

Avaliação do efeito anti-helmíntico e das alterações metabólicas em búfalos (*Bubalus bubalis*) com administração da torta de neem e do alho desidratado no Sul do Paraná

Evaluation of the anthelmintic effect and metabolic changes in buffaloes (*Bubalus bubalis*) with the administration of neem cake and dehydrated garlic in the Southern of Parana State

LIPINSKI, Leandro Cavalcante¹; MARTINEZ, José Lino²; SANTOS, Marcus Vinícius Rezende³; FERREIRA, Joelma Nunes³; PFAU, Diogo Roberto³.

1 Professor Adjunto da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR - Brasil, leandrolipinski@yahoo.com; 2 Pesquisador Adjunto ao Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Curitiba/PR - Brasil; 3 Acadêmicos do Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais – CESCAGE, Ponta Grossa/PR - Brasil

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito anti-helmíntico e as alterações metabólicas em búfalos (*Bubalus bubalis*) com a administração de torta de neem e alho desidratado. Os animais receberam, diariamente, junto com a suplementação de milho moído com minerais, 2g de torta de Neem e 2g de alho desidratado durante 6 meses. Os animais tiveram fezes e sangue coletados antes do início do tratamento e em mais dois momentos posteriores. Foram realizadas a técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e análises laboratoriais hematológicas e bioquímicas. Os animais tiveram redução significativa do OPG ($p < 0,01$) quando comparando a primeira coleta com as demais, sendo na última avaliação encontrado os menores valores. Não observou-se alterações hematológicas e bioquímicas no período em que foram administrados a torta de neem e o alho desidratado. Nestas condições experimentais, o uso simultâneo do alho desidratado e da torta de neem foi eficiente no controle de endoparasitoses em búfalas leiteiras não apresentando toxicidade para os animais.

PALAVRAS-CHAVE: Agroecologia, Búfalos, Endoparasitoses, Fitoterápicos.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the effect of neem cake and dehydrated garlic as anthelmintic and metabolic disorders in buffaloes (*Bubalus bubalis*). The animals received daily supplementation with ground corn plus minerals with 2g of neem cake and 2g of dehydrated garlic during 6 months. Feces and blood were collected in the beginning of the test and two more times later. Helminth eggs per gram of feces counting technique (EPG), blood chemistry and hematologic tests were utilized. The animals had a significant reduction of EPG ($p < 0.01$) in comparison with the beginning of the test. The last evaluation showed the smallest values. At the end of this study, neem cake and dehydrated garlic caused no hematological and biochemical disorders in dairy buffaloes. Under these experimental conditions, dehydrated garlic and neem cake were efficient in control of adult gastrointestinal nematodes in buffaloes and the animals showed no toxicity.

KEY WORDS: Agroecology; Buffaloes, Endoparasites, Phytotherapics.

Introdução

A pesquisa científica de produtos oriundos de espécies vegetais conhecidas na medicina humana popular e sua aplicação na medicina veterinária faz-se necessária quando objetivam-se produções pecuárias em sistemas orgânicos, buscam-se soluções que produzam menos resíduos para o consumidor final, visa-se o desenvolvimento de tecnologias de produção pecuária sustentável, além de valorizar-se a biodiversidade, abrindo-se caminho para atividades econômicas com preservação de ambientes naturais.

A utilização do tratamento alternativo com plantas medicinais, na área da veterinária não é uma prática corrente. Almeida et al. (2006) constataram em sua pesquisa que 73,9 % dos estudantes de medicina veterinária entrevistados, conhecem a fitoterapia e apenas 36,2 % usaram esta forma de terapêutica com resultado eficaz. Segundo Rochfort et al. (2008) o uso de biotivos de plantas na saúde animal tem tido um importante crescimento nas pesquisas.

Muitos dos métodos de controle alternativo pesquisados, embora promissores apresentam restrições ou limitações para uso em larga escala, porém, dão a perspectiva de diminuição da dependência aos quimioterápicos, conforme evoluam as pesquisas nesta área. O emprego de métodos já aplicáveis, especialmente quando associados e visando à redução do uso de fármacos anti-helmínticos, é viável e tem apresentado resultados satisfatórios quando observados critérios técnicos na sua escolha e utilização (CEZAR, et al. 2008).

Conforme Bianchin e Catto (2009) há uma demanda dos consumidores por produtos oriundos de sistemas ecológicos e com garantia de ausência de resíduos, dos produtores por produtos mais baratos e de fácil utilização. Além disso, nos últimos anos tem crescido a utilização dos tratamentos alternativos para o controle das parasitoses em virtude do aumento da resistência

dos parasitos aos produtos alopáticos .

O neem, *Azadirachta indica* A. Juss é a espécie botânica atualmente mais estudada e classificada como um pesticida de alta eficiência e baixo efeito residual. O princípio ativo azadirachtina, contido no Neem, pode tornar-se importante no controle de pragas, pois tem largo espectro de ação, é compatível com outras formas de manejo, não tem ação fitotóxica, é praticamente atóxica ao homem e não agride o meio ambiente (MARTINEZ, 2002).

Desde a Antigüidade já se utiliza alho (*Allium sativum* L.), pela sua ação terapêutica e profilática, sobre várias doenças. No Brasil, produtos à base de alho, vêm sendo utilizado para o tratamento de nematódeos gastrintestinais de ruminantes (BIANCHIN et al., 1999).

Os endoparasitas são responsáveis por diversas afecções, principalmente em animais jovens. Esses vermes ocorrem enzooticamente em todo o território nacional e são responsáveis por expressivos prejuízos econômicos. Perda de produtividade na produção de carne e leite e altos índices de mortalidade de bezerros são alguns dos problemas causados pela alta infestação destes vermes (BARBOSA, 2009).

De acordo com Damé (2005), os bubalinos são animais rústicos, portanto apresentam certa resistência a doenças, se comparado com bovinos. Nestes a verminose gastro-intestinal é a doença mais comum dos bubalinos, principalmente em bezerros até a desmama.

Segundo Braga (1986) o índice pluviométrico é o principal fator relacionado ao aumento das infecções parasitárias. Índices pluviométricos acima de 50 mm³ permitem a sobrevivência de larvas nas pastagens (HECK et al. 2005).

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da utilização da Torta de Neem e do Alho, administrados em búfalos (*Bubalus bubalis*) naturalmente infestados por parasitas gastrointestinais, como tratamento alternativo para

controle destas endoparasitoses, bem como possíveis alterações metabólicas.

Material e métodos

O experimento foi conduzido, no período de julho a dezembro de 2010, na Estação experimental do IAPAR, situada na Lapa, Paraná. Esta unidade experimental desenvolve projeto de bubalinocultura leiteira em base agroecológica, e desta forma, os medicamentos alopáticos têm uso restrito. O último controle de endoparasitoses com medicamento alopático foi feito em janeiro de 2010.

Foram utilizados 18 bubalinos (fêmeas em lactação) da raça Murrah com idade média variando entre 3 a 10 anos e peso vivo entre 400 a 550 kg, e mantidos em pastagem de *Hemarthria altissima* cv. Roxinha, recebendo suplementação com milho moído com 2% de minerais (2 kg por animal por dia) no ato da ordenha. Todas as fêmeas foram submetidas a exame clínico minucioso, visando descartar animais que estivessem com alguma alteração clínica.

Foi disponibilizado diariamente aos animais junto com a suplementação de milho moído 2g de Torta de Neem e 2g de alho desidratado.

Para avaliação do efeito anti-helmíntico foram coletadas amostras de 10 animais em 3 tempos, sendo a primeira imediatamente antes da administração do tratamento no mês de julho de 2010 e as seguintes nos meses de setembro e dezembro de 2010. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e os exames foram realizados em um prazo máximo de 24 horas. Utilizou-se a técnica para contagem de ovos de nematóides gastrintestinais nas fezes (OPG), conforme técnica de Gordon & Whitlock modificada por Hoffmann, 1987.

Para realização dos exames hematológicos foram utilizados 18 animais, sendo coletadas amostras em 2 tempos, no início e 60 dias após a administração do tratamento. O sangue foi

coletado por punção da veia jugular com agulhas 25x8, em tubos coletores à vácuo de 5ml com anticoagulante EDTA e refrigerados em seguida. Foram determinados volume globular pelo método de micro-hematócrito, concentração de proteína plasmática por refratometria sendo o valor expresso em g/dL., e foi realizado a dosagem de fibrinogênio, que é uma proteína inflamatória de fase aguda em ruminantes (GONZALÉZ et al., 2003), pela técnica de precipitação térmica descrita por Schalm (1970), utilizando-se refratômetro clínico previamente calibrado.

Para realização dos exames bioquímicos foram utilizados 18 animais, sendo coletadas amostras em 2 tempos, no início e 60 dias após a administração do tratamento. O sangue foi coletado por punção da veia jugular com agulhas 25x8, em tubo à vácuo de 16X125mm, descartáveis, com tampa e com ativador de coágulo. Após a retração do coágulo e obtenção do soro, os tubos foram centrifugados por 6 minutos a 3000rpm. Em seguida, o soro foi separado por aspiração, dividido em alíquotas e colocado em tubos plásticos com tampa e mantidas congeladas a -20° C até o momento das análises laboratoriais.

A enzima Aspartato Amino Transferase - AST foi mensurada utilizando metodologia cinética colorimétrica pelo Método de Reitman e Frankel (1957). A atividade enzimática da Gamaglutamil Transferase – GGT (SZASZ, 1969, método modificado) e Fosfatase Alcalina – FA (Método do Paranitrofenol) foram determinadas por meio de análise cinética colorimétrica e leitura da atividade catalisadora efetuada em espectrofotômetro, com comprimento de onda específico para cada constituinte.

A determinação dos teores séricos de colesterol baseou-se no método enzimático colorimétrico descrito por Allain et.al.(1974), e as concentrações de triglicérides foram quantificados conforme a técnica descrita por Fossatti e Prencipe (1982), com leitura da coloração da

Avaliação do efeito anti-helmíntico

reação obtida em espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 500 nm.

Para a leitura das reações utilizou-se conjuntos de reagentes de uso comercial, em analisador bioquímico automático (espectrofotômetro) marca Bioplus®, modelo Bio-2000.

Foi realizado o levantamento dos últimos 20 anos das médias de temperatura máxima, mínima e precipitação comparando-se aos dados obtidos durante o período experimental, no intuito de se verificar possível efeito climático sobre os helmintos.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa PASW statistics 18. Foram utilizados teste paramétricos para variáveis que obedeceram a normalidade (hematologia e bioquímica), e a variável (OPG) que mostrou-se não homogênea e a distribuição não obedeceu à normalidade, optou-se pela utilização dos testes

não paramétricos. Para comparação das médias foi utilizado o teste de Willcoxon.

Resultados e discussão

Os animais tratados com torta de neem e alho desidratado tiveram uma redução contínua do OPG nos período avaliado, estaticamente significativa ($P < 0,01$). Destarte, observou-se que o uso contínuo do alho e do neem foram eficientes no controle de endoparasitas nas condições avaliadas.(tabela1)

Não foram encontrados na literatura científica trabalhos avaliando o efeito do alho desidratado e da torta de neem em búfalos (*Bubalus Bubalis*). Outro ponto a destacar é a escassez de estudos com ruminantes utilizando-se os dois fitoterápicos concomitantemente. Todavia, Pietrosevoli et al. (1999) observaram o efeito das folhas secas de Neem em bovinos e concluíram que ocorre

Tabela 01: Resultados dos testes coprológicos aplicados às búfalas avaliando-se a contagem de ovos de helmintos (OPG)

ANIMAL	OPG 1	OPG 2	OPG 3
	Julho	Setembro	Dezembro
1	800	500	0
2	2100	1200	0
3	1500	400	500
4	1700	500	0
5	2600	600	0
6	1100	300	0
7	1000	800	0
8	700	700	0
9	1800	600	0
10	1400	600	0
Média/Desvio Padrão	1470^a ± 600	620^b ± 249	50^c ± 158

Médias dos opgs 1, 2 e 3 mostraram-se significativamente diferentes ($P < 0,01$) pelo teste de Willcoxon.

controle efetivo da carga parasitária, sem efeito no ganho de peso dos animais. Pessoa (2001) testou in vitro os efeitos da azadirachtina obtida da semente do neem sobre *H. contortus* e encontrou 68,3% de inibição na eclodibilidade deste parasito a uma concentração de 1%. Em relação ao efeito parasiticida do alho, Bianchin (1999) observou uma redução de 47,3% no OPG de bovinos, porém segundo ele é um índice muito baixo para que o alho seja considerado eficiente contra os nematódeos gastrintestinais de bovinos, relata ainda que ação parasiticida do alho deveria ser objeto de mais estudos científicos, para ser considerado e recomendado para bovinos. Oliveira et al. (2009) não observaram efeito anti-helmíntico do alho quando testado em bovinos leiteiros.

Nas avaliações dos parâmetros hematológicos

foram observadas alterações nos animais após receberem os tratamentos (tabela 3). Os valores do hematócrito diferiram significativamente em relação aos dois momentos observados ($p < 0,05$). Não estudou-se a influência da torta de neem e do alho nessa redução, todavia os animais mantiveram níveis semelhantes do hematócrito no primeiro momento, conforme os descrito por Gomes et al. (2010) e níveis dentro da normalidade no segundo momento.

A dosagem da proteína plasmática com refratometria permitiu concluir que houve alteração nesse parâmetro ($p < 0,05$) no dois momentos avaliados.

A diminuição do hematócrito e da proteína plasmática sugere que os animais poderiam estar com parasitos vivos, porém com oviposição

Tabela 2: Resultados das análises bioquímicas dos bubalinos, antes do tratamento e 60 dias após.

ANIMAL	TRIGL.	TRIGL.	COLEST.	COLEST.	AST	AST	GGT	GGT	FA	FA
	Antes	60 dias após	antes	60 dias após	antes	60 dias após	antes	60 dias após	antes	60 dias após
1	28	56	104	69	76,82	61,11	5	1	120	122
2	30	34	79	95	99,52	99,52	1	1	114	134
3	40	67	66	56	55,87	45,4	1	3	135	99
4	26	68	65	97	68,09	82,06	10	1	141	164
5	26	40	45	66	66,35	48,89	1	3	134	186
6	82	45	56	71	71,59	62,86	3	1	138	145
7	23	34	53	85	64,6	59,36	6	3	106	151
8	38	70	82	89	57,62	57,62	1	1	96	96
9	12	36	63	64	54,13	73,33	8	1	144	172
10	36	56	48	48	82,06	57,62	5	1	141	156
11	30	83	56	81	68,09	89,05	1	1	130	99
12	28	50	75	87	75,08	69,84	3	3	99	106
13	30	49	45	69	64,6	52,38	1	3	132	122
14	23	54	73	77	68,09	57,62	5	3	144	99
15	33	39	83	74	87,3	89,05	3	3	127	138
16	36	33	63	47	69,84	62,86	3	1	124	134
17	43	126	71	55	57,62	41,9	1	1	82	96
18	32	36	62	43	78,57	61,11	1	1	220	213
Média ±	33,11 ±	54,22 ±	66,06 ±	70,72 ±	70,32 ±	65,09 ±	3,28 ±	1,78 ±	129,28 ±	135,11 ±
Desvio padrão	(14,16)	(23,12)	(15,19)	(16,49)	(11,64)	(15,91)	(2,72)	(1)	(28,93)	(34,14)

inibida. Todavia, a avaliação do referido parâmetro não foi objetivo de estudo deste trabalho.

No presente trabalho os animais mantiveram níveis similares de fibrinogênio antes e depois de 60 dias de tratamento, desta forma o uso dos produtos não desencadeou resposta negativa suficiente para aumentar os níveis de fibrinogênio (tabela3).

Os resultados das análises bioquímicas avaliadas neste trabalho estão descritos na tabela 2. Na avaliação hepática pelas enzimas AST, GGT e FA observou-se que os produtos não apresentaram hepatotoxicidade na concentração utilizada e no tempo observado. Não se observou

diferença significativa entre os tempos para os valores de AST, FA e GGT ($p>0,05$). Raizada et al. (2001) revelam ausência de efeitos adversos com administração de azadiractina 12% via oral, a ratos machos e fêmeas até 1500 mg/ Kg/dia por 90 dias, não produzindo sinais de toxicidade, mortalidade, alterações de peso ou dos parâmetros sanguíneos.

Na avaliação dos lipídios, colesterol total e triglicérides, apenas houve uma diferença significativa nos tempos na análise do triglicerídeo, sendo que este lipídio aumentou significativamente no segundo momento das análises ($p<0,05$). Em bovinos o aumento dos triglicerídeos pode estar

Tabela 3: Resultados das análises do hematócrito, proteína plasmática e do fibronogênio dos bubalinos, antes do tratamento e 60 dias após o início do tratamento.

ANIMAL	COLETA D0 (1)			COLETA D 60		
	HT	P.P	FIBRINOG.	HT	P.P	FIBRINOG.
1	37	8	0	27	6,6	0
2	32	8,5	0	30	8	0
3	36	7,6	0,2	26	6,2	0
4	31	8	0	22	6,8	0
5	30	7	0	31	6,6	0
6	38	8	0	29	6,6	0,2
7	30	7,8	0	29	6,6	0,2
8	35	7,8	0,2	20	7,2	1
9	33	7,4	0,2	31	6,6	0
10	34	7,2	0,2	24	6	0
11	40	7,4	0	33	6,2	0
12	25	7,6	0,2	23	6,2	0
13	33	8	0	25	7,2	0
14	30	7,2	0,2	33	6,2	0
15	34	8,4	0,2	30	6,8	0
16	39	8	0	35	6,4	0
17	40	8	0	35	6	0
18	38	8	0	32	6	0
Média ± (desvio Padrão)	34,16 ± (4,11)	7,77 ± (0,41)	0,07 ± (0,10)	28,61 ± (4,47)	6,56 ± (0,51)	0,07 ± (0,24)

relacionado à dieta (CALIXTO JR. et al., 2008), contudo neste experimento não avaliou este efeito sobre esse parâmetro. O aumento isolado dos triglicérides no presente trabalho, não serve de parâmetro para apontar efeitos benéficos ou deletérios, tendo em vista que este lipídio está inter-relacionado com outros fatores do perfil energético.

No levantamento dos dados climáticos observou-se que durante o período do experimento não houve diferença com a média dos últimos 20 anos e que a precipitação foi regular, sendo assim favorável ao desenvolvimento larval, desta forma descarta-se a possibilidade de interferência climática na redução do OPG. (Figura 1)

Os produtos empregados mostraram-se eficientes no controle de verminoses, diminuindo a oviposição, contudo a preconização de tais fitoterápicos aos produtores em situações distintas deste estudo, depende de novos trabalhos experimentais.

Conclusões

O uso do alho desidratado e da torta de neem foi eficiente no controle da oviposição de endoparasitas em búfalas em lactação, nestas condições experimentais.

Alho desidratado e torta de Neem na forma utilizada não apresentaram toxicidade para os animais .

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto.

Referências Bibliográficas:

ALLAIN, C. C. et al. Enzimatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, p.470-475, 1974.

ALMEIDA, K.S. et al. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro profissional veterinário. **Revista Verde**, Mossoró, v.1, n.1, p.67-74, jan/jun. 2006.

BARBOSA, W. S. A influência de ecto e

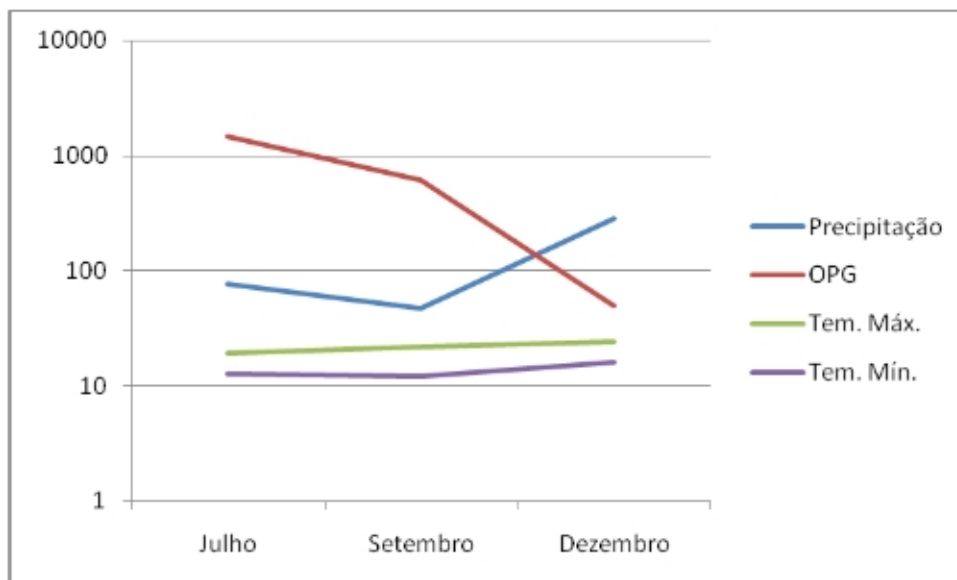


Figura 1: Relação entre os dados meteorológicos observados no período e a evolução das médias de contagens de ovos de helmintos.

- endoparasitas na produção bovina. Monografia - Universidade Castelo Branco. Centro de Ciências Agrárias. Curso de Especialização lato sensu em Reprodução e Produção em Bovinos. Brasília, 2009.
- BIANCHIN, I. et al. **Eficiência do pó de alho (*Allium sativum* L.) no controle dos parasitos de bovinos**. Boletim de Pesquisa Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 31p. 1999.
- BIANCHIN, I; CATTO, J.B. Alho desidratado (*Allium sativum* L.) no controle de nematódeos gastrintestinais em bovinos naturalmente infectados. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1267-1270, jul-ago, 2004.
- BIANCHIN, I; CATTO, J.B. Epidemiologia e alternativas de controle de helmintos em bovinos de corte na região central do Brasil. **XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2009.
- BRAGA, R.M. Sobrevivência de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de bovinos, sob condições naturais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.8, p.186-188, 1986
- CALIXTO JÚNIOR, M., et al. Efeito de diferentes volumosos sobre os constituintes sangüíneos de vacas da raça holandesa. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, América do Norte, 9, abr. 2008..
- CEZAR A. S et al. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.7, p.2083-2091, out, 2008.
- DAMÉ, M.C.F.; **Principais resultados de pesquisas, manejo e índices zootécnicos dos bubalinos da Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005.
- FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, p. 2077-2080, 1982.
- GOMES, V. et al. Valores de referência e influência da idade no eritrograma de bubalinos da raça Murrah. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 30(4):301-304, 2010.
- GONZÁLEZ, F.H.D., SCHEFFER, J.F.S. Perfil sangüíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. **Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil**. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. p.73-89, 2003.
- HECK, I. et al. Efeito do clima sobre a infecção parasitária em bezerros e presença de larvas em manejo rotativo de pasto em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1461-1464, nov-dez, 2005.
- HOFFMANN, R.P. **Diagnóstico de parasitismo veterinário**. Porto Alegre: Sulina, 1987. 156p
- MARTINEZ, S. S. **O Nim, *Azadiractina indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. Instituto Agrônômico do Paraná, 2002. 142 p.
- OLIVEIRA, C.N.G. et al. Avaliação da Eficácia do *Allium sativum* sobre Nematódeos Gastrintestinais de Ruminantes. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4 n.2, nov. 2009 .
- PESSOA, L.M. Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza. p. 68, 2001
- PIETROSEMOLI, S.; et al. Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en control de nematodos gastrointestinales de bovinos a pastoreo. **Revista Facultad de Agronomía**, v. 16, n.1, p. 220-225, 1999.
- RAIZADA, R.B. et al **Singh Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats**. Food Chem. Toxicol, 2001.
- REITMAN, S. FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **Amer. J. Clin. Pathol.** 28: 56-63, 1957.
- ROCHFORT, S. et al. Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**, v.69, p.299-322, 2008.
- SCHALM, O.W. Clinical significance of plasma protein concentration. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 157, n.11, p. 1672-1673, 1970.
- SZASZ, G. Kinetic photometric method for serum gama-glutamyl transpeptidase. **Clinical Chemistry**, Winston Salem, v.15, n. 2, p. 124-136, 1969.