

# EFEITO DO TANINO DE *STRYPHNODENDRON* SPP. SOBRE A LONGEVIDADE DE ABELHAS *APIS MELLIFERA* L. (ABELHAS AFRICANIZADAS)

EFFECT OF *STRYPHNODENDRON* SPP. TANINO ON *APIS MELLIFERA* L. (AFRICANIZED BEES) LONGEVITY

Santoro, K.R.<sup>1</sup>, M.E.Q. Vieira<sup>2</sup>, M.L. Queiroz<sup>3</sup>, M.C. Queiroz<sup>4</sup> e S.B.P. Barbosa<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Professor Colegiado de Zootecnia/UNIVASF. Av. Tancredo Neves, 100, Centro. 56306-410, Petrolina (PE). Brasil. E-mail: kleber.santoro@univasf.edu.br

<sup>2</sup>Professora DZ/UFRPE. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Bairro de Dois Irmãos. 52171-900, Recife (PE). Brasil. E-mail: mariaeunicev@bol.com.br

<sup>3</sup>Professora DZ/UFRPE. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Bairro de Dois Irmãos. 52171-900, Recife (PE). Brasil.

<sup>4</sup>Zootecnista autônoma. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Bairro de Dois Irmãos. 52171-900, Recife (PE). Brasil.

<sup>5</sup>Professor DZ/UFRPE. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n. Bairro de Dois Irmãos. 52171-900, Recife (PE). Brasil. E-mail: sbarbosa@ufrpe.br

Autor correspondente: Kleber Régis Santoro. Rua Bahia, 218 - Ap. 304. Bairro Centro Petrolina - PE. 56304-410. Brasil. Fone: (87) 3862-2061 / 3862-0452. Fax: (87) 3861-1927. E-mail: kleber.santoro@univasf.edu.br

## PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Estimador Kaplan-Meier. Modelo de riscos proporcionais de Cox. Modelo Gama. Modelo Weibull. Testes não paramétricos.

## ADDITIONAL KEYWORDS

Kaplan-Meier estimator. Cox proportional hazard model. Gama model. Weibull model. Non-parametric tests.

## RESUMO

O tanino do barbatimão (*Stryphnodendron* spp.) tem conhecida toxidez para abelhas operárias (*Apis mellifera*), causando perdas financeiras, intoxicação e mortalidade. Este trabalho teve como objetivo estudar a mortalidade de abelhas operárias alimentadas com pasta cãndi contendo diferentes teores de tanino. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado com três níveis de tanino (1,25; 2,50; 3,75 p.100) e um grupo controle sem taninos (0,00 p.100), aplicados através de pasta cãndi, por um período experimental de 12 dias.

Foram utilizados modelos semi-paramétricos e paramétricos de análise de sobrevivência no estudo da mortalidade, sendo a concentração de tanino a variável independente e o tempo até a morte das abelhas a variável dependente. Métodos não paramétricos e paramétricos foram utilizados para comparar a semelhança entre os tratamentos. Todos os níveis de tanino influenciaram na mortalidade. Os níveis de 1,25 e 3,75 p.100 não foram estatisticamente diferentes, tanto para os modelos não paramétricos como paramétricos. O modelo de Weibull foi considera-

do o melhor. Concluiu-se que níveis crescentes de tanino na alimentação da abelhas operárias elevou consideravelmente a mortalidade, reduzindo seu tempo de vida.

## SUMMARY

The barbatimão (*Stryphnodendron* spp.) tanino had a well know toxicity effect on honeybee (*Apis mellifera*), having a cause of monetary lack, intoxication, and mortality. This work had the goal to study the mortality of honeybee fed by candi type paste with different concentrations of tanino. It was utilized a completely casualized experimental design with three levels of tanino (1.25; 2.50; 3.75 percent), and a control group without tanino (0.00 percent), applied toward a candi type paste, for 12 days of experimental period. Semi-parametric and parametric models of survival analysis were utilized to study the mortality, where the tanino concentration was the independent variable and time to death the dependent variable. Non-parametric and parametric methods were utilized to compare the similarity between treatments. All levels of tanino influenced mortality. The levels of 1.25 percent and 2.50 percent were not statistically different, for both non parametric and parametric models. The Weibull model was considered the best model. It could be possible to conclude that rising levels of tanino in feeding honeybee grew mortality considerably, reducing its time life.

## INTRODUÇÃO

A intoxicação de animais por agentes veiculados através da alimentação não é incomum em criações comerciais, não somente por aqueles agentes encontrados em rações comerciais, mas também por elementos disponíveis para consumo no campo. Entre as toxinas de origem vegetal encontram-se a ni-

cotina, as rotenonas, as piretrinas e os taninos (Bueno *et al.*, 1990).

Os taninos possuem conhecida ação tóxica para as abelhas (Carbonari *et al.*, 1998) e nefrotóxica em bovinos, podendo levar à morte dependendo da concentração (Dobereiner *et al.*, 1985).

Plantas que apresentam taninos são comuns na flora brasileira. Algumas fontes seriam a *Talifia esculenta* (pitombeira), *Bauhinia variegata*, *Leucocephala leucocephala* (Makkar e Becker, 1998), *Ziziphus mucronata*, *Cratylia argentea*, *Calliandra calothyrsus* (Lascano, 1995), *Medicago sativa* (Viera, 2000), *Bauhinia forticata*, *Pithecolobium diversifolium*, *Caesalpineae caesalpinifolia* e as duas espécies de barbatimão nativas do Brasil (Lorenzi, 1992), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Dimorphana mollis* (barbatimão-de-folha-miúda ou barbatimão falso), ambas com florescimento em épocas próximas.

Plantas dos gêneros *Stryphnodendron* e *Dimorpha* são comuns no Brasil, existindo diversas informações de apicultores acerca da toxicidade causada às abelhas que forragearem em tais plantas, relacionando o efeito à longevidade das operárias e ao aparecimento da doença conhecida como *cria ensacada brasileira* (Santos e Message, 1998; Cintra *et al.*, 2004).

Segundo Cintra *et al.* (1998), as abelhas não seriam capazes de evitar os alimentos ou dietas contendo taninos, mesmo com a disponibilidade de fontes alimentares sem a substância. Entretanto, a toxidez do tanino, não seria observada logo de início, a não ser que esteja em níveis extremamente

elevados para a tolerância da espécie que o consumiu, pois teria seu efeito principal algum tempo depois do consumo continuado do alimento, ou seja, possuiria efeito acumulativo.

Relatos de experimentos com abelhas africanizadas alimentadas com extrato aquoso da inflorescência de *S. adstringens* (barbatimão) demonstraram que a longevidade das abelhas foi reduzida à metade quando comparada ao grupo controle (Alves *et al.*, 1996). Cintra *et al.* (1998) também apresentaram resultados de diminuição significativa no tempo de vida das abelhas tratadas com inflorescências desidratadas do barbatimão verdadeiro e do falso barbatimão. Apesar da doença conhecida como *cria ensacada* ser causada por um vírus que afeta principalmente as larvas das abelhas, Message *et al.* (1995) não constataram a presença do agente em regiões do cerrado brasileiro onde ocorria a doença. Posteriormente, Carvalho (1998) e Carvalho *et al.* (1998) demonstraram que a doença ocorria durante a floração de *S. polyphyllum* e que os sintomas podiam ser reproduzidos pois, os mesmos resultados foram obtidos experimentalmente, através do fornecimento de pólen de barbatimão na dieta de larvas de operárias.

Como se pode verificar, as consequências para o manejo de colméias em regiões de ocorrência do barbatimão são diretas, afetando o manejo das colméias, o retorno financeiro obtido da produção do mel e outros produtos do apiário, além da própria sobrevivência dos enxames.

Este trabalho teve por objetivo verificar a mortalidade de abelhas

operárias africanizadas (*Apis mellifera* L.), alimentadas com produto que continha tanino extraído do barbatimão (*Stryphnodendron* spp.), avaliando seu efeito tóxico através de técnicas de análise de sobrevivência.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados quatro tratamentos constituídos dos níveis de tanino: 0,00 p.100 (controle); 1,25 p.100; 2,50 p.100 e 3,75 p.100 adicionados em uma pasta cãndi formada de açúcar e mel que serviu de alimento básico para as abelhas com água *ad libitum*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições para cada tratamento, totalizando 24 unidades experimentais. Cada unidade experimental, composta de 40 abelhas operárias africanizadas, foi alojada em caixa de embalagem de leite do tipo longa vida medindo 0,17 x 0,10 x 0,07. As abelhas foram coletadas aleatoriamente em uma colméia com população normal ( $\pm 60000$  operárias) e sadia.

As observações foram tomadas diariamente e igualmente em todas as unidades experimentais, no mesmo horário de 09:00 horas da manhã, durante todos os dias da execução do experimento. O total de abelhas mortas em cada unidade experimental era então anotado. A variável dependente analisada foi o tempo decorrido desde o início do experimento até o momento da coleta da informação de mortalidade dos indivíduos, a variável independente foi a concentração de tanino de cada tratamento.

Utilizaram-se métodos de análise

de sobrevivência na análise dos dados, sendo investigada a adequação de modelos paramétricos aos dados.

O estimador não paramétrico de Kaplan-Meier (KM) foi utilizado para se verificar graficamente a sugestão do uso de um modelo paramétrico para as observações. Foram realizados os testes não paramétricos de log-rank, Wilcoxon, Gehan, Harrington e Tarone para analisar a igualdade entre tratamentos (Colossimo, 2001; Cantor, 2003).

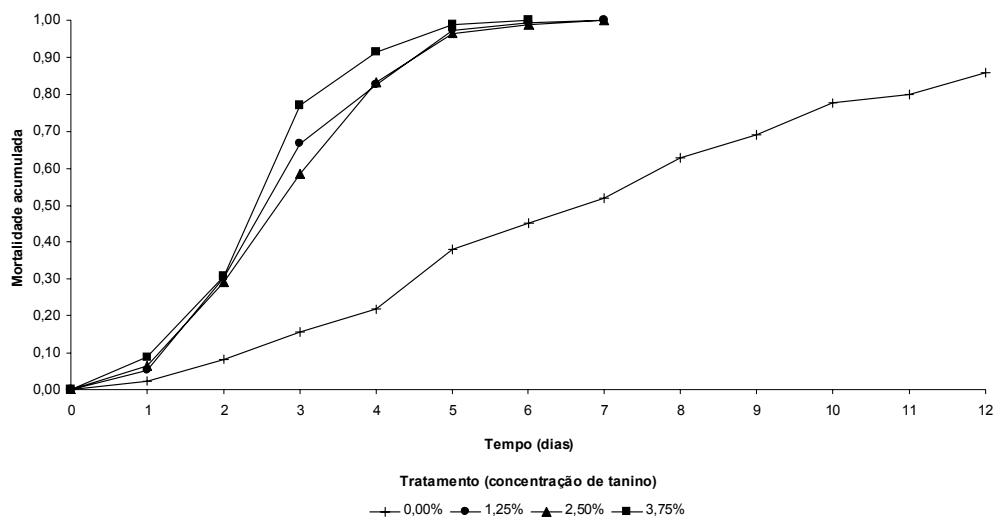
O modelo semi-paramétrico utilizado foi o modelo de riscos proporcionais de Cox e os modelos paramétricos foram os modelos de tempo de falha com distribuição exponencial, Weibull e gama (Kleinbaum, 1996; Hosmer Jr. e Lemeshow, 2002). Foram realizados testes de razão de verossimilhança para igualdade entre tratamentos para os modelos paramétricos.

No caso do modelo de riscos proporcionais de Cox, a função de risco foi dada por  $h(t, X) = h_0(t) g(X'\beta)$ , em que  $h_0(t)$  é um termo independente e  $g(X'\beta) = \exp(X'\beta)$ , onde  $X'$  é a matriz de incidência de efeitos fixos dos níveis de concentração de tanino dos tratamentos, mais o intercepto e  $\beta$  é o vetor de coeficientes.

Nos modelos paramétricos exponencial, Weibull e gama, a função de tempo de falha foi dada por  $\log(t) = X'\beta$ , sendo que  $\log(t)$  teria distribuição exponencial, Weibull e gama, conforme o modelo utilizado e  $X'\beta$  seria como descrito para o modelo de riscos proporcionais de Cox.

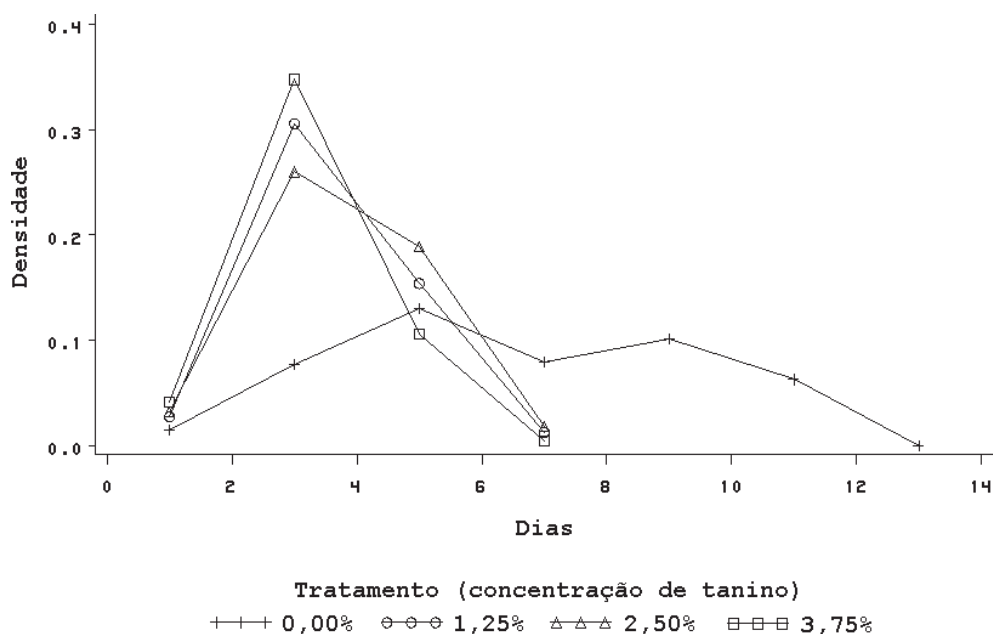
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número de indivíduos por unidade experimental não está de acordo com o



**Figura 1.** Perfis médios de mortalidade das abelhas operárias, para as diferentes concentrações de tanino. (Average work bee mortality for different concentrations of tanino).

## EFEITO DO TANINO NA LONGEVIDADE DE ABELHAS



**Figura 2.** Função de densidade de mortalidade aproximada para as diferentes concentrações de tanino. (Approximate mortality density function for different concentrations of tannino).

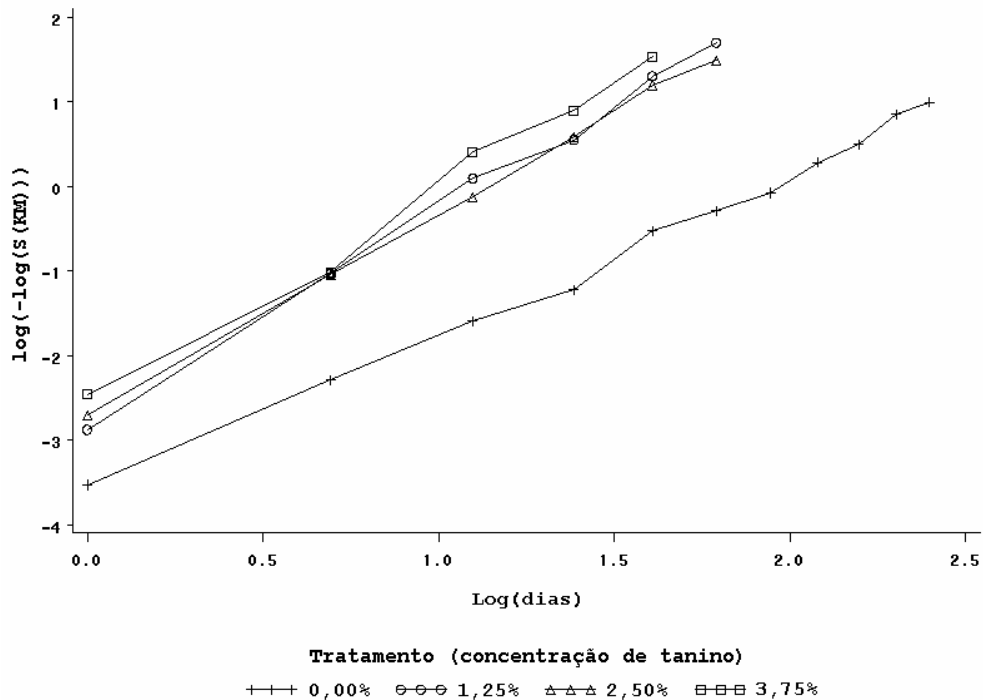
recomendado por Betioli (1989), que recomendou 20 abelhas por caixa, mas isto não interferiu no objetivo do trabalho.

Os perfis médios da mortalidade (**figura 1**) e as funções de densidade de mortalidade aproximada (**figura 2**)

para os tratamentos apresentaram comportamento diferenciado, demonstrando que as concentrações utilizadas tiveram diferentes influências na mortalidade das abelhas, sendo que as concentrações de 1,25 p.100 e 2,50 p.100 mostraram-se muito próximas.

**Tabela I.** Testes não paramétricos para igualdade entre tratamentos. (Non-parametric tests for treatment equality).

Teste	Graus de liberdade	$\chi^2$	Prob. > $\chi^2$
Log-rank	3	327,7107	<0,0001
Wilcoxon	3	217,4145	<0,0001
-2 log verossimilhança	3	110,3648	<0,0001
Gehan	3	33,3319	<0,0001
Harrington	3	33,3319	<0,0001
Tarone	3	42,3595	<0,0001



**Figura 3.** Gráfico de  $\log(-\log(S(KM)))$  x  $\log(dias)$  para inspeção de sugestão de modelo paramétrico. (Plot of  $\log(-\log(S(KM)))$  x  $\log(days)$  for inspection of parametric model suggestion).

Os testes não paramétricos empregados (**tabela I**) indicaram que os diferentes tratamentos não foram semelhantes.

A inspeção do gráfico da **figura 3**, seguiu recomendação de Colossimo (2001) e Afifi e Clark (1996), onde se colocou  $\log(-\log(S(KM)))$  x  $\log(dias)$ , sendo que  $S(KM)$  é o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier para mortalidade, sugeriu que um modelo paramétrico seria mais indicado para se ajustar aos dados, pois o comportamento dos trajetos demonstrou ser razoavelmente linear com uma inclinação maior que a unidade. Assim, o modelo semi-paramétrico de regressão de riscos proporcionais de Cox e

os modelos paramétricos com distribuição exponencial, Weibull e gama foram ajustados aos dados, apresentando diferentes graus de adequação (**tabela II**).

O modelo de riscos proporcionais de Cox não se ajustou bem aos dados provavelmente devido ao aparente confundimento entre os resultados apresentados pelas concentrações de 1,25 p.100 e 2,50 p.100 de tanino, cujos pontos não demonstraram ser exatamente proporcionais, sendo que o seu comportamento por vezes se confundia, como podemos observar pelas **figuras 1, 2 e 3**, nas quais as linhas que descrevem estes tratamentos se cruzam.

EFEITO DO TANINO NA LONGEVIDADE DE ABELHAS

**Tabela II.** Qualidade de ajuste dos modelos de riscos proporcionais de Cox e dos modelos com distribuição exponencial, Weibull e gama. (Model adjust quality for Cox proportional hazard and exponential, Weibull, and gamma models).

Modelo	Ajuste do modelo (-2 log verossimilhança)	Igualdade entre tratamentos*	
		$\chi^2$	Prob. > $\chi^2$
Cox	10542,08	159,3360	<0,0001
Exponencial	1975,86	97,0408	<0,0001
Weibull	1077,57	704,0769	<0,0001
Gama	1076,57	650,1370	<0,0001

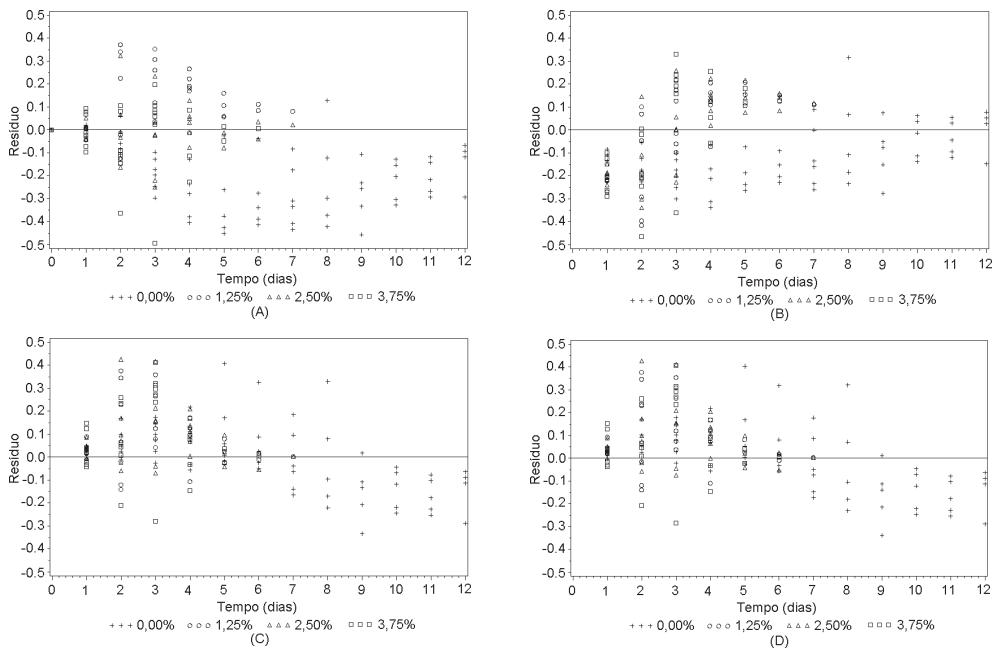
\*Teste de razão de verossimilhança.

Os erros padrões para os coeficientes dos parâmetros do modelo Weibull foram menores que para o modelo gama (**tabela III**). Analisando este resultado juntamente aos da **tabela II** e os

resíduos de predição da mortalidade acumulada (**figura 4**) concluiu-se que o modelo com distribuição Weibull seria o mais indicado para descrever os dados, ficando muito próximo ao mo-

**Tabela III.** Estimativas dos parâmetros para os modelos Weibull e gama. (Parameter estimates for Weibull and gama models).

Modelo/ Parâmetro	G.L.	Estimativa	Erro padrão	Limite de confiança (95 p.100)		$\chi^2$	Prob. > $\chi^2$
<i>Weibull</i>							
Intercepto	1	1,1710	0,0260	1,1200	1,2219	2029,67	0,0001
Tratamento 1	1	0,8701	0,0371	0,7974	0,9428	550,72	0,0001
Tratamento 2	1	0,0954	0,0353	0,0263	0,1645	7,33	0,0068
Tratamento 3	1	0,1250	0,0349	0,0565	0,1935	12,79	0,0003
Tratamento 4	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
Par. Escala	1	0,3705	0,0098	0,3518	0,3902		
Par. Forma	1	2,6990	0,0712	2,5629	2,8422		
<i>Gama</i>							
Intercepto	1	1,1562	0,0302	1,0969	1,2154	1461,72	<0,0001
Tratamento 1	1	0,8636	0,0384	0,7884	0,9388	506,83	<0,0001
Tratamento 2	1	0,0935	0,0360	0,0229	0,1641	6,74	0,0094
Tratamento 3	1	0,1228	0,0357	0,0528	0,1928	11,81	0,0006
Tratamento 4	0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-	-
Par. escala	1	0,3780	0,0124	0,3544	0,4031		
Par. forma	1	0,9089	0,0899	0,7328	1,0850		



**Figura 4.** Resíduos para mortalidade acumulada para os modelos de Cox (A), exponencial (B), Weibull (C) e gama (D). (Accumulated mortality residuals for Cox (A), exponential (B), Weibull (C), and gama (D) models).

delo gama. Isto pode ser explicado pelo fato do modelo Weibull ser um caso especial do modelo gama. Outro fator para escolha do modelo Weibull está na complexidade da explicação dos parâmetros do modelo gama quando comparado com o Weibull (Colossimo, 2001).

O teste de razão de verossimilhança, com as estimativas dadas pelo modelo Weibull, entre os tratamentos aplicados no experimento demonstrou que as concentrações de 1,25 p.100 e 2,50 p.100 teriam igual influência sobre a mortalidade das abelhas, ou seja, seriam semelhantes (**tabela IV**). As curvas de mortalidade acumulada descritas pelo modelo de Weibull para as

diferentes concentrações de tanino também apresentaram comportamento

**Tabela IV.** Teste de razão de verossimilhança entre os tratamentos, com estimativas dadas pelo modelo Weibull. (Likelihood ratio test between treatments, with estimates by Weibull model).

Tratamento	Tratamento (p.100)*			
	0,00	1,25	2,50	3,75
0,00	-			
1,25	401,11	-		
2,50	370,39	0,84 <sup>NS</sup>	-	
3,75	492,40	8,95	15,15	-

\*Valores de  $\chi^2$  significativos a 1 p.100 ( $p < 0,01$ ) ou menos quando não indicado; <sup>NS</sup> Não significativo.



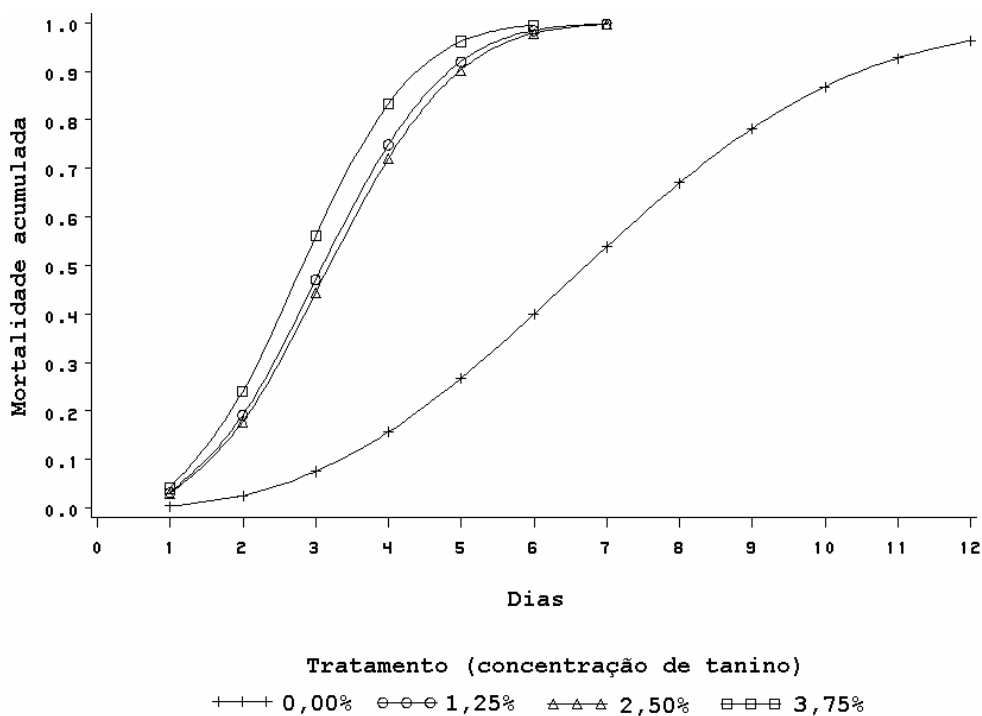
## EFEITO DO TANINO NA LONGEVIDADE DE ABELHAS

muito próximo para ambas concentrações (**figura 4**). O fato do tratamento com 1,25 p.100 de tanino apresentar uma curva com mortalidade superior, mas não diferente estatisticamente, do tratamento com 2,50 p.100 de tanino seria creditada em parte ao erro experimental, dado que não houve fatos que levassem a este comportamento no decorrer do experimento, tais como algum erro experimental, acidente ou manejo intencional.

Os resultados encontrados apresentaram claramente a influência do tanino sobre a mortalidade de abelhas operárias, conforme já havia sido descrito

por outros autores (Alves *et al.*, 1996; Cintra *et al.*, 1998; Cintra *et al.*, 2004). Entretanto, a descrição do fenômeno por métodos apropriados, ou seja, métodos de análise de sobrevivência para dados censurados, ampliaram a explicação do comportamento do fenômeno, permitindo uma maior compreensão do mesmo.

A **figura 5** mostrou curvas crescentes de mortalidade estimadas pelo modelo Weibull para as diferentes concentrações de tanino, indicando que níveis crescentes tendem a aumentar a mortalidade. Estas estimativas podem ser utilizadas para comparação com



**Figura 5.** Mortalidade acumulada estimada pelo modelo Weibull para as diferentes concentrações de tanino. (Estimate of accumulated mortality for Weibull model for different concentrations of tanino).

futuros trabalhos na área.

As diferenças encontradas entre os perfis (**figura 1**) descritos neste trabalho e os demonstrados por Cintra *et al.* (2004) residem no número de abelhas por tratamento e, principalmente, na concentração de tanino utilizada, que foram de 0,20; 0,50 e 1,00 p.100, ou seja, a maior concentração utilizada por aqueles autores foi inferior a menor concentração utilizada no presente trabalho. O confundimento entre duas concentrações de tanino, como ocorreu no presente trabalho com 1,25 e 2,50 p.100, não foi encontrado por nenhum dos autores consultados na bibliografia. Entretanto, eles não utilizaram estes níveis de concentração (Alves *et al.*, 1996; Cintra *et al.*, 1998; Cintra *et al.*, 2004), sendo sugeridos novos trabalhos utilizando concentrações que compreendam as citadas, para se verificar nova ocorrência deste comportamento.

Experimentos a campo, com o objetivo de estudar a mortalidade causada pela toxidez do tanino seriam difíceis de realizar devido a problemas em se localizar todas as abelhas mortas, identificar quais suas colméias e diag-

nosticar a intoxicação pelo tanino, por exemplo. Entretanto, dados relacionados à produção da colméia, como quantidade de mel ao longo do tempo, em áreas ou épocas de florada de plantas que possuem tanino em quantidades que poderiam ser tóxicas, poderiam ajudar muito na estruturação de um modelo mais completo e abrangente, aplicável na prática da apicultura.

## CONCLUSÕES

A longevidade das abelhas foi significativamente afetada pelo teor de tanino na alimentação.

Novos estudos devem ser conduzidos com níveis diferentes de inclusão de tanino, em uma amplitude maior que a utilizada aqui e proveniente de outras fontes que não o barbatimão, no intuito de se verificar níveis não prejudiciais à longevidade das abelhas operárias e, se possível, relacionar características produtivas e de atividade dentro e fora da colméia, tais como postura de ovos, número de larvas sadias e mortas, produção de mel e geléia real, unindo-os aos dados a serem analisados.

## BIBLIOGRAFIA

- Afifi, A.A. and V. Clark. 1996. Computer-Aided Multivariate Analysis. 3<sup>rd</sup> ed. Chapman & Hall, London.
- Alves, M.M.B.M., V. Carbonari, V.V.A. Júnior e A.G.S. Santana. 1996. Efeito do resíduo de extrato floral de barbatimão, em soro fisiológico, na longevidade de *Apis mellifera*. In: Congresso Brasileiro de Apicultura. XI Reunião, Teresina, Brasil.
- Betioli, J.V. 1989. Estudo da longevidade de operárias de *Apis mellifera* (Hym. Apidae) em condições de confinamento. Dissertação de Mestrado em Zoologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro (Brasil).
- Bueno, O.C., M.J.A. Hebling-Beraldo, O.A. Silva e P.C. Vieira. 1990. Toxic effect of plant on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. In: R. K. Vander Meer, K. Jaffer and A. Cedeno (Eds.) Applied Myrmecology: a world perspective, pp. 420-426. Westview Press, Oxford.

## EFEITO DO TANINO NA LONGEVIDADE DE ABELHAS

- Cantor, A.B. 2003. SAS Survival Analysis Techniques for Medical Research. 2<sup>nd</sup> ed. SAS Institute Inc., Cary.
- Carbonari, V., M.M.B.M. Alves, V.V.A Júnior e A.G.S. Santana. 1998. Efeito tóxico dos componentes florais (nectário e antera) do barbatimão em operárias *Apis mellifera* africanizadas (hym.: *Apidae*). In: Congresso Brasileiro de Apicultura, XII Reunião, Salvador, Brasil.
- Carvalho, A.C.P. 1998. Pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* como agente causador da cria ensacada brasileira em *Apis mellifera* L. Dissertação de Mestrado em Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa (Brasil).
- Carvalho, A.C.P., L.A.O. Campos e G.A. Carvalho. 1998. Pólen tóxico como causa da Cria Ensacada Brasileira. In: Encontro Sobre Abelhas, III Reunião, Ribeirão Preto, Brasil.
- Cintra, P., O. Malaspina e O.C. Bueno. 1998. Toxicidade de *Stryphnodendron adstringens* e *Dimorphandra mollis* (barbatimão) em operárias de *Apis mellifera*. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, XII Reunião, Salvador, Brasil.
- Cintra, P., O. Malaspina, O.C. Bueno, F. Petacci e J.B. Fernandes. 2004. Toxicidade do Barbatimão para Abelhas. In: <http://www.herbario.com.br/bot/insetici/toxabe.htm>
- Colossimo, E.A. 2001. Análise de Sobrevida Aplicada. 46 RBRAS/9 SEAGRO - ESALQ/USP, Piracicaba.
- Dobereiner, J., C.H. Tokarnia, A. Gava e L.B. Consorte. 1985. Intoxicação experimental em bovinos pela fava de *Dimorphandra glandulosa* (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 5: 47-52.
- Hosmer Jr., D.W. e S. Lemeshow. 2002. Applied Survival Analysis: regression modeling of time event data. John Wiley & Sons, New York.
- Kleinbaum, D.R. 1996. Survival Analysis: a self-learning text. Springer-Verlag, New York.
- Lascano, C.E. 1995. Calidad nutritiva y utilización de *Cratylia argentea*. In: Memorias del Taller de Trabajo Sobre *Cratylia*, Reunião, Brasília (DF), Brasil.
- Lorenzi, H. 1992. Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Plantarum, Nova Odessa.
- Makkar, H.P.S. and K. Becker. 1998. Do tannins in leaves of trees and shrubs from African and Himalayan regions differ in level and activity. *Agroforestry Systems*, 40: 59-68.
- Message, D., B.V. Ball and I.C. Silva. 1995. A serious brood disease affecting africanized honeybees (*Apis mellifera*). In: Apimondia Congress, XXXIV Reunião, Lausanne, France.
- Santos, M.L.A. e D. Message. 1998. Taninos causando sintomas da cria ensacada brasileira. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, XXII Reunião, Salvador, Brasil.
- Vieira, M.E.Q. 2000. Produção de matéria seca, composição bromatológica, teores de saponinas e taninos de vinte e oito cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.). Tese de Doutorado em Zootecnia, UNESP, Botucatu (Brasil).

Recibido: 25-5-04. Aceptado: 27-9-04.