

Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos

Ana Carolina de Souza
CHAGAS¹
Luiz da Silva VIEIRA¹

1 - EMBRAPA Caprinos, Sobral - CE

Correspondência para:
ANA CAROLINA DE SOUZA CHAGAS
EMBRAPA Caprinos
Faz. Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras -
Km 4
62011-970 - Sobral - CE
carolina@cnpq.embrapa.br

Recebido para publicação: 06/06/2005
Aprovado para publicação: 07/02/2007

Resumo

O problema da resistência em nematódeos gastrintestinais de caprinos, associado ao crescente interesse por alternativas de controle, levou à investigação da ação de *Azadirachta indica* sobre estes parasitas. No teste *in vitro* observou-se a ação ovicida e larvicida de extratos aquosos de folhas verdes e secas de Neem, em cinco concentrações. No teste *in vivo* administraram-se 30g de folhas secas por animal/dia, durante cinco dias. Os animais foram monitorados através de OPG diário durante 28 dias e as larvas foram quantificadas e identificadas através de coprocultura. Detectou-se a predominância de *Haemonchus* sp. na estação chuvosa e de *Trichostrongylus* spp. na estação seca. O extrato aquoso de folhas secas *in vitro*, na concentração de 240.000ppm, reduziu em 89% a eclosão das larvas de nematódeos gastrintestinais. Entretanto, esta concentração é muito elevada e inviabiliza sua aplicação no controle da verminose. A administração oral de folhas secas trituradas não reduziu o OPG dos animais durante um período de 28 dias após o tratamento. Estudos investigativos com *A. indica* devem se concentrar na ação biológica do óleo extraído diretamente da semente, que possui maior quantidade de azadirachtina que as folhas. A administração do óleo também é mais fácil, já que as folhas têm sabor amargo e são evitadas pelos animais.

Palavras-chave:

Azadirachta indica.
Fitoterapia.
Caprinos.
Nematódeos
gastrintestinais.
Controle.

Introdução

As nematodeoses gastrintestinais são consideradas um dos maiores entraves à caprinocultura no Brasil. Os principais sintomas são debilidade, anemia severa e hipoproteïnemia, levando à perda da condição corporal do animal, queda na produtividade e eventualmente morte. A doença tende a ser mais intensa em animais jovens, mas os adultos também podem ser afetados severamente¹. *Haemonchus contortus* é considerado o principal problema nas criações por ser hematófago. Os parasitas possuem grande capacidade de multiplicação e adaptação ao meio ambiente, permanecendo por meses nas pastagens ainda com capacidade infectante². Em adição, em condições ambientais adversas, a hipobiose é utilizada como estratégia de sobrevivência. O controle tem sido realizado utilizando-se produtos químicos comerciais, que muitas vezes se mostram ineficazes com

o aparecimento da resistência. Há duas décadas não surge um princípio ativo novo nas formulações comerciais. Demonstrando a gravidade da situação, tem sido utilizada como estratégia de venda a associação de dois ou três princípios ativos, entretanto, estas formulações só são eficazes quando ambos os compostos têm significativo efeito sobre os helmintos³.

É notória a tendência mundial de crescimento da agricultura orgânica, impulsionada pelo grande interesse de produtores e consumidores, além dos incentivos governamentais através de programas e editais de incentivo à pesquisa⁴. Em atendimento a esta demanda, as pesquisas científicas têm buscado investigar alternativas ao controle químico, tais como o uso de extratos de plantas no controle das pragas. *Azadirachta indica* A. Juss é uma árvore indiana conhecida como Neem e que tem sido divulgada como alternativa fitoterápica no controle de nematóides gastrintestinais

em animais. Em um levantamento realizado na Venezuela, o Neem foi a planta mais citada como medicamento etno-veterinário utilizado nas criações⁵. Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos, mas os resultados divulgados ainda não são suficiente para sua utilização prática nas criações de caprinos, ovinos e bovinos^{6,7,8,9,10}.

Acredita-se que a azadirachtina, substância obtida das folhas e sementes, seja a principal responsável pelos efeitos da planta sobre as pragas em geral. Ela é formada por um grupo de isômeros relacionados denominados AZ-A até AZ-G, sendo o primeiro o componente mais abundante no extrato das sementes e o AZ-E é considerado o mais efetivo regulador de crescimento em insetos. Além disto, a azadirachtina provoca distorções na metamorfose, ação repelente, inibição do crescimento, malformação, redução da fertilidade e mortalidade, sendo a ação dependente do organismo alvo¹¹. Os estudos sobre a estrutura da azadirachtina estenderam-se por 18 anos, dada a sua complexidade. Ela é solúvel em água com álcool, muito sensível aos raios ultravioleta e aos meios ácidos ou básicos, apresenta biodegradação rápida, mantendo o efeito anti-alimentar por no máximo duas semanas⁴.

O Neem possui características que indicam seu potencial no controle de pragas, como possuir amplo espectro de ação, ser compatível com outras formas de manejo, não ter ação fitotóxica e ser praticamente atóxico ao homem. Desta forma, objetivou-se com o presente trabalho investigar a ação da folha de *Azadirachta indica*, em testes *in vitro* e *in vivo*, como alternativa no controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos.

Materiais e Método

1) Teste *in vitro*

Coletou-se folhas de Neem, em árvores presentes na Embrapa Caprinos - Sobral/CE, para a realização de dois testes “*in vitro*”, um deles com as folhas verdes e

o outro com o material seco. Os experimentos foram realizados em épocas diferentes em função do volume de trabalho. Para o teste com o material verde, a coleta das folhas foi realizada pela parte da manhã e distribuídas conforme o peso em cinco tratamentos: 1) 10g, 2) 20g, 3) 45g, 4) 90g e 5) 180g. O controle foi constituído de água destilada. As amostras foram homogeneizadas em um liquidificador industrial com 500 mL de água destilada, deixadas em descanso por 15h e os extratos foram filtrados. Para o teste com o material seco, as folhas foram coletadas na parte da manhã e secaram à sombra em local ventilado por sete dias. Após este período, as folhas também foram pesadas, homogeneizadas em liquidificador com 500 mL de água destilada (exceto a quantidade de 180g que recebeu 750mL), deixadas em repouso por 15h e filtradas. Os extratos foram testados nas seguintes concentrações: 20.000, 40.000, 90.000, 180.000 e 360.000ppm no experimento com o Neem verde e 20.000, 40.000, 90.000, 180.000 e 240.000ppm com o Neem seco.

Para testar a ação ovicida e/ou larvicida dos extratos, realizou-se coprocultura utilizando a metodologia adaptada de Roberts e O'Sullivan¹³. Para tanto, fezes de caprinos foram coletadas e homogeneizadas. Realizou-se contagem de ovos por grama de fezes (OPG) de uma amostra, para a estimativa do grau de infecção dos animais¹⁴. O OPG da amostra de fezes utilizada no experimento com folhas verdes foi de 3.100, enquanto que com folhas secas foi de 2.700. Após este procedimento, a coprocultura foi realizada com cinco repetições/tratamento e o grupo controle com água destilada. Cinco gramas de fezes receberam 2,5mL dos extratos preparados, foram homogeneizadas e deixadas em descanso por sete dias para leitura.

2) Teste *in vivo*

Foram selecionadas na Embrapa Caprinos 24 cabras puras das raças Moxotó e Canindé (peso médio 30kg). Os animais apresentaram OPG entre 500 e 1.800 (média

de 1025) e foram ordenados para este critério de forma decrescente. A partir desta lista, eles foram selecionados alternadamente para compor dois grupos de 12 animais (controle e tratado). Eles se alimentavam de pastagem nativa raleada durante o dia e eram recolhidos ao final da tarde em dois capris de terra batida, onde recebiam apenas água.

Durante cinco dias o grupo controle recebeu às 6:00h, 1 kg de milho misturado com sabugo e folhas (rolão), enquanto o grupo tratado recebeu 360g de Neem triturado misturado a 1kg de rolão, resultando em consumo diário de aproximadamente 30g de Neem/animal/dia (quantidade administrada segundo Neves, 2004 - Informe verbal). Após o esvaziamento do cocho, os animais eram soltos em pastagem naturalmente contaminada. Para a leitura do OPG, foram realizadas em todos os animais coletas de amostras fecais antes do tratamento (dia -7 e 0), durante (dias 1 a 5) e após por um período de quatro semanas. Isto permitiu a avaliação da possível ação dos extratos durante todo o ciclo interno dos nematódeos gastrintestinais, principalmente inibição da postura dos vermes adultos. Diariamente foram feitas coproculturas de uma amostra homogeneizada por grupo, durante todo o experimento. A contagem do número de larvas por grupo permite a observação de uma possível ação ovicida e/ou larvicida dos extratos. Os gêneros de nematódeos foram identificados semanalmente, com o objetivo de se detectar uma possível ação diferencial dos extratos entre os gêneros de helmintos.

O delineamento experimental do teste *in vitro* foi inteiramente casualizado e do teste *in vivo*, em blocos ao acaso. Os dados foram transformados para log₁₀ e a análise de variância realizada pelo programa estatístico SAS.

Resultados

Os resultados indicam que a azadirachtina presente nas folhas, não teve efeito diferencial

entre *Haemonchus* sp e *Trichostrongylus* spp, já que a proporção dos gêneros permaneceu constante comparativamente ao controle. Nas coproculturas tratadas com o Neem verde do teste *in vitro*, encontrou-se uma média de 64% de *Haemonchus* sp e 36% de *Trichostrongylus* spp, sem diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$), já para o Neem seco foi de 16,5% e 83,5%, respectivamente. O experimento com folhas verdes foi realizado com fezes coletadas no início da seca, com chuvas esporádicas, e o experimento com as folhas secas com fezes coletadas na estação seca. A análise dos dados indica uma predominância de *Haemonchus* sp na estação chuvosa e de *Trichostrongylus* spp no período seco. As larvas eclodidas apresentaram mobilidade e características morfológicas normais.

O tratamento de 180g com folhas verdes demonstrou menor eficácia que o tratamento com 90g de folhas. A quantidade de matéria ou soluto presente no primeiro extrato era muito grande e é possível que isto tenha dificultado a liberação dos princípios ativos. No experimento com o Neem seco, adicionou-se então 750 ml ao invés de 500ml no tratamento de 180g, para facilitar a liberação dos princípios ativos. Desta forma, o tratamento mais concentrado de folhas secas foi o que mais inibiu a eclodibilidade larvar em relação ao controle (Figura 1), demonstrando relação linear entre concentração e efeito ovicida. A concentração capaz de matar 50% das larvas (CL50) está próxima a 90.000ppm (45g/500ml). O tratamento com 180g de folhas secas demonstrou o melhor resultado, provocando inibição larvar de 89% (média de 714 larvas) em relação ao controle (6.268 larvas) (Tabela 1). Adicionalmente realizou-se secagem à sombra de cinco amostras de folhas verdes de Neem pesando 45g cada e após sete dias as cinco amostras tiveram peso médio de 19g. Tal resultado indica que 57,8% do peso inicial das folhas eram representados principalmente por água.

No experimento realizado *in vivo*, observou-se que o grupo controle esvaziava

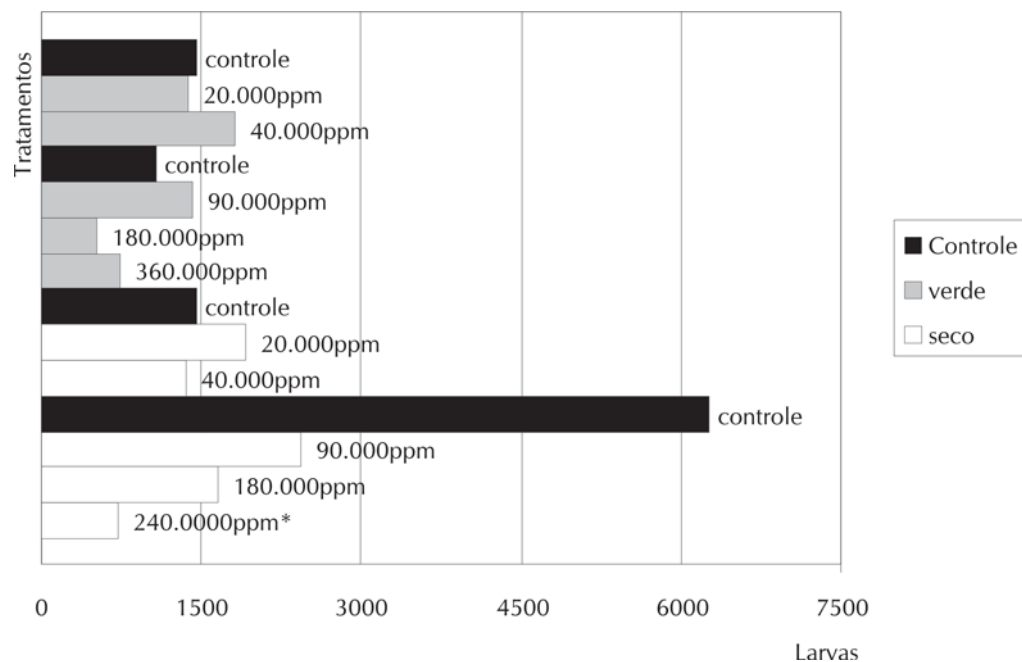


Figura 1 - Número médio de larvas recuperadas em coproculturas tratadas com extratos de folhas verdes e secas de *Azadirachta indica* em cinco diferentes concentrações (ppm). Sobral – CE, 2004

* 750 ml

o cocho em menos de 30 minutos. Já o grupo que recebia o Neem misturado, levava cerca de duas horas, demonstrando palatabilidade negativa. Os OPGs obtidos dos animais durante o experimento encontram-se sumarizados na tabela 2. Não houve diferença estatística significativa entre o grupo tratado e o controle ($p < 0,05$). Do total de ovos contados por grama de fezes nos dois grupos, 0,77% era composto de *Strongyloides* e os demais de *Haemonchus* sp. e *Trichostrongylus* spp. Ao se realizar a coprocultura deste material, detectou-se novamente que *Trichostrongylus* predomina na estação seca: média de 21,2 % para *Haemonchus* sp. e 78,8% de *Trichostrongylus* spp., tanto no grupo tratado quanto no controle.

Discussão

A predominância estacional dos gêneros estudados se confirma em estudos epidemiológicos já realizados em pequenos

ruminantes^{15,16} e bovinos^{17,18}. Estes resultados indicam que *Haemonchus* utiliza a estratégia comportamental de hipobiose durante a estação seca, deixando para concluir o ciclo de vida na estação chuvosa, quando as fases de vida livre terão mais chance de sobrevivência no pasto.

Determinou-se no presente trabalho boa eficácia do Neem a concentrações muito elevadas, o que inviabiliza sua aplicação no controle da verminose. Pessoa⁹ obteve uma boa ação no laboratório ao extrair a azadirachtina das sementes de Neem, provocando inibição de 68% na eclodibilidade de *H. contortus* a uma concentração de 1%. Ahmed et al.⁶ obteve eficácia de 35 a 40% do extrato aquoso também da semente de Neem contra nematódeos gastrintestinais de ovinos, valores próximos aos obtidos por Mostafa et al.⁷.

O problema da correlação não linear entre concentração e eficácia observado nos resultados com o Neem verde é comum em

Tabela 1 - Eficácia (%) de extratos aquosos de folhas verdes e secas de Neem sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos Moxotó e Canindé, em cinco diferentes concentrações (ppm). Sobral – CE, 2004

Extrato	Concentração (ppm)	Eficácia (%)
Folhas verdes	20.000	5,2
	40.000	0
	90.000	0
	180.000	52
	360.000	30
Folhas secas	20.000	0
	40.000	7
	90.000	61
	180.000	74
	240.000	89

Tabela 2 - Número de médio ovos por grama de fezes (OPG) coletadas por 28 dias em caprinos da raça Canindé e Moxotó (n = 12/tratamento) medicados por cinco dias com *Azadirachta indica* na dose de 30g/animal/dia (out-nov/2004). Sobral – CE, 2004

Tratamentos	OPG antes*	OPG após*
Controle	10.150a	5.839a
<i>Azadirachta indica</i>	10.400a	6.539a

* letras iguais na mesma coluna indicam ausência de diferença estatística

testes com fitoterápicos. Isto se deve às técnicas e processos utilizados na extração de princípios ativos de plantas⁹. Os constituintes químicos variam consideravelmente entre cada planta devido à variabilidade genética, diferenças ambientais, estágio de desenvolvimento, processo de secagem, extração e estocagem, podendo produzir resultados discrepantes⁷. Testes de screening devem ser realizados preferencialmente com folhas secas, pois facilita a percepção de uma possível atividade biológica, desde que o processo de secagem seja bem realizado. Nestes casos, deve-se coletar um volume de material verde maior, ocorrendo entretanto maior concentração dos princípios ativos com a evaporação da água. Bacchi²⁰ afirma que o processo de secagem também tem por finalidade impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano, garantindo maior qualidade do material. Em alguns testes realizados, observou-se que para a obtenção de 1 kg de planta seca são necessários em média 10

kg de plantas frescas²¹. Esta quantidade é bem maior que a estimada pelo presente trabalho (19g/45g). No entanto, os autores comentam que cada espécie vegetal tem em seus tecidos quantidade variável de água, o que é determinante no tempo de secagem e no volume final de material seco.

Apesar da eficácia observada no experimento *in vitro*, o Neem não demonstrou efeito anti-helmíntico no experimento *in vivo*, nas condições em que o experimento foi conduzido. Concentrações maiores que as testadas são aparentemente inviáveis para serem administradas aos animais, levando-se em consideração o problema da palatabilidade do Neem. As folhas possuem gosto amargo, que permanece na boca por algum tempo após a ingestão. Quando as folhas trituradas são misturadas com algum outro concentrado, as cabras ingerem com menor dificuldade, embora tentem separá-las do alimento utilizando as patas dianteiras e o focinho. Assim, a administração do Neem puro aos animais não é indicada, pois os mesmos têm sensibilidade gustativa suficiente para distinguir o sabor doce, salgado, ácido e amargo, demonstrando grande seletividade ao alimento²². Na prática de muitos criadores da Venezuela, quando o extrato aquoso do anti-helmíntico é colocado na água dos animais, adiciona-se também melão ou sal para ajudar na palatabilidade⁵.

Estudos investigativos com *A. indica* devem se concentrar na ação biológica do óleo extraído diretamente da semente, que possui quantidade bem maior de azadirachtina que as folhas, além da administração ser mais fácil. As sementes produzem cerca de 4 a 6g de azadirachtina por quilo de semente²³ e 85% desta substância é composta pelo isômero AZ-A, considerado o de maior potencial parasiticida. Enquanto a semente possui aproximadamente 24,85mg/100g de AZ-A, as folhas possuem somente 0,59%/100g²⁴. Estudos *in vivo*, em diferentes desafios epidemiológicos, devem ser conduzidos para se detectar a aplicabilidade do óleo no

controle dos nematódeos gastrintestinais predominantes no Brasil. Ao demonstrar eficácia satisfatória, seu uso seria interessante, visto que produtos químicos convencionais com eficácia próxima a 100%, promovem rápida seleção para a resistência. Enquanto o conceito acadêmico de controle leva em

conta a manutenção da população parasitária a nível economicamente sustentável, na prática, este conceito encontra-se totalmente distorcido com promessas de produtos químicos altamente eficazes, subestimando a capacidade que os organismos têm de vencer as pressões seletivas.

***Azadirachta indica* (Neem) action in goats gastrointestinal nematodes**

Abstract

The resistance problem in goats gastrointestinal nematodes, associated to the increasing interest for control alternatives, induced the investigation of the *Azadirachta indica* action on these parasites. In *in vitro* test it was detected ovicida and larvicida action of Neem dry and fresh leaves aqueous extracts in five concentrations. In *in vivo* test each animal received orally 30g of dry leaves for a five days period. To monitor the animals were used diary fecal eggs per gram count (FEC) by 28 days and larvae were quantified and identified through fecal culture. Predominance of *Haemonchus* sp. in rainy season and *Trichostrongylus* spp. in dry season were detected. The dry leaves aqueous extract reduced in 89% the larvae hatching of goats' gastrointestinal nematodes, in 240.000ppm concentration. However this is a very high concentration to be applied on vermin's control. The oral administration of *Azadirachta indica* triturated dry leaves did not reduce the medicated animals FEC during a period of 28 days after treatment. *A. indica* investigated studies must be concentrated in biological action of the seed oil extracted, because it possess bigger amount of azadirachtina than leaves. The oil administration also is easier, whereas the leaves have bitter taste and are prevented by animals.

Key-words:

Azadirachta indica.
Phytoteraphy.
Goats.
Gastrintestinal nematodes.
Control.

Referências

- 1 KAPLAN, R. M. et al. Validation of the Famacha eye color chart for detecting clinical anemia in sheep and goats on farms in the southern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 123, n. 1/2, p. 105-120, 2004.
- 2 LIMA, S. L. Os inimigos ocultos da pecuária. **DBO Saúde Animal**, p. 8-16, out. 2004.
- 3 MOLENTO, B. M. Opções de tratamento e risco de resistência. **DBO Saúde Animal**, p. 18-22, out. 2004.
- 4 WALLER, P. J.; RUDBY-MARTIN, L.; LJUNGSTRÖM, B. L.; RYDZIK, A. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 3, p. 207-220, 2004.
- 5 LANS, C.; BROWN, G. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 35, n. 3, p. 149-163, 1998.
- 6 AHMED, N. U. et al. Comparative efficacy of modern anthelmintics with that of Neem seeds against gastrointestinal nematodeoses in sheep. **Bangladesh Veterinary Journal**, v. 28, n. 1-4, p. 21-23, 1994.
- 7 MOSTAFA, M. et al. Epidemiology of gastrointestinal helminthes parasites in small ruminants in Bangladesh and their anthelmintic therapy. In: INTERNATIONAL WORKSHOP OF SUSTAINABLE PARASITE CONTROL IN SMALL RUMINANTS, 1., 1996, Bogor. **Anais...** Bogor: Australian Center for International Agricultural Research/ACIAR, 1996. p. 105-108.
- 8 PIETROSEMOLI, S.; OVALEZ, R.; MONTILLA, T. Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en control de nematodos gastrintestinales de bovinos a pastoreo. **Revista de la Facultad de Agronomia (LUZ)**, v. 16, n. 1, p. 220-225, 1999.
- 9 PESSOA, L. M. **Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus***. 2001. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza/CE, 2001.
- 10 HORDEGEN, P. et al. The anthelmintic efficacy of five plant products against gastrointestinal trichostrongylids in artificially lambs. **Veterinary**

- Parasitology**, v. 117, n. 1/2, p. 51-60, 2003.
- 11 SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the nim tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 271-297, 1990.
- 12 CARVALHO, S. M.; FERREIRA, D. T. Santa Bárbara contra a vaquinha. **Ciência Hoje**, São Paulo, v. 11, n. 65, p. 65-67, 1990.
- 13 ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Research**, v. , p. 99-102, 1950.
- 14 UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico de helmintoses de ruminantes**. 4ª ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.
- 15 ECHEVARRIA, F. et al. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 3-4, p. 199-206, 1996.
- 16 AROSEMENA, N. A. E. et al. Seasonal variations of gastrointestinal nematodes in sheep and goats from semi-arid area in Brazil. **Revue de Médecine Veterinaire**, v. 150, n. 11, p. 873-876, 1999.
- 17 LIMA, W. S. Seasonal infection pattern of gastrointestinal nematodes of beef cattle in Minas Gerais - Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.74, n. 2-4, p. 203-214, 1998.
- 18 NETO, M. P.; FONSECA, A. H. Epidemiologia das helmintoses pulmonares e gastrintestinais de bezerros em região de baixada do Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 4, p. 148-152, 2002.
- 19 CHAGAS, A. C. S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004. Suplemento 1.
- 20 BACCHI, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. Fundamentos da farmacobotânica. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 229-245.
- 21 MENTZ, L. A.; BORDIGNON, S. A. de L. Nomenclatura botânica, classificação e identificação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GROSMANN, G. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. p. 211-227.
- 22 UOV. Universidade On-Line de Viçosa. **Nutrição de caprinos**. Disponível em: <<http://www.criareplantar.com.br/pecuária/caprino>>. Acesso em: 24 fev. 2005.
- 23 MORDUE, A. J.; NISBET, A. J. Azadirachtin from the Neem tree *Azadirachta indica*: its actions against insects. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 4, p. 615-632, 2000.
- 24 SUNDARAM, K. M. S. Azarirachtin biopesticide: a review of studies conducted on its analytical chemistry, environment behavior and biological effects. **Journal of Environmental Science and Health**, v. B13, n. 4, p. 913-948, 1996.