

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA CRANDE  
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Estudo da toxicidade da *Prosopis juliflora* na alimentação de bovinos no semi-  
árido paraibano.

MÁRCIA ALVES DE MEDEIROS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAUDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PATOS-PB  
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

MÁRCIA ALVES DE MEDEIROS

Trabalho Acadêmico Orientado apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG como requisito parcial para Obtenção do Título de Bacharel em Medicina Veterinária, sob a orientação da Professora Doutora Rosane Maria Trindade de Medeiros e do Professor doutor Franklin Riet-Correa.

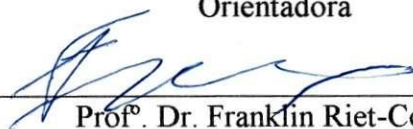
APROVADA EM 25/ maio / 2011

BANCA EXAMINADORA



---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosane Maria Trindade de Medeiros  
Orientadora



---

Prof.<sup>o</sup> Dr. Franklin Riet-Correa  
Co-orientador



---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sara Vilar D. Simões

## **Dedicatória**

*Dedico este ao trabalho meu grande Deus, pois sem ele eu nunca teria alcançado esse objetivo .*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que na plenitude de seu amor, de sua grandeza e de sua sabedoria, soube fortalecer-me para suportar cada obstáculo que por ventura surgiu em meu caminho.

A meus pais, meus maiores incentivadores Noé estudos, que com muita dedicação e amor, o ofereceram a mim como a maior das heranças que eles poderiam deixar para meu futuro.

A meus irmãos Marciana, Marcelo e Mirelly pelo companheirismo e carinho.

A meu noivo, que nunca mediu esforços para me ajudar e pela certeza de sua felicidade em me ver concretizando este sonho. Obrigada meu amor por tudo.

À minha amiga Michelline Nicolle por toda força durante esses cinco anos.

Aos meus queridos orientadores, Professora Rosane Medeiros e Professor Riet-Correa, que com muita paciência e humildade, tiveram papel fundamental na conclusão do presente trabalho. A vocês meu eterno agradecimento.

Ao INCT (Instituto nacional de Ciência e Tecnologia) pelo financiamento do projeto.

Aos Professores Antônio Flávio e Sara Vilar pela atenção, amizade e ajuda quando necessitei.

Ao laboratório de Patologia Animal e Nutrição Animal pela colaboração e de todas as pessoas que me ajudaram. À vocês meu muito obrigada.

A todos os meus amigos de sala que jamais esquecerei.

Enfim, a todos que acreditaram na minha capacidade e me ajudou, direta e indiretamente, a alcançar esse objetivo.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Considerações sobre a algaroba.....	14
2.2 Evolução do estudo da Prosopis juliflora como causa de intoxicação .....	18
2.3 Achados clínicos e laboratoriais .....	21
2.4 Os alcalóides, principais componentes ativos da P. juliflora .....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>26</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>

## RESUMO

MEDEIROS, Márcia Alves de. **Estudo da toxicidade da *Prosopis juliflora* na alimentação de bovinos no semi-árido paraibano.** Trabalho de conclusão de curso- Monografia (Curso de Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.34p.

No Brasil desde 1981, no semi-árido nordestino têm sido relatados casos doença de sintomatologia nervosa, denominada de “cara torta” devido ao desvio lateral de cabeça que o animal realiza para manter o alimento na boca durante a mastigação, ocorrendo principalmente em períodos de seca quando as vagens *Prosopis juliflora* são ingeridas espontaneamente ou oferecidas como única fonte alimentar. O objetivo deste trabalho foi avaliar se ocorrem quadros de intoxicação quando administrada uma ração contendo 30% da matéria seca de vagens de algaroba por um período de 12 meses na alimentação de bovinos. Foram utilizados neste estudo dois bovinos machos SRD pesando em média 130 kg. As informações necessárias ao estudo foram obtidas mediante o exame clínico do sistema nervoso central por meio de testes dos pares de nervos cranianos realizados mensalmente. Após esse período os animais foram eutanaziados e necropsiados para estudo de alterações macroscópicas e histológicas. Portanto, devido à ausência de sinais clínicos e histopatológicos, observadas neste estudo, podemos concluir que quando ingeridas em dietas contendo 30% da matéria seca das vagens de *P.juliflora* por até uma ano, não causa a doença “cara torta” em bovinos. E levando em consideração o ganho de peso mensal de 20 kg para o bovino 1 e 18 kg para o bovino 2, associada a sua composição química, valores energéticos e de digestibilidade, além de ser uma fonte alimentar de baixo custo e fácil obtenção, podemos considerar como satisfatória a inclusão de vagens de algaroba na dieta de bovinos durante longos períodos de estiagem podendo ser desta forma uma perspectiva altamente viável a sua utilização, principalmente aos pequenos produtores no semi-árido paraibano.

PALAVRAS CHAVE: Bovinos, plantas tóxicas, *Prosopis juliflora*.

## ABSTRACT

MEDEIROS, Márcia Alves. Toxicity study of *Prosopis juliflora* in the feeding of cattle in semi-arid. Work of Conclusion of Course- Monograph (Course of Veterinary Medicine) - University of Campina Grande, Patos, 2011.34p.

In Brazil since 1981 in semi-arid region have been reported cases of disease neurological symptoms, called the "pie guy" due to the lateral head of the animal to perform to keep food in the mouth during chewing, occurring mainly in periods of dry when the pods are eaten *Prosopis juliflora* spontaneously or offered as single food source. The aim of this study was to evaluate whether there are toxic reactions when given a diet containing 30% of dry mesquite pods for a period of 12 months in cattle feed. Were used in this study, two spots SRD cattle weighing 130 kg on average. The information needed for the study were obtained by clinical examination of central nervous system by testing the cranial nerves held monthly. After this period the animals were euthanized and necropsied to study macroscopic and histological alterations. Therefore, the absence of clinical signs and histopathology observed in this study, we conclude that when ingested in diets containing 30% of dry matter *P.juliflora* pods for up to one year, does not cause disease "pie guy" in cattle. And taking into account the monthly weight gain of 20 kg to 18 kg and a veal for veal 2, associated with its chemical composition, digestibility and energy values XX, besides being a food source for low cost and easy to obtain, we regarded as satisfying the inclusion of mesquite pods in the diet of cattle during long periods of drought could thus be a highly feasible approach to their use, especially for small producers in the semi-arid.

KEY WORDS: Cattle, toxic plants, *Prosopis juliflora*.





## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a possibilidade de associar árvores à pecuária já é conhecida. Esporadicamente, observa-se, em pastagens, o uso de árvores isoladas ou agrupadas para proteção do gado por iniciativa isolada dos produtores. Há espécies usadas tradicionalmente para associações com pastagens, como a faveira (*Parkia platycephalla*), no Piauí, e algaroba (*Prosopis juliflora*) na região semi-árida da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte (RAMOS et al. 1985). No entanto, apesar dos benefícios da introdução de árvores em pastagens, devem ser observados alguns cuidados como, por exemplo, evitar espécies arbóreas tóxicas ao gado.

No Nordeste brasileiro, distinguem-se basicamente três grandes regiões: a zona da mata, o agreste e o sertão. Nesta última, concentra-se a vegetação típica da caatinga, representando cerca de 70% da superfície total da Região Nordeste. A vegetação da caatinga é utilizada como pastagem na região semi-árida, devido ao valor forrageiro dessas espécies (LIMA & PASIECZNIK, 1986).

No Brasil, ultimamente o rebanho bovino tem alcançado recordes, sendo indicado como o maior rebanho comercial do mundo, porém os níveis produtivos do rebanho brasileiro também sofrem ingerências de fatores relacionados à alimentação animal, mais precisamente pela ingestão de vegetais tóxicos. Os efeitos que as plantas tóxicas causam à pecuária são constantemente apontados, não somente em nosso país como no exterior. As razões que levam os animais a ingerirem estas plantas nocivas, como a falta de pastagens adequadas e a escassez de alimentos, de modo geral, são os principais fatores responsáveis pelas intoxicações e morte dos mesmos. (ANDRADE & MATTOS, 1968).

Nesse contexto a produção pecuária brasileira deverá buscar por melhores resultados, considerando custo-benefício, devendo manter condicionado ao sistema de preocupação com a sanidade animal, que inclui necessariamente estratégias de manejo da propriedade e conhecimentos clínico-epidemiológicos dessas enfermidades. Uma prática importante é o manejo de pastagem, no qual está incluído a observação e eliminação de plantas tóxicas presentes na propriedade. Portanto, algumas plantas de importância à pecuária devem ser conhecidas visando evitar perdas de animais e conseqüentemente redução da produtividade.

Considerando que fazem cerca de 60 anos da introdução da *Prosopis juliflora* (algarobeira) na região com milhares de indivíduos espalhados por todas as zonas

agroecológicas do Nordeste e que em algumas regiões têm-se observado a incidência de uma doença denominada “cara torta”, atribuída ao uso exclusivo de vagens de algaroba e partindo do suposto que para evitar a intoxicação recomenda-se administrar rações contendo não mais do que 30% por no máximo seis meses de favas de algaroba (RIET-CORREA, 2003) e devido não haver informações precisas de sua utilização na dieta de bovinos em quantidades menores que cinquenta por cento por períodos prolongados.

O presente trabalho teve como objetivo relatar se há ocorrência da intoxicação pela utilização 30% de vagens de *Prosopis juliflora*, experimentalmente adicionada na ração de bovinos por um período de 12 meses, descrever os possíveis achados clínicos e histopatológicos progressivos da doença e desenvolver uma metodologia que ocasionalmente venha favorecer a utilização de suas vagens como uma alternativa viável para a pecuária no semi-árido nordestino.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações sobre a algaroba

*Prosopis juliflora* (algaroba ou algarobeira) é uma planta xerófica, cientificamente, pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae*.

Apresentam árvores perenes com crescimento rápido em geral de tamanho médio ou não muito raro, árvores de grande porte, que podem atingir uma altura de 20 metros, e seu tronco medindo pouco mais de um metro de diâmetro, em geral apresentam arbustos espinhosos e têm raízes profundas (GARIBALDI, 2008). Seu caule é considerado de alto potencial para o fornecimento de lenha e carvão.

De acordo com BURKART (1976), as folhas são bipinadas, opostas; folíolos pequenos, numerosos, geralmente opostos, lineares, oblongos, fusiformes. As flores são pequenas, de coloração amarelo-douradas. Quanto às dimensões das vagens, não há uma uniformidade em termos de comprimento e largura, em geral, o seu tamanho médio é de 25 cm de comprimento e 1 cm de largura, sendo atualmente conhecidas cerca de 44 espécies.



FIGURA 1 – *Prosopis juliflora* – Mãe d'água - PB



FIGURA 2 – Flores da *P. juliflora* (seta)

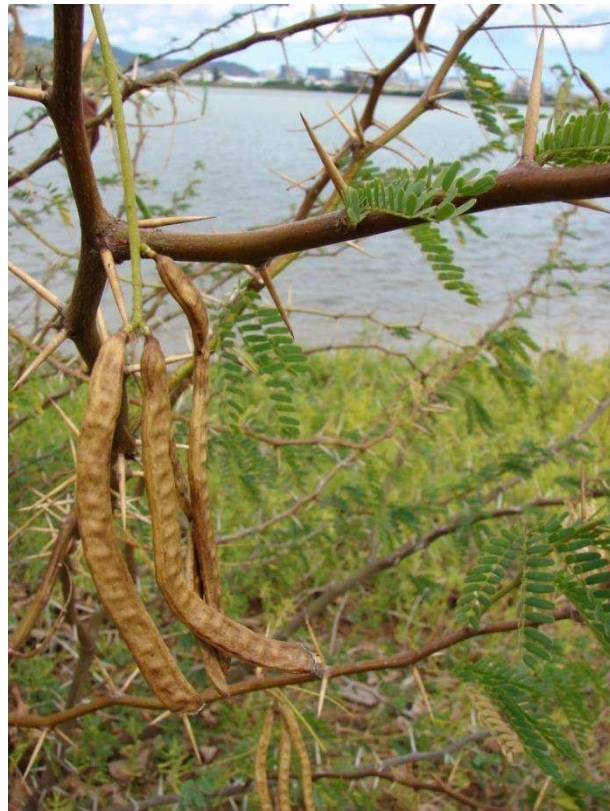


FIGURA 3 – Aspecto fenotípico da algaroba (folhas, espinhos e frutos)

A espécie predominante no Brasil é a *Prosopis juliflora*, sendo esta planta introduzida no Nordeste, a partir de 1942, em Serra Talhada, Pernambuco, com sementes procedentes de Piura, Peru (AZEVEDO, 1961). Duas outras introduções ocorreram em Angicos, Rio Grande do Norte: em 1947 com sementes do Peru e, em 1948, com sementes

do Sudão (AZEVEDO, 1955). A partir daí, devido sua excelente adaptação às regiões áridas, sua expansão para os demais estados da federação ocorreu, tanto através de plantios comerciais quanto da regeneração natural, e pela dispersão das sementes nas fezes dos animais.

Segundo TORRES (1991) existem no nordeste brasileiro seis espécies de plantas do gênero algaroba, são elas: *P. juliflora*, *P. palida*, *P. glandulosa*, *P. chillensis*, *P. alba* e *P. velutina*. Estima-se que existe cerca de 150.000 ha plantadas de algaroba e considerando-se a produção entre 100 e 200 kg/ha/ano de vagem sendo uma planta de singular importância para a atividade agropastoril, principalmente do semi-árido.

Há séculos, a algaroba vem sendo usada tradicionalmente pela população rural como alimento para humanos e animais. Algumas famílias nordestinas têm utilizado a farinha da vagem de algaroba na alimentação humana, estando algumas receitas para o fabrico de bolos, refrescos, aguardente, doces, biscoitos, geleias e outros alimentos descritos em MENDES (1987). Em geral, os frutos são utilizados como forragem, e podem ser consumidos no campo ou coletados para produzir rações para bovinos, ovinos, caprinos, suínos, aves e coelhos. Nas propriedades rurais as vagens são fornecidas aos animais, inteiras. A forma triturada ou em farelo é recente, sendo esta, uma tecnologia de melhor aproveitamento das proteínas da vagem, e uma das formas de se evitar a disseminação de sementes através das fezes dos animais. Quando trituradas, há maior aproveitamento das sementes por parte dos animais, pois é nelas que estão contidos os maiores teores de proteína. Animais alimentados com o fruto inteiro não assimilam grande quantidade de proteína quando comparados àqueles que se alimentam do fruto triturado (FIGUEIREDO, 1987).

A introdução da *P. juliflora* no Brasil tem sido objeto de polêmicas, pois opositores argumentam tratar-se de uma espécie invasora, que retira muita água do solo e se mal manejada, pode ser "extremamente agressiva", capaz de "invadir" "habitats" naturais e inibir a regeneração de outras espécies, reduzindo a biodiversidade vegetal. Para outros, por provocar perdas econômicas definidas como diretas ou indiretas devido quadros de intoxicações nos animais. Enquanto defensores a consideram um recurso florestal valioso por trata-se de um arbusto dotado de propriedades importantes como leguminosa fixadora de nitrogênio apresentando dessa forma, como uma de suas grandes vantagens a capacidade de resistência a longos períodos de estiagem, mantendo-se verde durante o ano toda, e alternativa de aproveitamento de solo pobre contribuindo para a revitalização do meio

ambiente, principalmente no reflorestamento de regiões consideradas críticas, evitando assim, o processo de desertificação (MENDES, 2001).



FIGURA 4 – Área não manejada e invadida por algarobeira.



FIGURA 5 - Algarobal planejado a partir de raleamento em Camalaú, PB

Estudos realizados também destacam sobre as potencialidades biotecnológicas da algaroba (*Prosopis juliflora*) para produção de fermento biológico. Meios naturais a exemplo do caldo de algaroba foram estudados com certo pioneirismo por ARRUDA (1994), cujos estudos direcionaram-se especificamente para produção de álcool. Segundo este autor, a fermentação alcoólica e a produção simultânea de levedura alimentar podem

desencadear outros processos com múltipla aplicação da vagem, dentre as quais: a seleção, isolamento e caracterização genética de novas linhagens de leveduras bem como a produção de alimentos e bebidas por fermentação, e outros produtos alimentícios de interesse econômico.

Ultimamente, trabalhos envolvendo crescimento de leveduras a partir da propagação de células têm sido empregando na biotecnologia tradicional. O caldo de algaroba, pelas condições nutricionais constatadas, principalmente açúcares, que conduzem ao processo de fermentação natural e ao mesmo tempo, os nutrientes e elementos contidos nesse meio, induzem à presença espontânea de agentes microbianos que por sua vez, atuam como precursores da fermentação. Como esses microrganismos, têm tendência natural em fermentar, logo levam a produção de álcool e paralelamente, a de fermento. Portanto, o caldo de algaroba, assim como os demais meios naturais, conduz a uma fermentação natural onde são formados simultaneamente, álcool e fermento resultando como um meio de cultivo alternativo comparável aos meios tradicionais de fermentação nas quais leveduras selecionadas e isoladas do caldo de algaroba pelo que pôde ser identificado geneticamente são dos gêneros *Saccharomyces* e *Zigossaccharomyces*, ambas com funções distintas, e largamente usadas nos processos de fermentação (BELLUCO, 2001).

Estudos realizados com o objetivo de determinar a composição química do fruto de diversas espécies de algaroba procedentes da Bolívia e Brasil, como também caracterizar a goma presente na farinha das vagens e seu possível efeito hipoglicêmico em camundongos diabéticos, mostraram que o uso de doses de gomas entre (25 e 50% de fibra solúvel) sobre o valor na ração padrão, apresentaram resultados satisfatórios no controle da polifagia dos ratos diabéticos. (GONZALEZ GALAN 2009-Universidade Federal de Lavras - Minas Gerais).

Portanto, desde a sua implantação no Brasil em 1942, até os dias atuais, devido à combinação de baixos custos, alta palatabilidade, digestibilidade e valores nutricionais, principalmente das vagens, estas vêm sendo usadas como suplemento ou parte integrante de rações na alimentação de diversas espécies de animais domésticos, especialmente para a região do semi-árido nordestino.

## **2.2 Evolução do estudo da *Prosopis juliflora* como causa de intoxicação**

*Prosopis juliflora* tem sido uma alternativa viável para solucionar os problemas advindos da seca concernentes à nutrição animal, principalmente pela riqueza nutricional de seus frutos (LIMA, 1986).

No entanto, o consumo de vagens de algaroba, como elemento principal da ração animal tem sido reconhecida no Nordeste do Brasil como causa de uma doença em bovinos levando-os a um estado clínico-patológico denominado de “cara-torta”, devido ao desvio lateral de cabeça que o animal realiza para manter o alimento na boca durante a mastigação. Anteriormente, porém, já se havia comprovado que a ingestão das vagens dessa planta era responsável pela ocorrência de uma enfermidade denominada "jaw and tongue trouble" em bovinos nos Estados Unidos e "coquera" em caprinos no Peru (BACA, 1967).

Em 1946, nas ilhas havaianas foi relatado sobre as alterações clínicas provocadas pelo consumo de *P.juliflora* em bovinos, os animais acometidos pastavam em áreas com predominância de algaroba e escassez de outras forragens (HENDERESHOT, 1946). Nas ilhas Molakai no Havai foi relatado um surto que acometeu 75 bovinos, que ingeriram durante alguns meses, vagens de algaroba como única fonte de alimento, os sinais clínicos evidenciados característicos da intoxicação foram atrofia muscular, principalmente dos masseteres, protusão de língua e emagrecimento progressivo.

No Brasil, a doença acometendo bovinos foi descrita na região semi-árida na década de oitenta quando criadores observaram sintomas clínicos da doença, sendo na Paraíba em 1981, Rio Grande do Norte (1986) e em 1994 no Pernambuco (DANTAS& MENEZES 1994).

Essa patologia foi induzida experimentalmente caracterizada em bovinos, observando-se, entre outros, danos no sistema nervoso central (SNC), caracterizados por congestão das meninges, áreas de hemorragia difusa e lesões características de espongirose e gliose (FIGUEIREDO et al. 1995). Mais tarde, caprinos e bovinos intoxicados em condições experimentais semelhantes também apresentaram lesões no sistema nervoso central.

Em bovinos a doença ocorre após a ingestão de ração contendo no mínimo 50% de frutos de algaroba por um período de três meses (MENEZES 1998). Os caprinos são mais resistentes e têm que ingerir concentrações de 60%-90% de frutos na alimentação por um período de aproximadamente 210 dias para apresentar sinais clínicos. Foi observado que havia degeneração Walleriana do nervo trigêmeo e atrofia por deservação dos músculos da mastigação. Na microscopia eletrônica as lesões foram caracterizadas por fina e espumosa vacuolização do pericário de neurônios do núcleo trigeminal e, ocasionalmente, nos núcleos motor do trigêmeo. (TABOSA et al. 2000a).



Foi realizado um estudo nas microrregiões do Seridó Oriental e Seridó Ocidental do Rio Grande do Norte no ano de 2005 para determinar a ocorrência de diferentes intoxicações por plantas, onde foram entrevistadas 82 pessoas, entre produtores e técnicos em 17 municípios. Um entrevistado relatou que no fim da estiagem, em um rebanho de 200 bovinos, 8 adoeceram e 4 morreram após um curso clínico de até um ano, os demais se recuperaram em outro pasto fora do baixio onde predominava a algaroba. Outro produtor relatou que nas secas de 1993 e 1994, de 120 bovinos e 50 ovinos, adoeceram 65 e morreram 60 bovinos, após curso clínico de até três meses; nos ovinos não foram observados sinais clínicos. Diversos entrevistados mencionaram que são observados casos esporádicos da doença em áreas de baixio onde a planta predomina. Casos menos freqüentes são observados em caprinos nessas mesmas áreas. No entanto, nenhum produtor mencionou a ocorrência da doença em ovinos.

Para estudar as lesões provocadas pela ingestão das vagens de *Prosopis juliflora* em bovinos, foi feito um estudo experimental realizado pela Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos- PB, onde utilizou-se 8 bovinos machos com idade de oito a doze meses. Estes foram alimentados com uma ração contendo cerca de 50% e 75% de matéria seca de vagens de algaroba. Em torno de 45-75 dias após a ingestão, todos os animais que consumiram as vagens apresentaram sinais clínicos característicos da “caratorta”. Após 200 dias, todos os bovinos foram eutanaziados e observadas as lesões histologicamente. A avaliação histológica revelou vacuolização e perda de neurônios do núcleo de nervos craniais, degeneração walleriana nos nervos craniais, atrofia por degeneração do nervo do músculo masseter e músculos da mastigação. E a análise por microscopia eletrônica revelou mitocôndrias de neurônios do núcleo trigeminal apresentando suas cristas dispersas periféricamente e desintegradas (TABOSA et. al 2006).

Um levantamento realizado sobre surtos de intoxicações por plantas em ruminantes e equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV), do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba, no período de 2000-2007, constatou que em 7,4% dos diagnósticos realizados pelo LPV em bovinos foram intoxicações por plantas, destes foram diagnosticados três casos de intoxicação por *P. juliflora*, onde todos os animais tinham tido acesso a grande quantidade de vagens de algaroba no campo ou eram alimentados quase que exclusivamente com vagens da planta e apresentavam sinais característicos da doença.

Pesquisas feitas no período entre 2006 a 2007 no Sertão e Agreste de Pernambuco descrevem-se três surtos de intoxicação por vagens de *Prosopis juliflora* na região semi-

árida, em animais pastejando áreas invadidas pela planta ou que ingeriram as vagens como alimento concentrado. As informações obtidas a partir das fichas de acompanhamento e resgatadas informações relacionadas aos dados epidemiológicos, obtido junto aos proprietários, além dos achados Clínicos e Laboratoriais apontaram, que um dos surtos afetou um rebanho de 1206 bovinos, dos quais adoeceram 112 e morreram 84, enquanto os demais se recuperaram e ganharam peso após a retirada das vagens da alimentação. Os outros dois surtos ocorreram em duas fazendas nas quais a doença ocorria esporadicamente e foram observados em casos individuais, porém, ambos apresentaram sinais clínicos e histopatológicos característicos da doença.

### **2.3 Achados clínicos e laboratoriais**

Os sinais clínicos, mais evidentes durante a ruminação, são característicos de disfunção de nervos cranianos, principalmente devido à degeneração e desaparecimento dos neurônios do núcleo motor do trigêmeo (TABOSA et al. 2000 b, 2006). Observa-se relaxamento da mandíbula, desvio lateral da cabeça durante a mastigação e ruminação, movimentos involuntários da língua, dificuldade de apreensão dos alimentos, salivação profusa, disfagia e atrofia dos músculos masseteres. Além disso, atonia ruminal, anemia, edema submandibular, e emagrecimento progressivo são, também, observados (RIET-CORREA et al. 2002,2003).

Nos achados de necropsia são observados diversos graus de desnutrição e atrofia dos músculos da mastigação, o que proporciona um aspecto pálido e firme ao tecido muscular. Histologicamente, além da atrofia muscular, observa-se degeneração dos neurônios de alguns núcleos do tronco encefálico (núcleo motor do trigêmeo e dos núcleos facial, hipoglosso e oculomotor). Essa degeneração caracteriza-se por fina vacuolização do pericário dos neurônios, que assumem aspecto espumoso com dissolução da substância de Nissl e degeneração axonal (RIET-CORREA et al. 2003, TABOSA et al. 2006). Na microscopia eletrônica, os neurônios dos núcleos do trigêmeo apresentam marcante aumento de volume das mitocôndrias, com a crista mitocondrial deslocada periféricamente e desintegrada (TABOSA et al. 2006). As lesões histológicas dos músculos caracterizam-se por atrofia de deservação e substituição das fibras musculares por tecido conjuntivo e tecido adiposo (RIET-CORREA et al. 2003, TABOSA et al. 2006).

As vagens de *Prosopis juliflora* contêm alcalóides piperidínicos, mas é incerto se essas substâncias são responsáveis pela vacuolização neuronal, que é a lesão primária da intoxicação. Estas lesões associadas às lesões neuronais sugerem que há uma perda

progressiva de neurônios, que é, provavelmente, responsável pela irreversibilidade da doença. A perda da função neuronal, por degeneração e/ou desaparecimento, causa atrofia neurogênica bilateral, responsável pelos sinais crônicos irreversíveis. É provável que a recuperação observada em casos iniciais da doença deva-se a reversão da degeneração neuronal (dilatação mitocondrial) antes da morte das mesmas e à estabilização e recuperação da atrofia muscular, antes de ocorrer perda de fibras e substituição por tecido gorduroso ou fibroso (Dados não publicados).

#### **2.4 Os alcalóides, principais componentes ativos da *P. juliflora***

De acordo com os últimos trabalhos relatados, a análise fitoquímica das vagens de algaroba levou ao isolamento de uma substância que depois de submetida à caracterização estrutural utilizando técnicas espectroscópicas usuais, foi identificada como “*juliprosopina*”, um alcalóide piperidínico, amplamente divulgado na literatura, como toxina, pelos seus efeitos considerados nocivos. Os alcalóides piperidínicos têm obtido destaque em diversos estudos farmacológicos, sendo estes sugeridos como os prováveis constituintes químicos causadores dos efeitos tóxicos provocados pela ingestão desta planta.

Os principais alcalóides piperidínicos já caracterizados em diferentes partes da *P. juliflora* são a juliprosina, juliprosinina, juliprosopina (juliflorina), julifloridina, julifloricina e juliflorinina.

A atividade tóxica de alcalóides piperidínicos, isolados de frutos da *P. juliflora*, em culturas celulares foi estudada por BATATINHA (2005). Estudos mais direcionados com a finalidade de determinar os efeitos *in vitro* das moléculas de alcalóides *P. juliflora* em células do SNC. O estudo do efeito citotóxico do ETA e frações contendo alcalóides F29/30; F31/33; F32 e F34/35 sobre a integridade da membrana celular, através do teste de exclusão ao corante vital azul de tripan revelou que tanto o ETA, quanto as frações de alcalóides induzem lesão de membrana celular em células neuronais. Para as contagens de neurônios tratados com ETA a 3 e 10µg/mL; F29/30 a 10µg/mL; F31/33 a 3 e 10µg/mL e F32 a 1; 3 e 10µg/mL não foi encontrada nenhuma célula capaz de excluir o corante azul de tripan, o que significa que houve lesão de membrana plasmática em 100% das células expostas a estes tratamentos (SILVA,2008).

Segundo, TABOSA et al. (1998) sugerem que o efeito tóxico das vagens da algaroba possa estar relacionado aos alcalóides piperidínicos. A partir das vagens, foi extraída uma mistura de alcalóides, a qual foi testada intraperitonealmente em camundongos albinos suíços. A mistura total na dosagem de 6,25 mg/kg e a juliprosopina,

isolada por cromatografia, na dose de 25 mg/kg, inoculadas por via intraperitoneal, mataram 100% e 80% dos camundongos, respectivamente.

Estudos prévios têm revelado que um extrato bruto contendo alcalóides do fruto da *P. juliflora* atua lesionando a membrana plasmática de células do sistema nervoso central (tumor glial, linhagem GL-15) desde concentração bastante baixa, 0,03 µg/mL, após 24 horas de exposição (HUGHES et al., 2005).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi do tipo experimental exploratório descritivo, com abordagem quantitativa e teve por base avaliar o grau de intoxicação de *Prosopis juliflora* em bovinos.

A pesquisa foi realizada no Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos – PB. A população desta pesquisa foi constituída por dois bovinos, machos sem Raça Definida (SRD), pesando em média 130 kg. O vigente projeto foi financiado pelo INCT (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia). Os bovinos foram alimentados diariamente por um período de 12 meses mediante o fornecimento de uma dieta balanceado a base de 0,5% de concentrado (farelo de milho), 30% da matéria seca das vagens de algaroba , feno de capim tifton e água à vontade.

As vagens de algaroba utilizadas foram originárias de regiões próximas a ao município de Picuí- PB, coletadas após queda natural.

A Figura 4 mostra o mapa do Estado da Paraíba onde se localizam os principais municípios produtores de algaroba. Essas microrregiões abrangem principalmente as áreas do Curimataú, Sertão e Cariri paraibano.

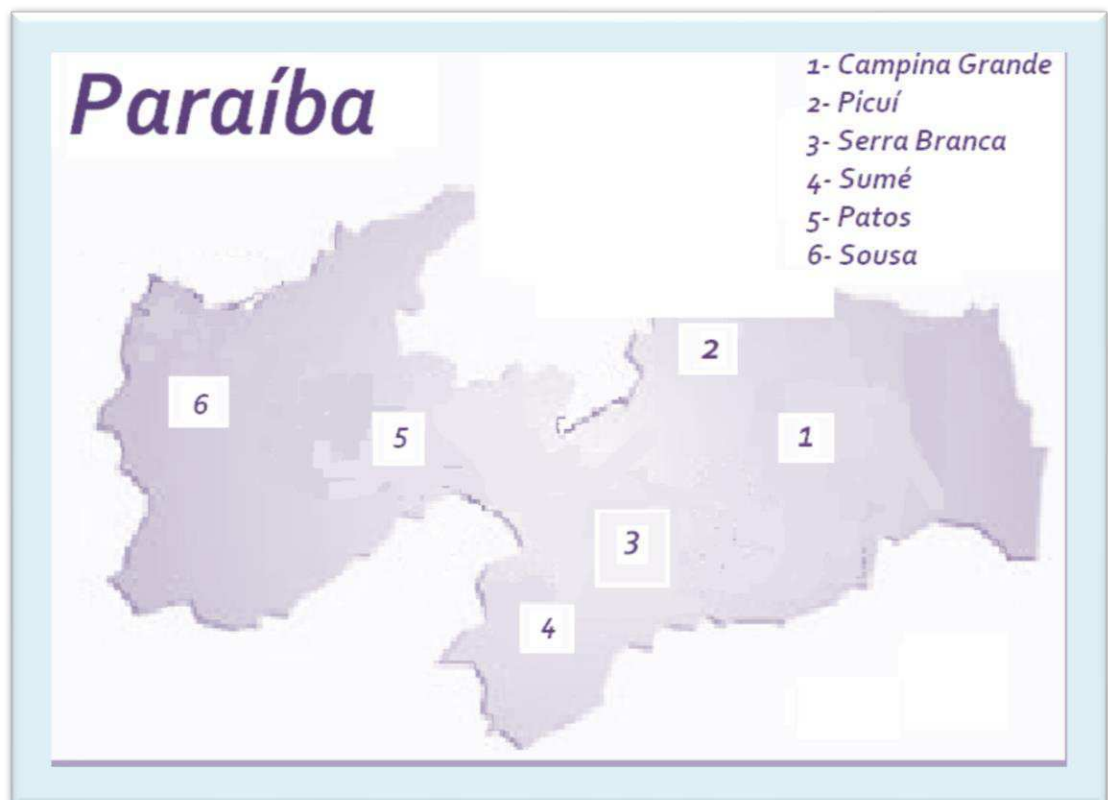


FIGURA 6 – Mapa do Semi-Árido do Estado da Paraíba

Para as análises de matéria seca das vagens experimentais foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C e após secagem foram triturado, resultando no teor de matéria

seca de 78,4%. O referido procedimento foi realizado no laboratório de nutrição animal da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos.

Os animais foram inicialmente pesados e alojados em currais separados. A quantidade de vagens ingerida foi calculada de acordo com o teor de matéria seca contida na vagem, porcentagem de concentrado ingerida (0,5%) e com o peso de cada animal. Durante todo o experimento os animais eram rigorosamente alimentados com vagens de *Prosopis juliflora* todos os dias pela manhã, inclusive aos finais de semana.

As informações necessárias ao estudo foram obtidas mediante o exame clínico do sistema nervoso por meio de testes dos pares de nervos cranianos, onde foram realizados mensalmente no período de dezembro de 2009 a dezembro de 2010. Para controle eram avaliados animais bovinos que se encontravam na clínica de grandes animais do hospital veterinário que não apresentava diagnóstico sugestivo ou confirmado de comprometimento do sistema nervoso central. Os animais eram pesados mensalmente para reajuste de a dieta alimentar. Após esse período os animais foram eutanaziados para estudo de alterações macroscópicas e histológicas.

Para análise histopatológica, as amostras dos dois bovinos necropsiados (Bovinos 1 e 2) foram remetidas ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) do Hospital Veterinário (HV) da UFCG, Campus de Patos. O encéfalo, a medula espinhal e os fragmentos dos músculos masseteres foram fixados em solução tamponada de formol a 10% na íntegra, posteriormente foram realizados cortes transversais do sistema nervoso central abrangendo cortes do córtex frontal, occipital e parietal, tálamo, mesencéfalo, núcleos da base, cerebelo, bulbo, ponte, hipocampo, gânglio trigêmeo e hipófise e medula espinhal cervical, torácica e lombar. Em seguida, foram incluídos em parafina, cortados com uma espessura de 5 micrômetros, corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e observados no microscópio.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi observada ausência de lesões anatomo-histopatológicas significativas nos bovinos testados experimentalmente com a ingestão de 30% de matéria seca pelos frutos de algaroba durante o período de um ano, no semi-árido paraibano.

As Figuras 7 e 8 demonstram a integridade neuronal de todas as estruturas descritas como comprometidas em casos de intoxicação por *P. juliflora*.

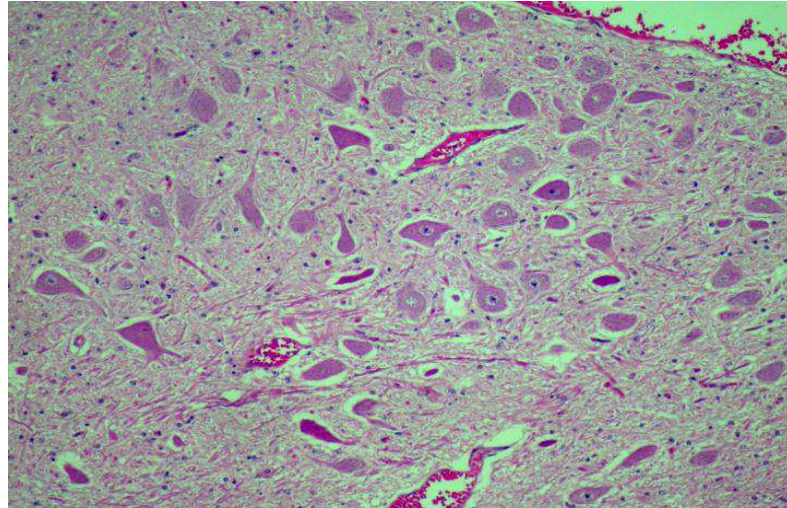


FIGURA.7. Tronco encefálico. Integridade da substância de Nissl (setas).

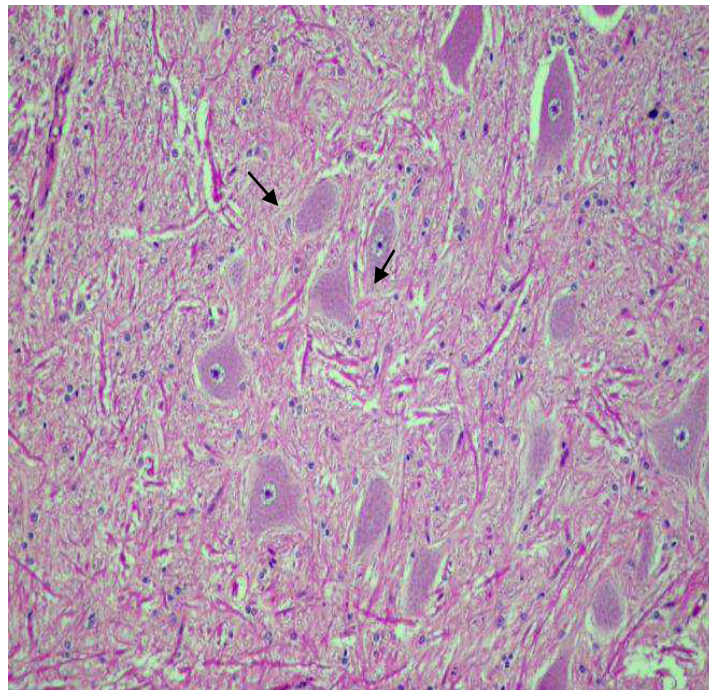


FIGURA.8. Neurônios do núcleo do nervo hipoglossal. Estruturas neuronais preservadas.

Os resultados desta pesquisa mostram que 30% de algaroba não reproduziram clinicamente nem histologicamente a doença “cara torta”.

Segundo, RIET- CORREA (2007), bovinos ingerindo alimento com 50% e 100% de favas apresentam sinais clínicos após 45 - 110 dias de ingestão.

Trabalho experimental realizado por TABOSA et al. (2006) apontou que quando administrados 50% e 75% de farelo de algaroba na dieta de bovinos, por um período de 210 dias, os animais apresentaram sinais clínicos discretos e lesões histológicas nos neurônios do núcleo motor do trigêmeo.

O diagnóstico de intoxicação por vagens de *P. juliflora* foi baseado nos sinais clínicos e alterações histológicas características (TABOSA et al., 2000, 2004, 2006).

A presença de vacúolos em corpos de neurônios e axônios tem sido descrita na literatura como alteração histológica presente em intoxicações de animais por plantas neurotóxicas que apresentam alcalóides como princípio ativo (FURLAN et al., 2008) dentre elas a *P. juliflora* (FIGUEIREDO et al., 1995; TABOSA et al., 2000, 2006). As favas de *P. juliflora* contêm alcalóides piperidínicos, porém não se sabe, se estas substâncias são responsáveis pela vacuolização neuronal, lesão primária da intoxicação (RIET-CORREA, 2007).

As alterações fenotípicas visualizadas a seguir representam características histopatológicas típicas da intoxicação por *P. juliflora*.

A figura 9 revela alterações no tronco encefálico, onde se observam neurônios do núcleo motor do nervo trigêmeo com distribuição irregular da substância de Nissl e esferóides axonais. Nas figuras 10 A e 10 B, observa-se vacuolização fina difusa do pericário de neurônios dos núcleos dos nervos cranianos que na microscopia eletrônica corresponde à dilatação das mitocôndrias.

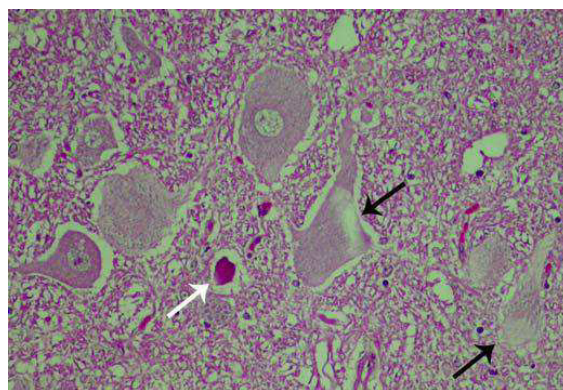


FIGURA.9. Tronco encefálico. Núcleo motor do nervo trigêmeo. Substância de Nilss (setas pretas) e esferóides axonais (seta branca). HE, Obj. 20x



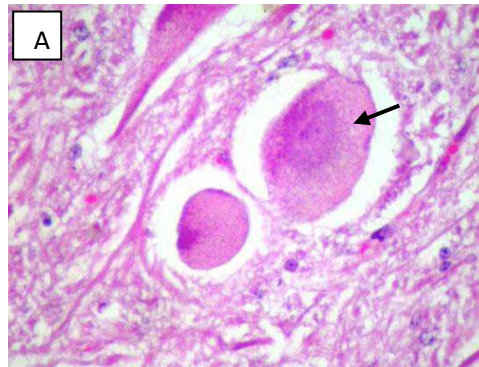
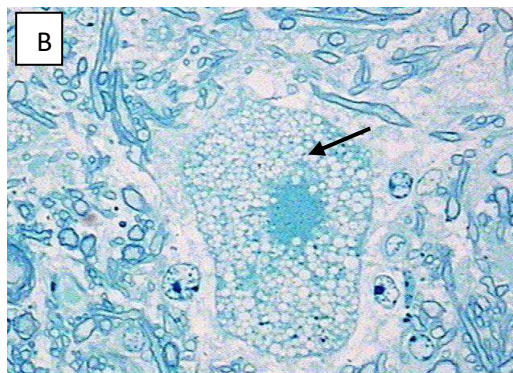


FIGURA. 10. Tronco encefálico. Neurônios do núcleo do nervo hipoglosso com vacuolização neuronal (setas). Obj.40x. Microscopia ótica (A) microscopia eletrônica (B).



Os resultados de desempenho de ganho de peso dos bovinos alimentados durante o experimento recebendo rações contendo 30% da matéria seca das vagens de algaroba encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1:** Peso inicial, mensal e final dos bovinos alimentados com algaroba.

ANO	2009	2010											
Ganho de peso mensal/kg	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
<b>Bovino 1</b>	132	157	183	205	223	242	258	276	298	317	339	360	381
<b>Bovino 2</b>	116	138	153	168	185	202	218	235	252	273	291	310	333

O ganho de peso mensal dos bovinos testados experimentalmente, pode ser observado no Gráfico 1 .

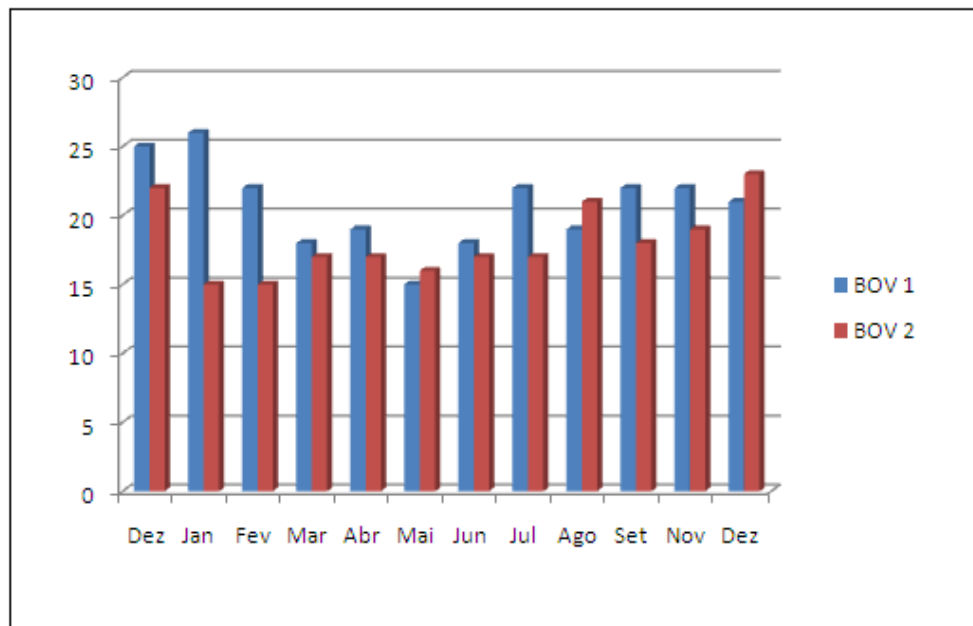


Gráfico 1: Ganho de peso mensal (em Kg) dos bovinos.

Ao avaliar o ganho de peso dos bovinos citados no gráfico 1 podemos considerar como satisfatório a média de ganho de peso mensal de 20kg para o bovino 1 e de 18 kg para o bovino 2, além de se comprovar que os animais não apresentaram nenhum sinal de intoxicação, o ganho de peso na ingestão de 30% da matéria seca poderá ser uma alternativa para se reduzir os gastos com concentrado adicionado nas rações animais. Visto que suas vagens apresentam elevado valor alimentício, digestibilidade e palatabilidade podendo substituir o milho e o farelo de trigo nas rações. As vagens apresentam, em geral, 13% de proteína bruta, sendo que as sementes, isoladamente, concentram 34 a 39% do total de proteína. Estudos no Brasil mostraram que o farelo de vagem de algaroba poderia substituir até 600 g/kg do farelo de trigo para vacas em lactação, esses estudos indicaram aumento do ganho de peso e produção de leite com o aumento na proporção do farelo da vagem.

Levando em consideração o metabolismo dos ruminantes, estes exigem uma dieta com no mínimo 7% de proteína. Além disso, é preciso fornecer aos microorganismos do rumem condições necessárias a uma máxima fermentação, sendo necessário fornecer a eles condições necessárias que incluem principalmente, nitrogênio, carboidratos e minerais.

Quanto maior for a fermentação maior será a produção de microorganismos e assim, melhor será o aproveitamento de proteínas de alto valor biológico.

A tabela 2 mostra que em estudos já publicadas, a algaroba apresenta todos esses componentes, principalmente açúcares, que conduzem ao processo de fermentação natural.

**Tabela 2:** Composição físico-química das vagens da algaroba

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/100g)</b>
<b>Umidade</b>	12,53
<b>Proteína bruta</b>	12,92
<b>Fibra bruta</b>	21,30
<b>Açúcares Redutores</b>	2,52
<b>Açúcares Não Redutores</b>	43,52
<b>Açúcares Totais</b>	46,04
<b>Carboidratos</b>	65,80
<b>Lipídios</b>	3,20
<b>Cinzas</b>	4,15
<b>V.C.T.*</b>	333,00 Calorias

Fonte: FIGUEIREDO (1984)

## 5 CONCLUSÕES

Á luz dos resultados encontrados nesse trabalho, associada a sua composição química, valores energéticos e de digestibilidade, além de ser uma fonte alimentar de baixo custo e fácil obtenção, é possível concluir que as vagens de algaroba quando ingeridas em dietas contendo 30% da matéria seca por um período de até um ano, não causa nenhum sinal clínico nem histopatológico da doença “cara torta”, podendo, portanto, ser uma perspectiva altamente viável sua utilização na alimentação de bovinos principalmente aos pequenos produtores no semi-árido paraibano.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO. 1961 et al., M. A. Toxicologia: *Prosopis juliflora* em ruminantes. **Plantas tóxicas**, 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 81-118p.

AZEVEDO, C. F. **Algarobeira na alimentação animal e humana**. Empresa de Pesquisa Agro-Pecuária do Rio Grande do Norte – EMPARN Natal, 1995, 63p.(Informativo Técnico).

ASSIS T. S.; MEDEIROS R.M.T.; RIET-CORREA F.; GALIZA G.J.N.; DANTAS A.F.M. & OLIVEIRA M.D. 2010. Plant poisonings diagnosed in ruminants and horses and estimation of the economical losses in Paraíba. **Pesq. Vet. Bras.** 30(1):13-20, janeiro 2010.

ARRUDA, D. T. **Viabilidade técnico-econômica da produção de etanol e ração a partir da algaroba no semi-árido da Paraíba**. 1994. 97f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção). Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB.

BACA, S.F.; VALLENAS, A.; NOVOA, C. Estudio experimental de la “Coquera” en caprinos. **Rev. Fac. Med. Vet.** v.18, n.20:131-159, 1967.

BATATINHA, M.J.M.; TARDY, M.; VELOZO, E.S. and COSTA, S.L. Cytotoxic effects of an extract containing alkaloids obtained from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glioblastoma cells. **Rev. Bras. Saúd. Prod. An.** v.6, 31-41, 2005.

BELLUCO, A. E. S. Alterações fisiológicas e de composição em *Saccharomyces cerevisiae* sob condições não proliferantes. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ **Portal do Conhecimento** – Piracicaba, SP, 2001.

CAMPELO, R. **Algarobeira: Alternativa para o semi-árido Brasileiro**. Editora da Universidade Federal de Alagoas-EdiUFAL Maceió/AL, 1984. 58p.

DANTAS J.R.F: Cara Torta – Uma doença que atinge bovinos da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte – Brasil. **Revista dos Criadores** 46:32, 1996.

DANTAS J.R.F. & MENEZES R.V.1994. UFPB, UFBA e USP **estudam "cara torta"**, doença que acomete bovinos na Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Boletim Informativo do CRMV-PB, jan/fev.

FIGUEIREDO, L.J.C.; FERREIRA, M.M.; TÁVORA, J.P.F.; DANTAS, J. SIMÕES, S.D. **Estudo clínico e anátomopatológico da doença "cara torta" em bovinos no nordeste brasileiro**. Arq. Med. Vet. – UFBA, v.18, p.175-183, 1995.

FIGUEIREDO, P. **Algaroba e seus aspectos econômicos**. Rio de Janeiro, 1984. 32p. Associação Brasileira de Algaroba, (Boletim Técnico)

FIGUEIREDO, A. Industrialização das vagens de algaroba (*Prosopis juliflora* Sw DC) visando a produção da goma da semente. **Ver. da Ass. Bras. de Algaroba**, Mossoró, v.1, n.1, p.7-34, 1987

GOMES, P. **Algarobeira: Uma planta altamente nectarífera**. Rio de Janeiro, 1991, 82p. Ministério da Agricultura, (Informativo Técnico).

GONZALEZ GALAN, ABEL. **Estudo da farinha da goma de algaroba (*Prosopis spp.*)** 2009. 166p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG.

DERSHOT, J. M. Ketosis in the Hawaiian islands. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 108, p. 74 - 75, 1946.

HUGHES, J.B.; SILVA, V.D.A.; SILVA, A.R.; SOUZA, C.S.; SILVA, A.M.M.; VELOZO, E.S.; BATATINHA, M.J.M.; COSTA, M.F.D.; TARDY, M.; ELBACHÁ, R.S.; COSTA, S.L. Cytotoxicity effect of alkaloidal extract from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glial cells. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci**, v.43, p.50-58, 2006.

IBGE 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://IBGE.gov.br>. Acesso em 10 jan. 2009.

Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental 2008. <[http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Prosopis\\_juliflora.htm](http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Prosopis_juliflora.htm)>. Acessado em agosto de 2009.

LIMA E.; RIET-CORREA F.; AMORIN S.L. & SUCUPIRA JUNIOR G. 2004. Intoxicação por favas de *Prosopis juliflora* (algaroba) em caprinos no nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 24(Supl.): 36-37

LIMA, P.C.F.; PASIECZNIK, N.M. Algaroba.– **planta invasora ou recurso florestal valioso?** Disponível em: HDRA- The Organic Organisation. <[http://www.gardenorganic.org/pdfs/international\\_programme/ProsopisBrazilBrief.pdf](http://www.gardenorganic.org/pdfs/international_programme/ProsopisBrazilBrief.pdf)>. Acessado em: 02/04/2008.

MEDEIROS, R.M.T.; NOBRE, V.M.T. Neurohistologic and ultrastructural lesions in cattle experimentally intoxicated with the Plant *Prosopis juliflora*. **Vet. Pathol.**, v.43, p.695–701, 2006.

MENDES, B. V. **Plantas das caatingas**. Fundação Guimarães Duque/Fundação Vingun Rosado. Coleção Mossoroense, Serie “C”, v.12, 2001.192p.

RIET-CORREA F.; TABOSA I.M.; AZEVEDO E.O.; MEDEIROS R.M.T.; SIMÕES S.V.D.; DANTAS A.F.M.; ALVES J.; NOBRE V.M.T.; ATHAYDE A.C.R.; GOMES A.A. & LIMA E.F. 2003. Doenças dos ruminantes e eqüinos no semi-árido da Paraíba. **Semi-Árido em Foco** 1:4- 111.

RIET-CORREA F.; MEDEIROS R.M.T. & DANTAS A.F.M. 2006. **Plantas Tóxicas da Paraíba**. CSTR/UFCG, SEBRAE/PB, Patos. 58p.

RAMALHO NETO, C. E. **Caracterização e identificação genética de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* usada na produção de álcool**. Maceió, AL, 2005.21p. (Informativo Laboratório de Biotecnologia Avançada da UFAL)

SILVA, C. G. **Desenvolvimento de um sistema micro-industrial para obtenção de aguardente bidestilada de algaroba (*Prosopis juliflora* Sw DC)** 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Centro de Ciências e Tecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande-PB.

SUASSUNA, J. **Algarobeira – produção e produtividade.** Recife, 2007, 6p. (Boletim da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA 2007).

SILVA, D.S. **Substituição progressiva do farelo de trigo pela vagem da algaroba na alimentação de bovinos em engorda** [dissertação]. Areia (PB): Universidade Federal da Paraíba; 1981.

SILVA D.M.; RIET-CORREA F.; MEDEIROS R.M.T & OLIVEIRA O.D. 2006. Plantas tóxicas para ruminantes e eqüídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.** 26(4):223-236.

SILVA, V.D.A. **The neurotoxicity of alkaloids extracted from *Prosopis juliflora* Swartz. D.C. leaves on neuron and neuron/glia cell primary cultures.** Salvador, Bahia, 2008. 46p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2008.

TOKARNIA C.H.; DOBERIEINER J. & PEIXOTO P.V. 2000. **Plantas Tóxicas do Brasil.** Editora Helianthus, Rio de Janeiro, p.120-142.

TABOSA, I.M. **Intoxicação experimental de vagens de algaroba *Prosopis juliflora* Sw. DC) em caprinos.** 2000. 121f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TABOSA, I.M.; SOUZA, J.C.A.; GRAÇA, D.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N.; RIET-CORREA, F. Neuronal vacuolation of the trigeminal nuclei in goats caused by ingestion of *Prosopis juliflora* pods (Mesquite beans). **Vet. and Hum. Toxicol.** v.42 n.3, p.155-158, 2000.

TABOSA, I.M.; RIET-CORREA, F.; BARROS, S.S.; SUMMERS, B. A.; SIMÕES, S.V.D.; MEDEIROS, R.M.T.; NOBRE, V.M.T. Neurohistologic and ultrastructural lesions in cattle experimentally intoxicated with the plant *Prosopis juliflora*. **Vet. Pathol.** v.43, p.695–701, 2006.

TABOSA, I.M.; PAMPLONA, F.V. & QUINTANS-JR, L.J. Isolamento e identificação de juliprosopina, um dos constituintes tóxicos da *Prosopis juliflora* Sw. D.C **Anais da Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG; 1998.** [Resumo].

TABOSA, I.M. **Intoxicação experimental pela ingestão de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora* Sw. DC) em caprinos.** [dissertação]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais. 2000.

TAPIA, A.; FERESIN, G.E.; BUSTOS, D.; ASTUDILLO, L.; THEODULOZ, C.; SCHMEDAHIRSCHMANN, G. **Biologically active alkaloids and a free radical scavenger from *Prosopis* species.** Jour. of Ethnopharm. v.71, p.241-246, 2000.