

ÁCIDO TÂNICO CAUSA DANOS AO EPITÉLIO VENTRICULAR DE LARVAS DA ABELHA *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE)?¹

ÉRICA WEINSTEIN TEIXEIRA^{2*}, JOSÉ EDUARDO SERRÃO³, DEJAIR MESSAGE⁴, JOEL ANTÔNIO DE OLIVEIRA⁵

¹Recebido para publicação em 18/11/03. Aceito para publicação em 17/12/03.

^{2*} Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Vale do Paraíba, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Caixa postal 07, CEP 12400-000, Pindamonhangaba, SP. E-mail: erica1705@terra.com.br

³Departamento de Biologia Geral, UFV, CEP 36571-000, Viçosa, MG

⁴Departamento de Biologia Animal, UFV, CEP 36571-000, Viçosa, MG

⁵Departamento de Química, UFV, CEP 36571-000, Viçosa, MG

RESUMO: O agente causador da patologia apícola Cria Ensacada Brasileira está presente, segundo evidências, no extrato etanólico do pólen de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*). Trata-se de gênero reconhecidamente produtor de grande quantidade de tanino e ensaios biológicos anteriormente desenvolvidos, confirmaram que o ácido tânico, quando presente em dietas de larvas de *Apis mellifera*, mesmo em baixas concentrações, promove o aparecimento dos sintomas característicos da enfermidade. Muito embora os taninos sejam compostos que apresentam efeitos antinutritivos (em função da complexação com proteínas, polissacarídeos e outros nutrientes), não existem relatos do efeito destes compostos no trato digestivo de abelhas. As escassas informações disponíveis para outros insetos limitam-se, freqüentemente, à influência dos taninos na digestibilidade de macronutrientes, às conjecturas quanto ao hábito alimentar e adaptação evolutiva da ingestão destes compostos ou à sua interferência em termos de ontogenia. A fim de se investigar o efeito do ácido tânico sobre o epitélio ventricular de larvas de *A. mellifera*, como uma das etapas na busca da elucidação dos possíveis mecanismos de ação dos compostos causadores da Cria Ensacada Brasileira, foram realizados dois experimentos, em condições de campo e de laboratório, utilizando-se larvas alimentadas com dietas elaboradas artificialmente contendo ácido tânico. Nenhuma alteração celular foi observada no epitélio ventricular de larvas de quinto instar cujas dietas continham até 1,0% de ácido tânico, havendo manutenção da integridade da membrana peritrófica.

Palavras-chave: trato digestivo, *Apis mellifera*, ácido tânico, Cria Ensacada Brasileira.

ARE THERE SOME MIDGUT DAMAGE CAUSED BY INGESTION OF TANNIC ACID BY THE HONEYBEE *Apis mellifera* L. (HYMENOPTERA: APIDAE) LARVAE?

ABSTRACT: Previous studies suggested that the Brazilian sac brood disease (BSB) may be caused by some content present in the ethanol soluble extract from pollen grains of *Stryphnodendron polyphyllum*, plant species containing high level of tannin. Bioassays showed that larvae of honeybee *Apis mellifera* present signals of BSB disease when fed on diet containing tannic acid. This study investigated the effect of diet containing tannic acid on the midgut epithelium of *A. mellifera* larvae. Bee larvae were fed at field and laboratory conditions with artificial food. Results did not show any morphological changes in the midgut of larvae fed on diet containing tannic acid.

Key words: *Apis mellifera*, tannic acid, Brazilian sacbrood-like disease.

INTRODUÇÃO

No Brasil, dentre as principais doenças que acometem crias de *Apis mellifera*, destaca-se a Cria Ensacada Brasileira (CEB), em virtude das consideráveis perdas econômicas que causa à atividade apícola. Esta enfermidade foi designada pela primeira vez por MESSAGE (1997) como *Brazilian sacbrood-like disease*, por apresentar sintomas semelhantes aos da Cria Ensacada causada pelo *Sac Brood Virus* (SBV), cuja ocorrência verifica-se em diversos outros países. Os sintomas da CEB, conforme descritos por MESSAGE *et al.* (1995), podem ser observados na pré-pupa, após a operculação da célula de cria, ocorrendo acúmulo de líquido ecdisial entre o corpo e o tegumento, não havendo passagem para a fase de pupa. Ocorre, então, escurecimento gradativo de pré-pupas infectadas até a cor marrom, permanecendo nas células de cria como escamas secas, na forma de gôndolas, tal qual descrito por SHIMANUKI e KNOX (1991) e BAILEY e BALL (1991) para a Cria Ensacada causada pelo vírus SBV.

Entretanto, resultados de pesquisas conduzidas por MESSAGE *et al.* (1995), não evidenciaram a presença de qualquer agente microbiano em larvas mortas de colméias acometidas pela CEB.

CARVALHO (1998), ao avaliar uma possível relação entre o aparecimento da CEB e o pólen produzido por plantas que floresciam na Região Sudeste do Brasil durante o período epidêmico, constatou ser o pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) o agente causador da doença. Buscando identificar a substância tóxica do pólen de *S. polyphyllum* causadora da CEB, SANTOS (2000) concluiu que taninos presentes no extrato etanólico do pólen desta espécie causavam o aparecimento da doença em larvas criadas em laboratório. Suas conclusões foram fortalecidas por resultados positivos obtidos em ensaios biológicos com o uso de ácido tânico.

Taninos são produtos do metabolismo secundário dos vegetais e estão presentes em diversos grupos destes, constituindo-se em compostos altamente polimerizados e hidroxilados, com peso molecular variável, podendo ultrapassar 3.000 Da (BRAVO, 1998). Tais características permitem que esses compostos formem complexos insolúveis com carboidratos e proteínas.

O conhecimento acerca da absorção de compos-

tos polifenólicos no trato digestivo animal ainda é escasso e muitas vezes controverso. Resultados de estudos *in vivo* e *in vitro*, utilizando compostos polifenólicos de estruturas químicas diferentes, têm demonstrado sua variável susceptibilidade à digestão e à absorção, sendo o peso molecular e características que apresentam quanto à extração por diferentes solventes fatores determinantes (BRAVO, 1998).

Relatos do efeito de compostos polifenólicos, ou mais especificamente, de taninos no trato digestivo de insetos são praticamente inexistentes e as poucas informações disponíveis limitam-se, frequentemente, à influência destes compostos na digestibilidade de macronutrientes ou sua influência em termos de ontogenia.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do ácido tânico sobre o epitélio ventricular de larvas de *Apis mellifera*, como uma das etapas na busca da elucidação dos possíveis mecanismos de ação dos compostos causadores da CEB.

MATERIAL E MÉTODOS

Larvas de abelhas *Apis mellifera* L. (africanizadas) (Hymenoptera, Apidae) utilizadas nos experimentos 1 e 2 foram provenientes de colméias do Apiário Central da Universidade Federal de Viçosa.

Foram selecionadas 40 larvas com três dias de idade, distribuídas em quatro tratamentos no experimento 1 (campo) e em três tratamentos no experimento 2 (laboratório), conforme demonstrado na Quadro 1. As concentrações de ácido tânico contidas nas dietas dos experimentos 1 e 2 foram as mesmas utilizadas por SANTOS (2000), capazes de reproduzir os sintomas da CEB e cujos índices de mortalidade na fase de pré-pupa foram os mais elevados.

Experimento 1

Quatro fileiras de dez alvéolos cada, contendo as 40 larvas utilizadas nos quatro tratamentos, foram demarcadas com alfinetes coloridos nos próprios favos, mantidos em colméias no campo. Com o objetivo de garantir a não-remoção das larvas alimentadas artificialmente, as colméias utilizadas na pesquisa foram escolhidas após avaliação prévia do comportamento higiênico, segundo NEWTON e OSTASIEWSKI (1986) modificado por GRAMACHO e GONÇALVES (1994), tendo sido selecionadas aquelas

Quadro 1. Dietas utilizadas nos tratamentos dos experimentos realizados em condições de campo (1) e de laboratório (2). n = número de indivíduos analisados

Experimento 1	Experimento 2	n	Dieta
Tratamento 1	-	10	Dieta fornecida naturalmente pelas nutrizes
Tratamento 2	Tratamento 1	10	Dieta de operária ¹
Tratamento 3	Tratamento 2	10	Dieta de operária contendo 0,5% de ácido tânico ²
Tratamento 4	Tratamento 3	10	Dieta de operária contendo 1,0% de ácido tânico ³

¹ – Dieta de operária (baseada em Rembold & Lakner, 1981, adaptada por Silva, 1995): 1,15% de extrato de levedo, 6,78% de D-glicose, 6,78% de D-frutose, 49,01% de geléia real e 36,28% de água.

² – Dieta de operária contendo 0,5% de ácido tânico (baseada em Rembold & Lakner, 1981, adaptada por Silva, 1995 e, posteriormente, por Santos, 2000, para inclusão de ácido tânico): 1,13% de extrato de levedo, 6,75% de D-glicose, 6,75% de D-frutose, 48,78% de geléia real, 36,09% de água e 0,5% de ácido tânico (Cinética Química®).

³ – Dieta de operária contendo 1,0% de ácido tânico (baseada em Rembold & Lakner, 1981, adaptada por Silva, 1995 e, posteriormente, por Santos, 2000, para inclusão de ácido tânico): 1,14% de extrato de levedo, 6,72% de D-glicose, 6,72% de D-frutose, 48,52% de geléia real, 35,90% de água e 1,0% de ácido tânico (Cinética Química®).

que apresentaram percentual de crias removidas inferior a 60%.

As larvas pertencentes ao tratamento 1 receberam apenas a dieta oferecida naturalmente pelas nutrizes.

As dietas correspondentes aos tratamentos 2, 3 e 4 foram fornecidas em horários pré-fixados, com o auxílio de micropipeta. As quantidades oferecidas foram crescentes ao longo dos dias e estabelecidas segundo observações prévias da capacidade de ingestão diária total de alimento (dieta artificial + dieta oferecida pelas nutrizes), de forma a não permitir sobras e possível fermentação do alimento. As dietas foram oferecidas nas seguintes quantidades: 5 µL para as larvas de três dias, 10 µL para as larvas de quatro dias e 15 µL para as larvas de 5 dias.

As larvas foram dissecadas ao final do quinto dia em presença de solução salina para insetos (0,1 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄ e 20 mM Na₂HPO₄). Os tratamentos digestivos foram fixados em formalina Millonig de Carlson. Posteriormente, procedeu-se a desidratação, em série crescente de etanol, seguindo-se inclusão em historesina. Secções com 5 mm de espessura foram coradas com azul de toluidina-borax. As preparações histológicas foram observadas em microscopia de luz e fotografadas.

Experimento 2

O experimento foi realizado no Laboratório de Patologia Apícola do Departamento de Biologia Animal da UFV. A técnica de criação adotada foi a mesma utilizada por SILVA (1995), com pequenas modificações quanto às quantidades de alimento fornecido, em função da idade de transferência das larvas. As larvas foram transferidas para cúpulas de polietileno (9,8 mm de altura x 8,8 mm de largura superior x 5,6 mm de largura inferior) com três dias de idade, com o auxílio de um estilete e alimentadas com quantidades crescentes das dietas que constam na Quadro 1, de forma a não sobrar alimento nas cúpulas de um dia para o outro. O esquema de alimentação adotado foi o seguinte: 25 µL para as larvas de três dias, 30 µL para as larvas de quatro dias e 50 µL para as larvas de cinco dias. As disseções foram feitas ao final do quinto dia e os procedimentos histológicos subsequentes foram desenvolvidos conforme descrito no experimento 1.

RESULTADOS

Não foram observadas alterações nas células digestivas do epitélio ventricular de larvas de quinto instar, utilizadas nos experimentos 1 e 2, quando examinadas através de microscopia de luz.

As células do intestino médio das larvas que receberam dieta contendo 1,0 % de ácido tânico não apresentaram qualquer anormalidade (Figura 1), podendo ser observada uma população uniforme de células digestivas grandes, de forma colunar ou achatada, com a face apical ligeiramente abaulada contendo borda estriada bem desenvolvida (Figuras 1 e 2). Os núcleos mostraram-se grandes, com cromatina evidente e distribuída uniformemente.

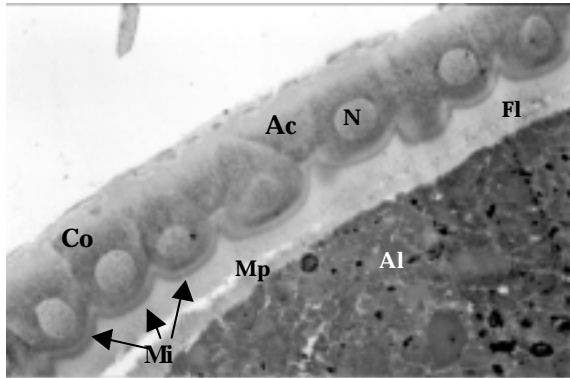


Figura 1. Corte histológico de ventrículo de larva de *Apis mellifera* (africanizada) no último estágio larval, do experimento 1, tratamento 4 (dieta de operária contendo 1,0 % de ácido tânico). 50 X. Cd – célula digestiva de forma colunar (Co) ou achatada (Ac), com microvilosidades (Mi) na região apical. Núcleos (N) das células digestivas com cromatina condensada. Material floculento (Fl) no espaço ectoperitrófico e presença de membrana peritrófica intacta (Mp) separando o alimento (Al) contido na luz do intestino médio das células digestivas do epitélio

A membrana peritrófica apresentou-se intacta, havendo preservação do espaço ectoperitrófico, com presença de material floculento em seu interior e alimento no espaço endoperitrófico (Figuras 1 e 2).

Em algumas regiões do epitélio do intestino médio das larvas, em todos os tratamentos dos experimentos 1 e 2, foi possível observar formação de protusões na forma de bolhas, na face apical, contendo matriz citoplasmática com grânulos grosseiros, de densidade aparentemente diferente do citoplasma subjacente (Figura 3). A formação destas protrusões culmina com a liberação de fragmentos celulares de forma e tamanho variados, as quais são eliminadas em direção à luz do intestino mé-

dio. Não foi observada a presença de núcleo em nenhuma dessas formações. Em alguns casos, observa-se a presença de pequenas aberturas na membrana, no momento da liberação das bolhas. (Figura 4)

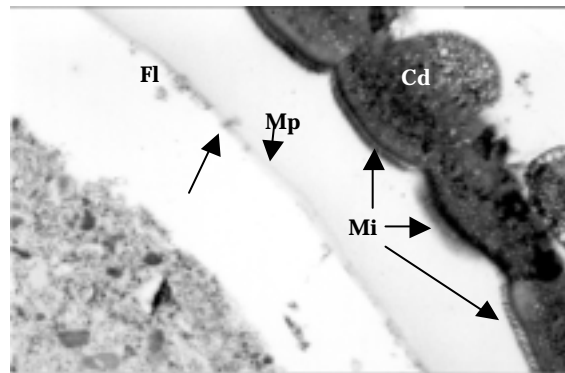


Figura 2. Corte histológico de ventrículo de larva de *Apis mellifera* (africanizada) no último estágio larval, do experimento 1, tratamento 1 (dieta de operária). 75 X. Detalhe da região apical das células digestivas (Cd) com microvilosidades (Mi). Membrana peritrófica (Mp) e material floculento (Fl) no espaço ectoperitrófico. A seta aponta alimento contido no espaço endoperitrófico, passando através da membrana peritrófica

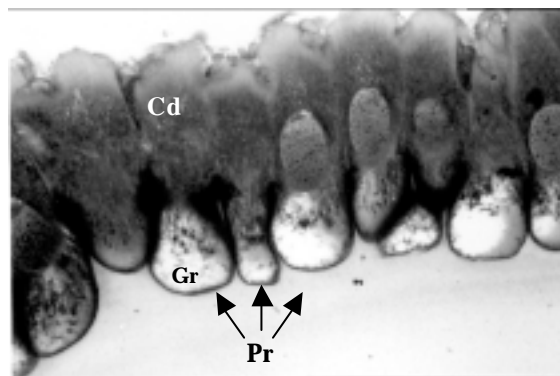


Figura 3. Corte histológico de ventrículo de larva de *Apis mellifera* (africanizada) no último estágio larval, do experimento 2, tratamento 1 (dieta de operária). 75 X. Células digestivas (Cd) apresentando protusões (Pr) contendo matriz citoplasmática com grânulos (Gr) de densidade aparentemente diferente

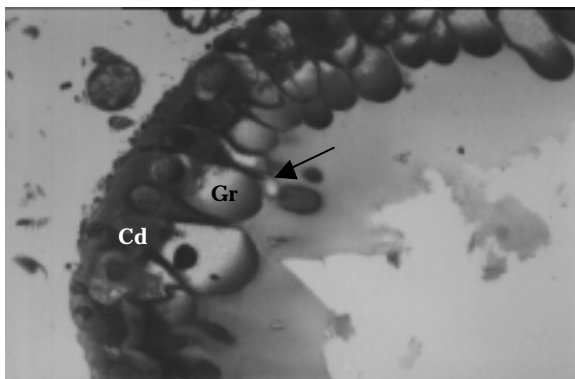


Figura 4. Corte histológico de ventrículo de larva de *Apis mellifera* (africanizada) no último estágio larval, do experimento 1, tratamento 3 (dieta de operária contendo 0,5 % de ácido tânico). 37,5 X. Células digestivas (Cd) apresentando protusões (Pr) contendo matriz citoplasmática com grânulos (Gr). A seta indica pequena abertura da membrana após liberação das bolhas (Bo)

DISCUSSÃO

BERNAYS (1978), ao investigar o efeito da inclusão de taninos em dietas de diferentes espécies de Orthoptera, constatou a presença de áreas degenerativas no intestino médio e ceco de *Locusta migratória* L., com aparecimento de vacúolos. Segundo o autor, tal efeito poderia estar associado à não-adaptação da espécie à ingestão de tais compostos, por tratar-se de herbívoro que se alimenta de gramíneas, grupo este caracteristicamente deficiente em taninos. Posteriormente, BERNAYS *et al.* (1980), comprovaram haver efeito diferenciado do ácido tânico sobre o epitélio intestinal de diversas espécies pertencentes à superfamília Acridoidea e associou suas constatações ao aspecto evolutivo das espécies quanto à adaptação da ingestão de taninos através de suas dietas naturais. Estes autores observaram que o ácido tânico passa através da membrana peritrófica de espécies que se alimentam naturalmente de gramíneas e causa danos ao epitélio intestinal destes insetos, com eventual desenvolvimento de lesões. Ainda, nestes casos, foi possível detectar-se presença de taninos na hemocele. KAROWE (1989) ao alimentar larvas de Lepidoptera de último instar com dietas contendo concentrações de ácido tânico até 8 %, também observou respostas

fisiológicas diferenciadas entre as diversas espécies estudadas, as quais variaram desde a manutenção da taxa de crescimento relativo até a redução do consumo de alimento e aumento da mortalidade na fase de pupa. STEINLY e BERENBAUM (1985), ao estudarem efeitos histopatológicos de taninos no epitélio do intestino médio de diferentes espécies de Lepidoptera, concluíram que os efeitos constatados assemelharam-se à resposta degenerativa geral observada quando ocorre ingestão de toxinas por estes insetos.

Muito embora não existam relatos na literatura relacionados à ingestão de taninos por abelhas, sabe-se que a *A. mellifera* apresenta hábito alimentar generalista, buscando alimento energético e protéico em diversas espécies vegetais e, possivelmente, o teor e estrutura química dos taninos presentes nestas espécies são também diversificados.

O fato de não ter sido observada, no presente trabalho, qualquer alteração ou dano ocasionados à membrana peritrófica e ao epitélio ventricular das larvas que ingeriram 0,5% ou 1,0% de ácido tânico, sugere que, uma, ou ambas as hipóteses elaboradas por KOROWE (1989), na tentativa de explicar os efeitos antinutricionais dos taninos, pode estar ocorrendo, ou seja, pode estar ocorrendo formação de complexos insolúveis do ácido tânico com proteínas da dieta no trato intestinal do inseto, reduzindo desta forma a disponibilidade de nitrogênio e/ou inativação de enzimas digestivas, tornando nutrientes da dieta indisponíveis ao organismo e impedindo, de alguma forma, a manutenção da integridade fisiológica da espécie. Tal afirmação justifica-se pelo fato de que deficiências nutricionais ocorridas no período larval podem não apresentar resposta imediata, pois, neste período, ocorre o acúmulo de substâncias no corpo gorduroso, como proteínas, lipídeos e carboidratos (CHAPMAN, 1998), cujas reservas serão utilizadas durante o processo de metamorfose. É justamente nesta fase que ocorre o aparecimento dos sintomas, ou seja, quando deve se iniciar a disponibilização e metabolização das reservas do corpo gorduroso, órgão este que, apesar da designação, não é um mero órgão de reserva, tendo um importante papel metabólico nos insetos.

Ensaio biológicos anteriormente desenvolvidos por SANTOS (2000), evidenciaram elevados índices de mortalidade na fase de pré-pupa, com sintomas típicos da CEB (tal qual observa-se em condições na-

turais de incidência da doença no campo). Esses resultados foram obtidos com a administração de dietas contendo os mesmos níveis do referido composto à larvas de *Apis mellifera* criadas sob as mesmas condições do presente trabalho, em laboratório. Este autor constatou que ocorria o aparecimento dos sintomas da doença em todos os tratamentos em que o ácido tânico estava presente na dieta (concentrações que variaram de 0,001% a 1,0), todavia os maiores índices de mortalidade obtidos foram de 70,83% e 68,75% e correspondiam às dietas contendo 0,5% e 1,0% de ácido tânico, respectivamente.

Resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando compostos polifenólicos de diferentes solubilidade e estruturas químicas, ilustram a grande variação a que os mesmos são susceptíveis no processo digestivo (SAURA-CALIXTO, 1988). A capacidade de metabolização e absorção de tais compostos parece estar relacionada, dentre outros fatores, à característica que os mesmos apresentam quanto a processos de extração e às suas massas moleculares (BRAVO, 1998). Possivelmente, as características químicas apresentadas pelo ácido tânico, exemplo típico e mais conhecido de tanino hidrolisável (CHUNG *et al.*, 1998), permite-lhe que seja digerido e absorvido, conforme resultados obtidos por BRAVO *et al.* (1994).

Considerando-se que crias de *A. mellifera*, quando acometidas pela CEB não atingem a fase de pupa, havendo acúmulo de líquido ecdisial entre o corpo e o tegumento, conforme descrito por MESSAGE *et al.* (1995), pode-se estabelecer, também, conjecturas acerca de possíveis interferências que por ventura venham a ser ocasionadas após a ingestão de taninos quanto ao perfil e atuação dos hormônios envolvidos no processo de muda da espécie, bem como das enzimas responsáveis pela digestão da cutícula velha.

CONCLUSÃO

Faz-se necessário a condução de pesquisas específicas que busquem a elucidação dos possíveis mecanismos propostos, de forma a convergir para o estabelecimento de uma solução prática para a questão da Cria Ensacada Brasileira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAILEY, L., BALL, B. V. Honey bee pathology. New York: Academic Press, 1991. 193p.
- BERNAYS, E. A. Tannins: an alternative viewpoint. *Entomologia Experimentale et Applicata*, v. 24, p. 244-253, 1978.
- BERNAYS, E. A., CHAMBERLAIN, D., MCCARTHY, P. The diferencial effects of ingested tannic acid on different species of Acridoidea. *Entomologia Experimentale et Applicata*, v. 28, p. 158-166, 1980.
- BRAVO, L., ABIA, R., EASTWOOD, M. A., SAURACALIXTO, F. Degradation of polyphenols (catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract: effect on colonic fermentation and faecal output. *British Journal Nutrition*, v. 71, p. 933-946, 1994.
- BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review*, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.
- CARVALHO, A.C. P. Efeito do pólen de *Stryphnodendron polyphyllum* na doença Cria Ensacada Brasileira em *Apis mellifera* L. 1758 (Africanizadas) (Hymenoptera: Apidae). Viçosa: UFV, 1998. 48p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- CHAPMAN, R. F. The insects – Structure and Function. Cambridge University Press, 4th ed. 1998. 770p.
- CHUNG, K.-T., WONG, T. Y., WEI, C.-I., HUANG, Y.-W., LIN, Y. Tannins and human health: a review. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, v. 38, n. 6, p. 421-464, 1998.
- GRAMACHO, K. P., GONÇALVES, L. S. Estudo comparativo dos métodos de congelamento e perfuração decrias para avaliação do comportamento higiênico em abelhas africanizadas. In: CONGRESSO LATINOIBEROAMERICANO DE APICULTURA, 4, 1994, Cordoba. Proceedings...Cordoba. Argentina. 1994, p.45.
- KAROWE, D. N. Differential effect of tannic acid on two tree-feeding Lepidoptera implications for anti-herbivore chemistry. *Oecologia*, v. 80, p. 507-512, 1989.
- MESSAGE, D., BALL, B. V., SILVA, I. C. A terrible enfermedad del pollo que afecta a las abejas africanizadas (*Apis mellifera*) en el Brasil. In: APIMONDIA CONGRESS, 34, 1995, Lausanne. Proceedings...Lausanne: Apimondia, 1995, 203p.

- MESSAGE, D. Management and disease problems of africanised bees in Brazil. Parkstone: The Central Association of Bee-Keepers, 1997. 15p.
- NEWTON, D. C., OSTASIEWSKI, Jr. N. J. A simplified bioassay for behavioral resistance to American foulbrood in honey bees (*Apis mellifera* L.). *American Bee Journal*, v. 126, n. 4, p. 278-281, 1986.
- SAURA-CALIXTO, F. Effect of condensed tannins in the analysis of dietary fiber in carob pods. *Journal Food Science*, v. 53, p. 1769-1771, 1988.
- SANTOS, M. L. de A. Análise dos constituintes químicos do pólen e da inflorescência de *Stryphnodendron polyphyllum*, em relação à Cria-Ensacada Brasileira em *Apis mellifera*. Viçosa: UFV, 2000. 59p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- SHIMANUKI, H., KNOX, D. Diagnosis of honey diseases. Washington: Department of Agriculture, 1991. 53p. (Handbook, AH-690).
- SILVA, I.C. Avaliação de dietas para criações de operárias e zangões de *Apis mellifera* L. (africanizadas) (Hymenopteras: Apidae) em condições de laboratório. Viçosa: UFV, 1995. 85p. Dissertação (Mestrado em Entomologia), Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- STEINLY, B. A., BERENBAUM, M. Histopatological effects of tannins on the midgut epithelium of *Papilio polyxenes* and *Papilio glaucus*. *Entomologia Experimentale et Applicata*, v. 39, p. 3-9, 1985.