assim apresentou uma morte gradual do ácaro, que variou de 5,69±2,21 a 19,90±3,10, correspondente ao T<sub>0</sub> e T<sub>2</sub>, respectivamente. A *A. mellifera* apresentou uma variação de 0,00±0,00 a 2,03±1,41, correspondente ao T<sub>0</sub> e T<sub>1</sub>. Ademais, ao colocarmos em confronto, mesmo não havendo relação à morte de ambos com os volumes (Chi<sup>2</sup> = 2,03; p = 0,329; gl = 2), podemos observar que o óleo essencial de alecrim pimenta pode ser uma viável estratégia no controle a disseminação do ectoparasita.

**Palavras-chaves:** *Varroa destructor*. Ácaro. Abelha Africanizada.

**Abstract:** The aim of this study was at evaluating the acaricide potential of the essential oil extracted from the leaves of Rosemary Pepper (*Lippia sidoides*) concerned to the mortality of the bees *Apis mellifera* and the mite *Varroa destructor*, parasite of such bees, through the analysis *in vitro*. The extraction of the essential oil was accomplished through the method known as SOXHLET. The mites were removed with tweezers infested with drone cells, while the bees were placed in wide-mouth containers in the nest hives, both from the apiary of the Federal Institute of Rio Grande do Norte. The mites were transferred to a petri dish and the bees for observation cages, both containing a sponge inside with the average area of 1cm<sup>2</sup> containing the volumes T<sub>0</sub> 0µL, T<sub>1</sub> 100µL and T<sub>2</sub> 200µL of essential oils, and each volume an essay. The mites and bees were observed for six hours for the quantification of mortality in relation to the treatments used. The quantities of volumes did not affect the mortality of the host and the parasite, still presented a gradual death mite, which varied from 5,69±2,21 to 19,90±3,10, related to T<sub>0</sub> and T<sub>2</sub>, respectively. The *Apis mellifera* showed a variation from 0,00±0,00 to 2,03±1,41, related to T<sub>0</sub> and T<sub>1</sub>. Besides, putting into confrontation, even without regard to the death of both the volumes (Chi<sup>2</sup> = 2,03; p = 0,329; gl = 2), we can see that the essential oil of rosemary pepper can be a viable strategy to control the spread of ectoparasites.

**Key-words:** *Varroa destructor*. Mite. Africanized bee.

\*Autor para correspondência;

Recebido para publicação em 02/02/2016; aprovado em 07/03/2016

<sup>1</sup>Técnico em Apicultura, Instituto Federal do Rio Grande do Norte; E-mail: bismark971@hotmail.com

<sup>2</sup>Engenheira Agrônoma, Universidade Federal do Ceará; Mestre e Doutora em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará; Docente do Instituto Federal do Rio Grande do Norte; E-mail: michelle.guimaraes@ifrn.edu.br

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, Universidade Federal Rural do Semi-Árido; Mestre em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará; Ph.D. em Zootecnia, Queen's University Belfast (Reino Unido); Docente do Instituto Federal Sertão Pernambucano; E-mail: jpholandaneto@gmail.com

<sup>4</sup>Licenciado em Química, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte; Especialista em Engenharia do Petróleo, Universidade de Fortaleza; Mestre em Ciências Naturais, Universidade Estadual do Rio Grande do Norte; Docente do Instituto Federal do Rio Grande do Norte; E-mail: márcio.souza@ifrn.edu.br

<sup>5</sup>Técnico em Apicultura, Instituto Federal do Rio Grande do Norte; Graduando em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba; E-mail: eduardo-braz97@hotmail.com



## INTRODUÇÃO

A abelha africanizada, existente hoje nas Américas, é um polihíbrido resultante do cruzamento da *Apis mellifera scutellata*, raça de abelha africana, oriunda das savanas do continente africano, com várias outras raças de *Apis mellifera* europeias, introduzidas no país desde o século XIX (WIESE, 2005).

O processo permitiu o surgimento de um híbrido de característica predominante da abelha africana, com uma maior rusticidade, facilidade ao enxamear (OLIVEIRA; CUNHA, 2005) e resistente a doenças (ALMEIDA; LORENZON; TASSINARI, 2013). Isto permitiu que a abelha conseguisse conviver de uma forma mais harmônica com algumas patologias. Dentre os ataques de diversos inimigos naturais e de doenças apícolas, as mais comuns são: o ácaro *Varroa destructor*, *Nosema* sp., loque americana (*Panibacillus larvae*), cria giz (*Ascophora apis*), entre outras, que podem causar o declínio na população, diminuindo a produção da colmeia (CAP, 2007).

Atualmente, os ácaros são considerados uma das maiores pragas das abelhas *Apis mellifera* L., com ênfase para o ácaro *Varroa destructor*, um dos maiores causadores de danos às abelhas africanizadas (TURCATTO et al., 2012).

A onipresença do ácaro *Varroa* vem causando sérios danos à apicultura mundial (MONTIEL; PIOLA, 1976; DE JONG; GONÇALVES; MORSE, 1984), uma vez que ele se aloja no hospedeiro, pode se tornar um agente transmissor de vírus (BAKONYI et al., 2002; CHEN et al., 2004; TENTCHEVA et al., 2006). No Brasil, já há registro do vírus SBV, cria ensacada (*Sacbrood Virus*) (FREIBERG et al., 2012), bem como um grande índice de infestação em diferentes regiões do país por intermédio desse ácaro (PEGARARO et al., 2000; FOGAÇA et al., 2012). Nos últimos anos, as taxas de infestações vêm aumentando gradativamente e, em algumas regiões brasileiras, já se assemelham aos altos índices observados na Europa (CARNEIRO et al., 2007).

Deste modo, entra-se em divergência com a literatura de Kaiser (2014), a qual justifica que a abelha africanizada possui, naturalmente, um comportamento higiênico elevado, procurando eliminar de si e de suas companheiras, este tipo de invasor.

Na tentativa de combater a infestação causada por este parasita, países que apresentam índice de infestação alarmante, a exemplo de Portugal, já desenvolveram produtos que auxiliam na queda do parasita em abelhas adultas, dentre os quais podemos citar o API LIFE VAR, PERIZIN E APISTAN (WIESE, 2005).

Porém, muitos destes produtos influenciam na qualidade dos produtos apícolas. Uma medida eficaz ao problema relatado seria a minimização da utilização de fibras sintéticas nas colônias e o aumento na utilização de ácidos orgânicos ou óleos essenciais (WALLNER, 1999). Pois além de ter um grande potencial no combate ao varroase, tem um fator importante: não causa prejuízos ambientais nem mesmo ao manipulador (ISMAN, 2000). Por conseguinte, mais de 150 óleos essenciais ou seus componentes já foram testados para controlar o ácaro *Varroa* (ARIANA; EBADI; TAHMASEBI, 2002). No entanto, existe uma grande carência de estudos sobre a utilização de óleos essenciais de plantas brasileiras no combate a esta patologia apícola, principalmente na Caatinga,

para qual foram desenvolvidas poucas pesquisas sobre o potencial acaricida das plantas deste bioma.

Dessa forma, a presente pesquisa se propôs estudar o *Lippia sidoides*, que é uma planta nativa do nordeste brasileiro e do norte de Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2008), popularmente conhecida como alecrim pimenta, alecrim bravo e alecrim do nordeste (COSTA, 2006) e que há muito tempo tem seu uso associado à medicina popular, dada as características desta espécie nas atividades biológicas e terapêuticas, justificado pelo seu potencial bioativo, úteis nos tratamentos de combate a patologias do homem e do animal (SOARES; TAVARES-DIAS, 2013). O óleo essencial (OE) oriundo de suas folhas possui propriedades químicas ricas em timol e carvacrol, substâncias que agregam importância à planta pela comprovação científica farmacológica (MELO et al., 2011).

As propriedades químicas do óleo essencial do alecrim pimenta vêm sendo testadas em vários estudos. Costa et al. (2005), ao observar o comportamento biológico de larvas *Aedes aegypti* em decorrência da presença do OE do alecrim pimenta registra a mortalidade de 100% das larvas em período de apenas 10 minutos de tratamento. Albuquerque et al. (2013) diagnosticaram em sua pesquisa, sobre o efeito anti-aderente de *Lippia sidoides* contra microrganismos do biofilme dental, a efetividade na inibição de aderência das bactérias e do efeito antiaderente de microrganismos responsáveis pela consolidação do biofilme dental.

Nessa perspectiva, o presente estudo visou avaliar por meio de análise *in vitro* o potencial acaricida do óleo essencial do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) no combate a varroase em abelhas *Apis mellifera* L..

## MATERIAL E MÉTODOS

### Localização do experimento

Esta pesquisa foi conduzida nos meses de novembro e dezembro de 2015, nos laboratórios de Biologia e Química Orgânica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte (IFRN) – Campus Pau dos Ferros, no apiário didático do IFRN (06°08'43.5''S e 038°12'11.5''W), e no município de Jaguaruana, Ceará (04° 50' 02''S e 37° 46' 52''W).

### Obtenção do óleo essencial

A coleta da biomassa foi realizada em uma área produtiva de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), da fazenda Agropaulo Agroindustrial, no dia 19 de novembro, no município de Jaguaruana, Ceará, localizado na região do semiárido nordestino.

Na área de cultivo foram coletadas folhas frescas da planta alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) com o auxílio de uma tesoura de jardinagem, que logo em seguida, foram expostas em uma tela de sombrite, em condição ambiente, durante quatro dias. Após a secagem as folhas foram acondicionadas em sacolas plásticas devidamente etiquetadas, e posteriormente encaminhadas para Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte.

A extração do óleo essencial foi realizada no laboratório de Química Orgânica do IFRN – Campus Pau dos Ferros, fazendo-se o uso do método SOXHLET com metodologia adaptada devido às condições laboratoriais em que foi

utilizado o equipamento de extrator de óleos e graxas (MARCONI MA 044/8/50). Neste, foi preparado um sachê com um papel filtro contendo 10g da biomassa, devidamente lacrado. Em seguida foi adicionado 50 mL de hexano no frasco extrator, a temperatura de 100°C, ao longo de duas horas.

Em continuidade, foi levado para o evaporador rotativo (IKA RV 05 Basic), aquecido à temperatura de 68°C, no intuito de separar o óleo essencial do solvente (hexano). Após 13 repetições do processo obteve-se a quantidade necessária para esta pesquisa.

#### Avaliação *in vitro* com o ácaro *Varroa destructor*

Os ácaros foram coletados das colmeias do apiário didático do IFRN, localizado no município de Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte, das quais foram retirados pedaços de quadros de crias, especialmente na área que continham células de zangões. Após a coleta, os favos foram conduzidos para o laboratório de Biologia do IFRN, e com o auxílio de uma pinça, as pupas de zangões foram retiradas das células no intuito de coletar os ácaros.

Para a realização de cada tratamento foi utilizada uma placa de petri devidamente tampada, na qual foram colocados em média nove ácaros *Varroa*, alguns zangões e pupas, para o parasita alimentar-se da hemolinfa, evitando, assim, morte espontânea por falta de alimento. A espera do parasita, estava uma esponja com dimensão de 1 cm<sup>2</sup>, na qual foi adicionado o óleo essencial com o auxílio de uma micropipeta graduada, com diferentes volumes para os diferentes tratamentos T<sub>0</sub> 0μL, T<sub>1</sub> 100μL e T<sub>2</sub> 200μL. Foram realizadas cinco repetições para cada tratamento, totalizando 135 ácaros, em média.

Para realização do monitoramento de mortalidade, os ácaros foram observados por seis horas em condições semelhantes a da colmeia, controlada na câmara incubadora para Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD), em 35,4°C. Após o período determinado, foram considerados mortos os ácaros que após serem tocados por uma pinça permaneceram imóveis.

#### Avaliação *in vitro* com a abelha *Apis mellifera* L.

As abelhas foram coletadas dos quadros centrais de colmeias do apiário didático do IFRN com o auxílio de um recipiente de boca larga. Após a coleta, as abelhas foram conduzidas ao laboratório de Biologia e colocadas no freezer,

no intervalo de um a cinco minutos, para serem anestesiadas, deste modo, ficariam mais fáceis de manuseá-las.

Em seguida, foram transferidas em média 26 abelhas operárias para gaiolas de observação (20 x 10 cm), com tela milimétrica nas laterais e tampa de vidro na parte superior, que continha no seu interior uma esponja com dimensão em média de 1 cm<sup>2</sup>. Com o auxílio de uma micropipeta graduada foi colocado o óleo essencial nas mesmas quantidades de volumes utilizado para avaliação *in vitro* no ácaro *Varroa*: T<sub>0</sub> 0μL, T<sub>1</sub> 100μL e T<sub>2</sub> 200μL. Foram realizadas cinco repetições, totalizando 130 abelhas, em média, para cada tratamento. As abelhas foram observadas por seis horas em condições manipuladas semelhantes as da colmeia (luminosidade e temperatura) na câmara incubadora para BOD em 35,4°C, realizando o monitoramento de mortalidade em decorrência a cada tratamento. No vencimento do tempo determinado foram consideradas abelhas mortas àquelas que após serem tocadas com uma pinça permaneceram imóveis.

#### Análise estatística

Os dados de mortalidade de abelhas e ácaros foram representados por estatística descritiva (média e desvio padrão). Para verificar se a quantidade de volume do óleo essencial afeta o número de mortes de abelhas e ácaros foram utilizados os testes de Fisher e Qui-quadrado com nível de significância de 5%, respectivamente. O teste de Fisher foi utilizado devido aos valores menores que cinco nas ocorrências de mortes de abelhas em cada tratamento (ZAR, 1999).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### Identificação parcial da mortalidade do ácaro e abelha na presença do óleo essencial do alecrim pimenta

O teste estatístico Qui-quadrado utilizado para verificar a associação entre os tratamentos e o número de mortes (em abelhas e ácaros) mostrou que não houve associação entre os tratamentos e o número de mortes de abelhas (Chi<sup>2</sup> = 2,03; p = 0,329; gl = 2). Embora se tenha encontrado um aumento da mortalidade de ácaros com o aumento de volume do óleo essencial do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*), o teste estatístico indicou que não houve associação entre as quantidades de volumes do produto e o número de mortes de ácaros (Chi<sup>2</sup> = 2,71; p = 0,258; gl = 2) (Tabela 01).

**Tabela 1.** Número médio de abelhas *Apis mellifera* e de ácaros *Varroa destructor* (± desvio padrão) mortos, *in vitro*, após seis horas na presença de óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*).

Tratamento	Mortalidade (μ ± σ)		Tamanho amostral (n)	
	Abelhas	Ácaros	Abelhas	Ácaros
T <sub>0</sub> (controle)	0,00±0,00	5,69±2,21	129	41
T <sub>1</sub> (100 μL)	2,03±1,41	9,73±2,76	128	45
T <sub>2</sub> (200 μL)	1,01±0,99	19,90±3,10	128	42

Fonte: elaborado pelos autores.

Pascoal (2012), estudando a aplicação de tratamentos combinados de Apistan® + Thymovar® em colmeias de *Apis mellifera*, em Portugal, obteve um valor de 91,2% de eficácia na mortalidade dos ácaros, demonstrando ser esse valor muito mais eficiente quando comparados com os dados desse

estudo. No entanto, deve-se levar em consideração que nestes medicamentos foi feita uma seleção de substâncias acaricidas e não apenas uma extração de óleos essenciais de uma planta. Além disso, o teste desse autor foi realizado no campo, com

um maior universo amostral, apresentando-se em vantagem quando comparado com avaliação *in vitro*.

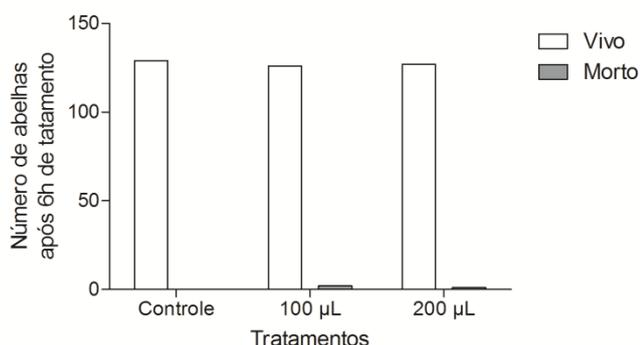
Ao testar óleos essenciais extraídos de diferentes plantas no comportamento *in vitro* do ácaro *Varroa*, Vieira-Costa, Andrade e Nascimento (2012) verificaram que na medida de 200 µL os óleos essenciais de anis, eucalipto e cravo apresentam uma média de mortalidade do ácaro de  $9,25 \pm 0,96$ ,  $9,25 \pm 0,50$  e  $8,75 \pm 1,26$ , respectivamente, dados parecidos com o encontrado no volume de 100 µL deste estudo. Demonstrando, assim, que o óleo essencial do alecrim pimenta quantifica maior mortalidade em menor quantidade de volume.

Do mesmo modo, ao colocarmos em detrimento com os dados observados por Castagnino, Orsi e Funari (2009), no que tangencia sobre a mortalidade da *Apis* em avaliação *in vitro* na presença de éster de sacarose, é possível observar um comportamento diferente da abelha que apresentou uma maior mortalidade que variou de  $8,83 \pm 1,0$  a  $19,7 \pm 0,5$ , quando comparados nas concentrações de controle (0%) e T5 (10%), respectivamente. Já nos resultados encontrados na presença do composto químico do alecrim pimenta, verificamos uma menor mortalidade que variou de  $0,00 \pm 0,00$  a  $2,03 \pm 1,41$ , referente ao controle e ao volume de 100 µL, demonstrando, assim, que é válida a utilização do mesmo, por causar menor mortalidade se comparados a éster de sacarose.

#### Comportamento da abelha *Apis mellifera* L. na presença do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*)

A Figura 1 mostra que as diferentes quantidades de volumes do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) testadas não tiveram efeito significativo na mortalidade das abelhas. Demonstrando que esse produto, nas condições testadas (seis horas), não apresentou toxicidade para as abelhas, indicando que o mesmo pode vir a ser utilizado em colônias de abelhas *Apis mellifera*.

**Figura 1.** Número de abelhas (vivas e mortas) após seis horas de observação nos respectivos tratamentos.



Fonte: elaborado pelos autores.

Nos resultados deste estudo também foi possível verificar que as abelhas não apresentaram comportamentos anormais na presença do OE do *Lippia sidoides*. Comportamento este visto em alguns trabalhos sobre avaliações *in vitro* com operárias de *Apis mellifera* na presença de produtos de constituição química diferente. Demonstrando que, quando as abelhas são submetidas a presença de tiametoxam e metidationa, por exemplo, logo nos

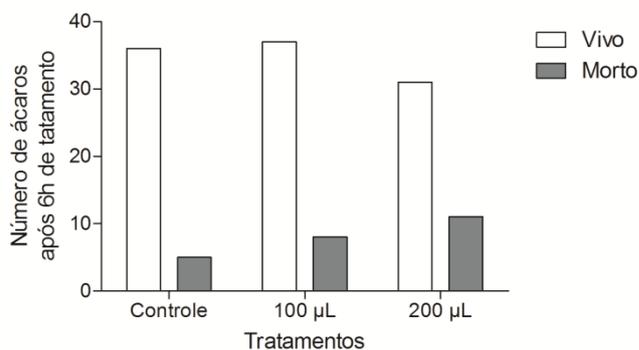
primeiros momentos de aplicação apresentam um comportamento de distúrbios de coordenação motora, incapacidade de voo e prostração e após nove horas de exposição apresentaram quase 100% de mortalidade (COSTA et al., 2005; CARVALHO et al., 2009).

Ademais, nesta pesquisa, as abelhas apresentaram maior mortalidade no T1 100 µL, menor volume, como é possível observar na Figura 1, apesar de ambos os tratamentos estarem submetidos em mesmas condições, e até mesmo o universo amostral muito semelhante, nos leva a acreditar que o tempo vitalício do inseto pode ter sido influenciado pelas condições de transporte, recipiente para gaiola, podendo ter machucado alguma parte do corpo, não visível na hora, mas que interferiu na longevidade. Contudo, a pouca mortalidade de abelhas foi um fenômeno verificado em diversos outros estudos (CASTAGNINO, 2008; DAMIANI et al., 2009; PINO et al., 2011; VIEIRA-COSTA; ANDRADE; NASCIMENTO 2012).

#### Comportamento do ácaro *Varroa destructor* na presença do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*)

A Figura 2 mostra que as diferentes quantidades de volumes do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) testadas apresentaram um quantitativo de mortalidade significativa, em detrimento ao controle. Apresentando-se uma morte progressiva em relação aos volumes utilizados, porém no nosso estudo não apresenta, estatisticamente, uma relação significativa entre os tratamentos.

**Figura 2.** Número de ácaros (vivos e mortos) após 6h de observação nos respectivos tratamentos.



Fonte: elaborado pelos autores.

Em seu estudo, Vilas-Boas (2008) afirmou que para o controle da infestação por ácaro *Varroa* são recomendados os princípios ativos dos óleos essenciais de Cânfora, Eucalipto, Mentol e Timol. Nessa perspectiva, Costa et al. (2005) verificaram a presença de 43,5% do componente de timol, além de outras substâncias acaricidas como o β-Cariofileno (9,7%) (CRAVEIRO et al., 1981) no OE do alecrim pimenta, assim, podendo indicar a eficácia deste óleo.

Porém, no campo, a aplicação do timol apresenta-se eficiência na primavera, ocasionando maior mortalidade, contabilizado pela queda natural. No outono não influencia, independente da concentração, sinônimo do comportamento sanitário do inseto (VILAS-BOAS, 2007).

Entretanto, é possível verificar que o óleo essencial do alecrim pimenta apresenta-se com potencialidade para o combate ao ácaro, contudo, deve-se observar por um período

mais longo, já que estatisticamente os volumes utilizados nesta pesquisa não influenciam a mortalidade do parasita.

## CONCLUSÕES

As análises *in vitro* demonstraram que o óleo essencial do alecrim pimenta apresentou uma mortalidade significativa progressiva do ácaro *Varroa destructor*, simultaneamente, uma menor mortalidade das abelhas *Apis mellifera* L., porém, a mortalidade não está ligada a quantidade de volume usado do composto químico natural.

Em virtude dos fatos mencionados, o óleo essencial do alecrim pimenta (*Lippia sidoides*) se apresenta como promessa para utilização na forma de acaricida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, A. C. L.; PEREIRA, M. S. V.; SILVA, D. F.; PEREIRA, L. F.; VIANA, F. A. C.; HIGINO, J. S.; BARBOSA, M. R. V. The anti-adherence effect of *Lippia sidoides* Cham: extract against microorganisms of dental biofilm. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 41-46, 2013.

ALMEIDA, C. T.; LORENZON, M. C. A.; TASSINARI, W. S. Identificação de fatores associados à ocorrência de doenças de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) em apiários do estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2013.

ARIANA, A.; EBADI, R.; TAHMASEBI, G. Laboratory evaluation of some plant essences to control *Varroa destructor* (Acari: *Varroidae*). *Experimental and Applied Acarology*, v. 27, n. 4, p. 319-327, 2002.

BAKONYI, T.; FARKAS, R.; SZENDROI, A.; DOBOS-KOVÁCS, M.; RUSVAI, M. Detection of acute bee paralysis virus by RT-PCR in honey bee and *Varroa destructor* field samples: rapid screening of representative Hungarian apiaries. *Apidologie*, Les Ulis, v. 33, n. 1, p. 63-74, 2002.

CAP. Departamento Técnico (Portugal) (Org.). Manual de sanidade apícola: Sintomas – Profilaxia - Controlo. Portugal: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2007. 36 p.

CARNEIRO, F. E.; TORRES, R. R.; ATRAPAZZON, R.; RAMÍREZ, S. A.; GUERRA-JÚNIOR, J. C. V.; KOLING, D. F.; MORETTO, G. Changes in the reproductive ability of the mite *Varroa destructor* (Anderson e Trueman) in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae) colonies in Southern Brazil. *Neotropical Entomology*, Londrina, v. 36, n. 6, p. 949-952, 2007.

CARVALHO, S. M.; CARVALHO, G. A.; CARVALHO, C. F.; BUENO-FILHO, J. S. S.; BAPTISTA, A. P. M. Toxicidade de acaricidas/inseticidas empregados na citricultura para a abelha africanizada *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE). *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 4, p.597-606, out./dez. 2009.

CASTAGNINO, G. Produtos naturais no controle do ácaro *varroa destructor* em abelhas *Apis mellifera* L.

(africanizadas). 2008. 53f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2008.

CASTAGNINO, G. L.; ORSI, R. O.; FUNARI, S. R. C. Éster de sacarose no controle do *Varroa destructor* em abelhas africanizadas. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, Maringá, v. 31, n. 3, p.287-293, 2009.

CHEN, Y.; PETTIS, J. S.; EVANS, J. D.; KRAMER, M.; FELDLAUFER, M. F. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Apidologie*, Les Ulis, v. 35, n. 4, p. 441- 448, 2004.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 304-309, out./dez. 2005.

COSTA, A. S. Sustentabilidade da Produção de Alecrimpimenta (*Lippia sidoides* Cham.): Micropropagação visando a conservação *in vitro*. 2006. 56f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2006.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: Edições UFC, 1981. 210 p.

DAMIANI, N.; GENDE, L. B.; BAILAC, P.; MARCANGELI, J. A.; EQUARAS, M. J. Acaricidal and insecticidal activity of essential oils on *Varroa destructor* (Acari: *Varroidae*) and *Apis mellifera* (Hymenoptera: *Apidae*). *Parasitology Research*, v. 106, n. 1, p. 145-152, 2009.

DE-JONG, D.; GONÇALVES, L. S.; MORSE, R. A., Dependence of climate on the virulence of *Varroa jacobsoni*. *Bee World*, v.65, n.3, p.117-121, 1984.

FOGAÇA, M. J.; MORAIS, A. L.; PAULA, R.; MODRO, A. F. H.; MAIA, E. Infestação de *Varroa Destructor* em colmeias de abelhas africanizadas em Novo Horizonte do Oeste - RO. *Revista Brasileira de Ciências da Amazônia*, Brasil, v. 1, n. 1, p. 59-63, 2012.

FREIBERG, M.; DE-JONG, D.; MESSAGE, D.; COX-FOSTER, D. First report of sacbrood virus in honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, Ribeirão Preto, v. 11, n. 3, 2012.

KAISER, T. Níveis de infestação por *Varroa destructor* e comportamento higiênico em colmeias de *Apis mellifera* no Município de Marechal Cândido Rondon. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 27., 2014, Vitoria. Anais. Vitoria: UFES, 2014. p. 1-3.

MELO, M. T. P; CARVALHO-JÚNIOR, W. G. O.; SOUZA, M. F.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Produção de fitomassa e teor de óleo essencial de folhas de alecrim-

- pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em diferentes espaçamentos de plantio. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.13, n. 2, p. 230-234, 2011.
- MONTIEL, J. C.; PIOLA, G. A. Varroasis, a honeybee disease. Bucharest: Apimondia, p. 36-37, 1976.
- OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A. Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? Acta Amazonica, Manaus, v. 35, n. 3, 2005.
- OLIVEIRA, G. L.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R.; COSTA, C. A. Enraizamento de estacas de *Lippia sidoides* Cham. utilizando diferentes tipos de estacas, substratos e concentrações do ácido indolbutírico. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v. 10, n. 4, p. 12-17, 2008.
- PASCOAL, M. A. Avaliação da eficácia de nova estratégia de combate à varrose da abelha (*Apis mellifera*) em Portugal: Tratamento combinado de acaricidas homologados. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.
- PEGORARO, A.; MAEQUES, E. M.; NETO, A. C.; COSTA, E. C. Infestação natural de *Varroa Jacobsoni* em *Apis mellifera scutellata* (HYMENOPTERA: APIDAE). Archives of Veterinary Science, Brasil, v. 5, n. 1, p. 89-93, 2000.
- PINO, O; SÁNCHEZ, Y.; RODRÍGUES, H.; CORREA, T. M.; DEMEDIO, J.; SANABRIA, J. L. Caracterización química y actividad acaricida del aceite esencial de *Piper aduncum* subsp. *ossanum* frente a *Varroa destructor*. Revista de Protección Vegetal, La Habana, v. 26, n. 1, 2011.
- SOARES, B. V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. Biota Amazônia, Macapá, v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.
- TENTCHEVA, D.; GAUTHIER, L.; BAGNY, L.; FLEVET, J. Comparative analysis of deformed wing virus (DWV) RNA in *Apis mellifera* and *Varroa destructor*. Apidologie, Les Ulis, v. 37, n. 1, p. 41-50. 2006.
- TURCATTO, A. P.; ISSA, M. C.; MORAIS, M. M.; ALMEIDA, R. Infestação pelo Ácaro *Varroa destructor* (Anderson & Trueman) (Mesostigmata: Varroidae) em Operárias Adultas e em Células de Cria de Abelhas Africanizadas *Apis mellifera* Linnaeus (Hymenoptera: Apidae) na Região de Franca-SP. *EntomoBrasilis*, v. 5, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://www.periodico.ebras.bio.br/ojs/index.php/ebras/artic/e/view/ebrasilis.v5i3.195>>. Acesso em: 29 de jan. 2016.
- VIEIRA-COSTA, G. H.; ANDRADE, W. P.; NASCIMENTO, D. M. Uso de óleos essenciais no controle do ácaro *Varroa destructor* em *Apis mellifera*. Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia, v. 43, n. 3, p. 317-322, 2012.
- VILAS-BOAS, M. Tratamentos alternativos: Desenvolvimento da apicultura biológica em Trás-os-Montes e Alto Douro. 2007. Disponível em: <<https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/5872/3/Osegr edodoterra.pdf>>. Acesso em: 11 dez. 2015.
- \_\_\_\_\_. Manual de Apicultura: em Modo de Produção Biológico. Portugal: Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2008. 56 p.
- WALLNER, K. Varroacides and their residues in bee products. Apidologie, Les Ulis, v. 30, n. 2-3, p. 235-248, 1999.
- WIESE, Helmut. Apicultura: Novos Tempos. 2.ed. Florianópolis: Agrolivros, 2005. 378 p.
- ZAR, J. H. Biostatistical analysis. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. 1999.