

Capítulo 4

*Francisco José da Silva Lédo
Antônio Vander Pereira
Patrícia Perondi Anchão Oliveira
Andréa Mittelmann*

Melhoramento genético de alfafa na Embrapa

1. Introdução

A alfafa (*Medicago sativa* L.) é uma das mais antigas espécies forrageiras cultivadas, sendo intensivamente utilizada em países de pecuária leiteira, por constituir uma planta que reúne algumas das mais importantes características forrageiras como alta produtividade, qualidade protéica, palatabilidade, digestibilidade e capacidade de fixação de nitrogênio (BOTREL et al. 1994; VILELA, 2001).

No Brasil, vem ocorrendo um processo de intensificação dos sistemas de produção de leite, principalmente, nas bacias leiteiras das Regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Nestes sistemas são utilizados animais de maior potencial genético, que demandam a utilização de alimentos de alto valor nutritivo (VILELA, 1992). A alfafa é uma boa opção para esses sistemas, já que os resultados de pesquisa obtidos na Região Sudeste mostram que essa forrageira apresenta excelente potencial para produção de leite, podendo suportar 3,1 UA/ha e proporcionar produção média de leite de 20 kg/vaca/dia (VILELA, 1994; VILELA, 2001).

O cultivo da alfafa no Brasil ainda é incipiente e está concentrado na Região Sul, onde chegaram a ser explorados cerca de 26.000 ha (PEREIRA et al., 2001). Os principais fatores que impedem a sua expansão são a pequena disponibilidade de informações tecnológicas sobre sua exploração em condições tropicais, e a falta de cultivares adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas do Brasil. Em 1994, a Embrapa Gado de Leite, observando um grande potencial para a expansão da cultura da alfafa no País, iniciou um programa de melhoramento genético com o objetivo de obter cultivares mais adaptadas aos trópicos. A estratégia inicial de melhoramento foi realizar seleção dentro da população de alfafa Crioula, por ser esta a cultivar mais cultivada no sul do País e por apresentar ampla variabilidade genética. Adicionalmente, buscou-se também obter novas cultivares a partir da seleção e recombinação de genótipos de alfafa introduzidos de outros países, principalmente da Argentina e Estados Unidos.

2. Origem da alfafa

O centro primário de origem do gênero *Medicago* localiza-se ao noroeste do Irã e nordeste da Turquia (QUIROS e BAUCHAN, 1988), que são regiões caracterizadas por invernos frios e verões secos e quentes, com solos bem drenados, e de pH próximo da neutralidade (MICHAUD et al. 1988). A alfafa apresenta uma ampla área de distribuição natural através dos territórios da Turquia, Iraque, Irã, Afeganistão, Paquistão, norte da Índia e região montanhosa do Cáucaso. A espécie foi introduzida na Europa por meio dos persas, cerca de 490 anos A.C. Durante o século XVI, com a colonização da América do Sul e da América Central pelos espanhóis, a alfafa foi introduzida no México e no Peru. A partir do Peru, ela chegou ao Chile, à Argentina e ao Uruguai, aproximadamente em 1775 (MICHAUD et al., 1988). No Brasil, foi introduzida no Rio Grande do Sul por intermédio de imigrantes da Europa ou do Uruguai e da Argentina. Cultivada inicialmente nos vales dos rios das regiões coloniais, posteriormente foi difundida para os Estados de Santa Catarina, Paraná, São Paulo

e, mais recentemente, Minas Gerais (FONTES et al., 1994).

A alfafa é uma espécie polimórfica, com formas diplóides e tetraplóides, apresentando número básico de cromossomos $x=8$. Adapta-se a uma enorme diversidade de condições ambientais e possui uma notável variabilidade genética, enriquecida pela introgressão de espécies que formam o denominado “complexo *Medicago sativa*”, entre elas destaca-se especialmente a *M. falcata* (BASIGALUP e HIJANO, 1995). Muitas cultivares de alfafa em uso são originárias do intercruzamento de formas perenes tetraplóides alógamas de *Medicago sativa* ssp. *sativa* e *Medicago sativa* ssp. *falcata*, e por isso é encontrada uma grande diversidade genética entre populações originárias de diferentes regiões geográficas e também dentro destas populações (CROCHEMORE, 1998).

3. Caracterização morfológica

A alfafa apresenta folhas trifolioladas dispostas de forma alternada na haste da planta, com estípulas delgadas junto aos pecíolos. Os folíolos apresentam forma ovalada ou arredondada, com bordas da parte superior serrilhadas (TEUBER e BRICK, 1988). A planta quando madura apresenta de 5 a 25 hastes, com altura variando de 60 a 90 cm. Possui coroa que se origina a partir do crescimento contrátil do hipocótilo e da parte superior da radícula, fazendo com que o nó cotiledonar se posicione sob a superfície do solo. Sua inflorescência é em racemos axilares, com 5 a 15 flores de cor púrpura a violácea (**Figura 1**). O fruto é uma vagem espiralada, com tamanho e número de sementes dependendo do tipo de fecundação, e a fecundação cruzada produz os maiores frutos (MONTEIRO, 1999).



Figura 1. Inflorescências da alfafa Crioula. Coronel Pacheco, MG, 2006.

Seu sistema radicular apresenta, normalmente, uma raiz pivotante que pode penetrar no solo a profundidades superiores a nove metros (BARNES e SHEAFFER, 1995) e coroa posicionada na região superficial do solo. A parte aérea da alfafa é composta por dois tipos de hastes que diferem quanto ao local de origem. Da região da coroa surgem hastes basilares, oriundas de gemas adventícias, e da axila das folhas são formadas hastes superiores (DALL'AGNOL e SCHEFFER-BASSO, 2000). O crescimento da haste é normalmente indeterminado e o ápice continua a diferenciar os órgãos vegetativos e florais até a senescência da haste ou sua remoção (BARNES et al., 1972).

4. Estratégias de melhoramento

Na alfafa os principais métodos de melhoramento utilizados são o melhoramento interpopulacional e intrapopulacional (PEREIRA et al. 2001). O melhoramento interpopulacional baseia-se no fluxo de genes entre populações, proporcionado pela polinização livre ou dirigida, enquanto que no melhoramento intrapopulacional, se busca aumentar a frequência de genes favoráveis dentro de uma mesma população de plantas.

Para espécies autopoliplóides, como a alfafa, um dos métodos de melhoramento interpopulacional que proporciona melhores resultados para ampliar a base genética e preservar genes favoráveis é a constituição de populações sintéticas (PEREIRA et al. 2001). A obtenção de uma população sintética superior de alfafa, pode ser conseguida através do cruzamento de um número elevado de genótipos com significativo grau de divergência e complementação alélica.

O método intrapopulacional utiliza diferentes formas de seleção para melhorar características dentro da população. A unidade de seleção pode ser constituída de plantas individuais ou famílias de plantas. Vários procedimentos são usados em plantas individuais, e com freqüentes modificações, como: seleção massal, seleção materna, seleção de linhas clonais e testes de progênies.

5. Melhoramento genético da população de alfafa Crioula

A maior parte da área cultivada de alfafa no Brasil, é ocupada por cultivares derivadas da população Crioula (**Figura 2**), como a Crioula CRA, Crioula Itapuã, Crioula Na Terra, Crioula Nativa, Crioula Ledur, Crioula Roque, Crioula Chile, Crioula UFRGS, etc. A população Crioula é resultante de um processo conjunto de seleção realizado pelo homem e pela natureza, ocorrido no Rio Grande do Sul, a partir da introdução e cultivo da alfafa nos vales dos rios Caí, Taquari, Jacuí, Uruguai e nas encostas da Serra, iniciado por volta de 1850 (SAIBRO, 1985; OLIVEIRA et al., 1993; PEREZ, 2003). Nesses cultivos os produtores colhiam sementes dos alfafais de quatro a cinco anos de idade, o que acabou gerando a população Crioula.

Fotos: Francisco José da Silva Lédo



Figura 2. Alfafal da cultivar Crioula. Rio Grande do Sul, 2007.

A superioridade das cultivares derivadas da população Crioula foi comprovado por ensaios realizados na ESALQ/USP em Piracicaba, SP, onde essas cultivares apresentaram produção de matéria seca de forragem variando de 25 a 30 toneladas/ha/ano, com baixa estacionalidade, alta fixação biológica de nitrogênio atmosférico e eficiência de uso da água. Essas características agrônômicas foram determinantes na expressão do alto potencial produtivo (OLIVEIRA et al., 2001, OLIVEIRA et al., 2003 e OLIVEIRA et al., 2004). Ensaios realizados no Estado de Minas Gerais, também constataram o elevado potencial forrageiro das cultivares Crioulas para as condições edafoclimáticas de Minas Gerais (FERREIRA et al., 1999; SALES, 2001 e BOTREL et al., 2001).

Em 1994, a Embrapa Gado de Leite iniciou trabalho de melhoramento da população de alfafa Crioula, que teve por objetivo obter uma nova cultivar mais produtiva e de melhor qualidade, a partir de seleções realizadas dentro da população Crioula. O trabalho foi realizado em um alfafal de quatro hectares,

implantado em um solo aluvial no Campo Experimental de Coronel Pacheco da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG. O alfafal foi reticulado em sub-unidades, onde foi realizada seleção considerando o vigor fenotípico, persistência, produção de massa verde, porte e ausência de pragas e doenças. A partir desse trabalho, foi obtida a alfafa Crioula Embrapa. A alfafa Crioula Embrapa deverá ser lançada como nova cultivar, após a conclusão dos ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU), em andamento nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio Grande do Sul.

6. Obtenção de populações sintéticas de alfafa

A partir do ano de 1999, foram avaliados em locais representativos das bacias leiteiras de Goiás e Minas Gerais, genótipos de alfafa introduzidos principalmente da Argentina e Estados Unidos. Os genótipos foram avaliados em ensaios conduzidos nos municípios de Coronel Pacheco-MG e Anápolis-GO, onde foram avaliados 145 e 147 genótipos, respectivamente. Os genótipos que mostraram melhor adaptação, em cada um desses locais (**Tabela 1**), estão sendo recombinados para obtenção de populações sintéticas de ampla base genética, que serão utilizadas no desenvolvimento de novas cultivares de alfafa, portadoras de características específicas para os sistemas de corte ou pastejo, e adaptadas as diferentes condições edafoclimáticas.

Tabela 1. Genótipos selecionados para obtenção das populações sintéticas.

Coronel Pacheco, MG		Anápolis, GO	
- Alto	- Perla	- Activa	- Monarca
- Crioula	- Sutter	- Barbara	- P30
- DK 191	- SW 14	- Baralfa	- Pioneer 5715
- Esmeralda	- SW 8200	- Crioula	- SSPS
- F 686	- SW 9210 A	- DK 189	- SW 7400
- Flórida 77	- Tango	- DK 191	- WL525 HQ
- MB 1873	- Victoria	- Falcon	- XA-132
- MH 15	- XA-132	- LE 4	
- Monarca	- 5312	- Mede	
- P-30	- 29 VR	- MH 15	

7. Avaliação de cultivares para corte

Em razão da demanda de informações sobre a cultura da alfafa e de sua importância como alimento volumoso de alta qualidade para o rebanho leiteiro, a Embrapa Gado de Leite realizou em maio de 1994 uma reunião de trabalho com especialistas na cultura com o objetivo principal de avaliar o seu potencial para produção de leite em regiões tropicais e fornecer subsídios para orientação de futuros programas de pesquisa com essa leguminosa. Foi recomendado o desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de avaliar o potencial de cultivares de alfafa em diferentes ambientes tropicais e indicar as mais adaptadas para uso nos atuais sistemas de produção de leite (BOTREL e ALVIM, 1994). Assim, a Embrapa Gado de Leite desenvolveu e coordenou em âmbito nacional uma rede de ensaios de avaliação de cultivares de alfafa (Rede Nacional de Avaliação de Cultivares de Alfafa - Renacal) em parceria com instituições de pesquisa e ensino. Nessa rede foram avaliadas cultivares de alfafa introduzidas de outros países, quanto a sua adaptação às condições de clima e solo de importantes bacias leiteiras de diferentes regiões do Brasil.

As cultivares avaliadas foram provenientes principalmente da Argentina e Estados Unidos. Os resultados obtidos nos ensaios da Renacal mostraram que a alfafa constitui um excelente recurso forrageiro, destacando-se pela produtividade e qualidade da forragem (**Tabela 2**). As cultivares Crioula e P-30 apresentaram ampla faixa de adaptação aos diversos ambientes tropicais em que foram avaliadas, com produção de matéria seca anual variando de 9 a 21,3 e 7,9 a 22,9 t/ha/ano, respectivamente.

Tabela 2. Produção de matéria seca anual das três cultivares mais produtivas, em cada um dos ensaios da Renacal.

Instituição (local do ensaio)	Cultivares (t/ha/ano)		
Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco, MG)	Crioula (13,0)	Monarca (11,9)	P-30 (11,8)
Pesagro (Pati do Alferes, RJ)	Crioula (14,2)	P-30 (14,0)	Maricopa (13,8)
Instituto de Zootecnia (Sertãozinho, SP)	SW-8210 (14,0)	Monarca (13,9)	P-5715 (13,7)
Epamig (Sete Lagoas, MG)	Crioula (20,0)	P-30 (19,6)	Rio (16,8)
UFLA (Lavras, MG)	Crioula (17,5)	P-30 (16,3)	P-5715 (13,7)
Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP)	Crioula (16,4)	P-30 (13,3)	WL-516 (12,5)
UFRGS (Eldorado do Sul, RS)	Crioula (9,2)	Rio (8,9)	P-30 (8,4)
IAPAR (Bandeirantes, PR)	P-30 (22,9)	WL-516 (22,8)	Crioula (21,3)
Epagri (Chapecó, SC)	Alto (13,9)	BR-3 (13,4)	SW-8112 (13,0)
UFPA (Araia, PB)	XA-132 (17,1)	Crioula (15,3)	SW-14 (14,4)
UFC (Pentecoste, CE)	SW-9301 (15,2)	P-30 (14,4)	Victoria (14,4)
Univale (Governador Valadares, MG)	Crioula (10,3)	Victoria (10,3)	CY-9313 (9,6)
EBDA (Manoel Vitorino, BA)	Cordobesa (18,9)	P54H55 (17,9)	Victoria (17,1)
Fundação Rio Verde (Rio Verde, GO)	Crioula 1 (9,8)	Crioula 2 (9,0)	P-30 (7,9)

8. Avaliação de cultivares para pastejo

A Embrapa Gado de Leite avaliou o uso da alfafa Crioula para pastejo, em ensaio conduzido em Coronel Pacheco, MG (VILELA, 1994; VILELA, 2001). Nesse trabalho constatou-se que o pastejo de alfafa por vacas em lactação suportou até 3,1 ua ha⁻¹ com produção média de leite de 20,0 kg vaca⁻¹ dia⁻¹, sem comprometimento do peso vivo, capacidade reprodutiva e

empanzinamento dos animais. O manejo adotado foi de um dia de ocupação e 24 dias de descanso na primavera/verão e 36 dias de descanso no outono/inverno. Observou-se também que bastaram oito horas de pastejo diário para os animais ingerirem quantidade suficiente de forragem para produzir em média, 20 kg/dia de leite.

Em ensaio da Rede Nacional de Avaliação de Cultivares de Alfafa – Renacal, realizado pelo Instituto de Zootecnia de Sertãozinho, SP, quatro cultivares de alfafa (Monarca, Victória, P-30 e Crioula) foram submetidas a pastejos, intercalados com períodos de descanso. Após a realização de oito ciclos de pastejo, a produção de matéria seca, na entrada do pastejo, variou de 3.049 (Monarca) a 3.428 kg/ha (Crioula), e a porcentagem de folhas de 40,9 (P-30) a 47,0% (Monarca). A cultivar Crioula foi a que apresentou maior produtividade, e também a que se mostrou mais indicada para pastejo (RUGGIERI et al. 2005).

Na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP, as cultivares Crioulas, sementes multiplicadas no Rio Grande do Sul e no Chile e a Crioula comercial Itapuã, foram as mais produtivas em 11 meses de avaliação sob condição de pastejo, produzindo entre 20 e 22 toneladas de massa seca/ha (acima de 8 cm de altura), com estacionalidade de produção bastante favorável, ao redor de 35 a 40% e sobrevivência entre 80 e 100%. Apesar dos melhores resultados, essas cultivares apresentaram plantas com coroas elevadas. Para as cultivares já adaptadas ao pastejo, como a ABT 805, Maxigraze e Amerigraze, não foram observadas plantas com coroas elevadas.

Referências

BARNES, D. K.; BINGHAM, E. T.; AXTELL, J. D.; DAVIS, W. H. The flower, sterility mechanisms and pollination control. In: HANSON, C. H. (Ed.). **Alfalfa science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, 1972. p. 123-141 (Agronomy, 15).

BARNES, D. K.; SHEAFFER, C. C. Alfalfa. In: HEATH, M.; METCALFE, D.; BARNES, R. (Ed.). **Forages**. 5 ed. Ames: Iowa State University, 1995. v. 1, p. 205-216.

BASIGALUP, D. H.; HIJANO, E. H. Mejoramiento genético de la alfafa. In: HIJANO, E. H.; NAVARRO, A. (Ed.). **La alfalfa en la Argentina**. Buenos Aires: INTA, 1995. p. 39-60 (Agro de Cuyo - Manuales, 11).

BOTREL, M. A.; ALVIM, M. J. Rede nacional de avaliação de cultivares de alfafa (Renacal). In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) NOS TRÓPICOS, 1994, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p. 225-233.

BOTREL, M. A.; FERREIRA, R. P.; ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F. Cultivares de alfafa em área de influência da Mata Atlântica no Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 11, p. 1437-1442, 2001.

CROCHEMORE, M. L. **Variabilidade genética da alfafa**: marcadores agromorfológicos e moleculares. Londrina: IAPAR, 1998. 59 p. (IAPAR. Boletim técnico, 58).

DALL'AGNOL, M.; SCHEFFER-BASSO, S. M. Produção e utilização de alfafa. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17..., 2000, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2000. p. 265-295.

FERREIRA, R. P.; BOTREL, M. A.; PEREIRA, A. V.; CRUZ, C. D. Avaliação de cultivares de alfafa e estimativas de repetibilidade de caracteres forrageiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**,

Brasília, v. 34, n. 1, p. 995-1002, 1999.

FONTES, P. C. R.; VILELA, D.; MARTINS, C. E. Estabelecimento da cultura de alfafa. In: CARVALHO, L. A.; VILELA, D. (Ed.). **Cultura da alfafa**: estabelecimento, fenação, custo de produção e construção de um secador estático. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p. 1-11.

MICHAUD, R.; LEHMAN, W. F.; RUMBAUGH, M. D. World distribution and historical development. In: HANSON, A. A.; BARNES, D. K.; HILL, R. R. (Ed.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 25-91 (Agronomy, 29).

MONTEIRO, A. L. G. Fisiologia do crescimento. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 16., 1999, Piracicaba, SP. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 23-45.

OLIVEIRA, P. R. D.; PAIM, N. R.; CZERMAINSKI, A. B. C. Seleção para rendimento e qualidade de forragem em alfafa Crioula. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n. 9, p. 1039-1044, 1993.

OLIVEIRA, W. S.; OLIVEIRA, P. P. A.; CORSI, M.; BOUTON, J. H.; TSAI, S. M. Avaliação preliminar de alfafa sob pastejo com alta lotação animal e ciclos de curta duração. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 115-117.

OLIVEIRA, W. S.; OLIVEIRA, P. P. A.; CORSI, M.; TRIVELIN, P. C. O.; TSAI, S. M. Disponibilidade hídrica relacionada ao conteúdo de nitrogênio e produtividade da alfafa (*Medicago sativa*, L.) **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1275-1286, 2003.

OLIVEIRA, W. S.; OLIVEIRA, P. P. A.; CORSI, M. ; DUARTE, F. R. E.; TSAI, S. M. Alfalfa yield and quality as function of nitrogen fertilization and symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 71, n. 4, p. 443-438, 2004.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGRES, M. C. (Ed.). **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas**. Rondonópolis: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602.

PEREZ, N. B. **Melhoramento genético de leguminosas de clima temperado - alfafa (*Medicago sativa* L) e cornichão (*Lotus corniculatus* L) - para aptidão ao pastejo**. 2003. 174 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

QUIROS, C. F.; BAUCHAN, G. R. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In: HANSON, A. A.; BARNES, D. K.; HILL, R. R. (Ed.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 93-124 (Agronomy, 29).

RUGGIERI, A. C.; BOTREL, M. A.; MEISTER, N. C.; JANUSCKIEWICZ, E. R.; ALMEIDA, A. R. P.; FIGUEIREDO, L. A. Avaliação de quatro cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.) sob pastejo em Sertãozinho, SP. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **Anais...** Viçosa: SBZ, 2005. 4 p.

SAIBRO, J. C. Produção de alfafa no Rio Grande do Sul. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 7., 1984, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1985. p. 61-106.

SALES, E. C. J. **Produtividade, composição bromatológica e degradabilidade ruminal de cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.)**. 2001. 105 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TEUBER, L. R.; BRICK, M. A. Morphology and anatomy. In: HANSON, A.A.; BARNES, D.K.; HILL, R.R. (Ed.). **Alfalfa and alfalfa improvement**. Madison: American Society of Agronomy, 1988. p. 125-162 (Agronomy, 29).

VILELA, D. Potencialidade da alfafa na Região Sudeste do Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 16, n. 175, p. 50-53, 1992.

VILELA, D. Potencialidade do pasto de alfafa (*Medicago sativa* L.) para produção de leite. In: WORKSHOP SOBRE O POTENCIAL FORRAGEIRO DE ALFAFA (*Medicago sativa* L.) NOS TRÓPICOS, 1994, Juiz de Fora, MG. **Anais...** Juiz de Fora: EMBRAPA-CNPGL, 1994. p. 205-217.

VILELA, D. Produção de leite em pastagens de alfafa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 22, n. 211, p. 38-43, 2001.