

Efeito do balanço cátion-aniônico da dieta no equilíbrio ácido-básico e metabolismo de minerais em vacas lactantes da raça Holandesa em ambiente quente

Orlando Rus Barbosa^{1*}, Lúcia Maria Zeoula¹, Claudete Regina Alcalde¹, Eduardo Shiguero Sakagushi¹, Geraldo Tadeu dos Santos¹, Newton Pöhl Ribas², Alexandre Santos Alves³, Fernando José dos Santos Dias¹ e Luís Roberto Bigão Giacomelli⁴

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. ³Secretaria de Agricultura do Paraná.

⁴Hospital Universitário, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: orbarbosa@uem.br

RESUMO. Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos do balanço cátion-aniônico da dieta (BCAD) nas respostas do estado ácido-básico sistêmico e nas concentrações plasmáticas e urinárias de minerais (Ca, P, Mg, Na, K, Cl) e Creatinina em vacas da raça Holandesa, durante a época do verão. Nove vacas lactantes foram utilizadas de acordo com a idade e a produção de leite, distribuídas em um modelo de quadrado latino 3x3. As dietas continham silagem de milho e ração concentrada na razão de 1:1 (base na MS), sendo formuladas para fornecer +32 mEq de $[(Na + K) - Cl]/100g$ de MS da dieta, em 3 tratamentos: 1) dieta controle + 1,57% de KCl da MS fornecida; 2) dieta controle + 1,22% de NaCl da MS fornecida; 3) dieta controle. Amostras de sangue e de urina foram coletadas quatro horas após a alimentação da manhã do último dia de cada período experimental, para análise dos minerais Ca, P, Mg, Na, K, Cl e da Creatinina, além da gasometria do sangue. O pH do sangue e da urina não sofreu efeito dos tratamentos. Nenhum efeito no equilíbrio ácido-básico e no metabolismo dos minerais no sangue e na urina foi observado, mostrando que os animais não responderam ao fornecimento de um balanço cátion-aniônico dietético de +32 mEq/100g de MS na dieta, acrescida ou não de KCl ou NaCl.

Palavras-chave: estado ácido-básico, balanço cátion-aniônico, sangue, urina.

ABSTRACT. Effect of dietary cation-anion balance, on acid-basic status and mineral metabolism of lactating dairy Holstein cows in hot weather.

The objective was to evaluate the response of lactating dairy cows to dietary Na, K, and Cl while holding cation-anion balance constant. Nine lactating Holstein cows, blocked according to age and previous milk yield, were assigned randomly to replicated 3x3 Latin squares with experimental period of 3 week. Diets contained corn silage and concentrate ration in a 50:50 rate (DM basis) and were formulated to provide + 32 mEq of $(Na + K) - Cl/100g$ diet DM via one of three variations: 1) control diet plus 1.57% of KCl in DM basis, 2) control diet plus 1.22% of NaCl in DM basis, 3) control diet. Samples of blood and of urine were collected four hours after feeding of the morning, in the last day of each experimental period for analysis of mineral Ca, P, Mg, Na, K, Cl and of Creatinin, and of the gasometria of the blood. The blood and urine pH did not suffer effect of the treatments. Any effect in the acid-basic balance and in the metabolism of the minerals in the blood and in the urine it was observed, showing that the animals did not answer to the supply of a balance dietary cation-anion of +32 mEq/100g of DM in the diet.

Key words: acid-basic status, blood, cation-anion balance, urine.

Introdução

A regulação da homeostase requer que o número de partículas positivas seja igual ao número de íons negativos. A relação aniônica é a diferença em miliequivalentes entre a soma de sódio mais potássio menos cloro mais a concentração de bicarbonato no sangue $[(Na + K) - Cl] + [HCO_3^-]$, sendo essa relação obtida pelas formas ionizadas de ácidos orgânicos e

inorgânicos, tais como lactato, fosfato e proteínas do plasma (Escobosa *et al.*, 1984).

As vacas, quando submetidas às condições climáticas quentes, apresentam distúrbios no equilíbrio ácido-básico, resultando em alcalose respiratória, com subsequente compensação renal pelo aumento da excreção urinária de HCO_3^- e Na e conservação renal de K (Collier, 1982).

O sistema tampão possui importante papel na manutenção do pH sanguíneo. O sistema bicarbonato/ácido carbônico ($\text{HCO}_3/\text{H}_2\text{CO}_3$) é um tampão relacionado ao controle do corpo, alterando a pressão parcial de dióxido de carbono (pCO_2), por meio da respiração ou pelo controle metabólico da concentração de HCO_3 no sangue (Lewis, 1979), citado por Escobosa *et al.* (1984).

Eletrólitos são os elementos-chave do balanço cátion-aniónico, e sua suplementação durante o estresse por calor pode ser crítico para os mecanismos homeostáticos do animal.

Os elementos inorgânicos, apesar de constituírem somente 4% do peso corporal, têm papel fundamental no metabolismo, sendo essenciais tanto na utilização de proteína e de energia como na síntese de compostos essenciais ao organismo (Signoretti *et al.*, 1999).

O BCAD age diretamente no equilíbrio ácido-básico do organismo de ruminantes adultos, podendo influenciar o desempenho da lactação, o metabolismo do cálcio, a utilização do fósforo e ainda manipular outras funções fisiológicas (Setti *et al.*, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o equilíbrio ácido-básico e o metabolismo de minerais de vacas Holandesas lactantes, recebendo dietas contendo similar BCAD (+ 32 mEq/100g MS), submetidas ao estresse por calor.

Material e métodos

Local, desenho experimental e animais utilizados. O experimento foi conduzido nas instalações da Fazenda Experimental de Iguatemi, da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná, de janeiro a março de 2002.

Foram utilizadas 9 vacas lactantes da raça Holandesa, com aproximadamente 150 dias pós-parto, produzindo em média 23kg de leite/dia, as quais permaneceram em sistema confinado, recebendo silagem de milho e ração concentrada, 2 vezes ao dia. As vacas foram distribuídas em 3 grupos de 3 animais, avaliadas quanto ao estado sanitário e ao escore corporal, integrando um quadrado latino 3x3. A primeira semana de cada período foi considerada como de adaptação, e as duas posteriores, como de coleta de dados experimentais.

Tratamentos. As dietas continham silagem de milho e ração concentrada na razão de 1:1 (base na MS), sendo formuladas para fornecer +32 mEq de $[(\text{Na} + \text{K}) - \text{Cl}]/100\text{g}$ de MS da dieta, em 3 tratamentos: 1) dieta controle + 1,57% de KCl da MS fornecida; 2) dieta controle + 1,22% de NaCl da MS fornecida; e 3) dieta controle.

Foram obedecidas as exigências em nutrientes de vacas leiteiras lactantes conforme NRC (2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes e composição percentual da dieta com base na MS¹.

Itens	Dieta		
Ingredientes	KCl ²	NaCl ³	Controle
Silagem de milho	50,03	50,03	50,03
Milho moído	24,54	24,54	24,54
Farelo de soja	17,54	17,54	17,54
Farelo de trigo	5,00	5,00	5,00
Fosfato bicálcico	0,53	0,53	0,53
Calcário	1,06	1,06	1,06
Sal comum	0,35	0,35	0,35
Bicarbonato de sódio	0,59	0,59	0,59
Premix mineral/vitaminico ⁴	0,35	0,35	0,35
Total	100,00	100,00	100,00
Nutrientes			
MS (%)	46,0	46,0	46,0
PB (%)	15,4	15,4	15,4
FDN (%)	33,0	33,0	33,0
EM (Mcal/kg)	2,63	2,63	2,63
Ca (%)	0,72	0,72	0,72
P (%)	0,49	0,49	0,49
Mg (%)	0,24	0,24	0,24
Na (%)	0,32	0,67	0,32
Cl (%)	1,05	0,85	0,32
K (%)	1,93	1,15	1,15
S (%)	0,18	0,18	0,18
BCAD (mEq/100 g de MS) ⁵	32,00	31,38	31,62

¹ Ingestão média da MS correspondeu a 17kg de MS, relativo a 3,1% do PV; ² Cloreto de potássio (1,57% da MS fornecida); ³ Cloreto de sódio (1,22% da MS fornecida); ⁴ Premix mineral/vitaminico: manganês - 56g, ferro - 64,5g, zinco - 74,5g, cobre - 17,0g, cobalto - 1,25g, iodo - 1,50g, veículo q.s.p. - 1000g; vitamina A - 4800000 UI, vitamina D3 - 480000 UI, vitamina E - 24000 UI, ácido nicotínico - 80.000mg, selênio - 240.000mg e veículo q.s.p. - 1000g; ⁵BCAD = $[(\text{Na} + \text{K}) - \text{Cl}]$ (Mogin, 1980).

Os alimentos foram amostrados semanalmente para posterior análise de nutrientes. A composição da matéria seca (MS) da silagem de milho foi determinada semanalmente e utilizada para manter constante a proporção de ingredientes da dieta. Os consumos de alimentos foram controlados diariamente, por meio do controle das sobras.

Amostras de Sangue e de Urina. Foram coletadas, 4 horas após a alimentação da manhã, no último dia de cada período experimental, 15mL de sangue. A coleta deu-se por punção da veia jugular, sendo a amostra acondicionada em 2 tubos a vácuo, contendo heparina, um para separação do plasma, e o outro para determinação do pH, pO_2 , pCO_2 , bicarbonato (HCO_3), tensão de CO_2 (TCO_2), excesso de base (EB) e saturação de O_2 (Sat.O_2), por meio da utilização de analisador de gases sanguíneos, modelo AGS21®. As amostras de sangue foram mantidas em refrigeração até a análise, realizada em período máximo de duas horas após a coleta. A urina foi coletada conforme Valadares *et al.* (1997) e analisada para pH, Ca, P, Mg, Na, K, Cl e Creatinina.

Variáveis Ambientais. No período experimental, foram feitas medidas da temperatura e da umidade relativa do ar, da temperatura do globotermômetro, da velocidade do vento, da precipitação pluviométrica, do calor radiante e do índice de temperatura e de umidade (ITU).

Todas as medidas das variáveis climáticas foram efetuadas 2 vezes por semana, às terças e às quintas-feiras, nos períodos da manhã (9h) e da tarde (14h).

A velocidade do vento foi obtida com auxílio de

um termoanemômetro modelo Kestrel®300.

As temperaturas e a umidade do ar foram obtidas por meio de um psicrômetro não ventilado de bulbo úmido.

Para a obtenção do calor radiante, foi utilizado um globotermômetro de 15cm de diâmetro exposto ao sol e um à sombra, instalados a 1,70m do solo, na parte central da área coberta do estábulo.

A partir dos dados de temperatura e de umidade, foi calculado o índice de temperatura e de umidade (ITU), segundo Thom (1958):

$$ITU = ta + 0,36t_{po} + 41,5$$

onde ta = temperatura do ar, °C; t_{po} = temperatura do ponto de orvalho, °C.

Análise Estatística. Os dados foram analisados conforme o modelo matemático a seguir, utilizando-se o procedimento GLM do analisador estatístico SAS (2001):

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijkl}$$

onde μ é a média geral; A_i é o efeito do animal i ; P_j é o efeito do período j ; T_k é o efeito do tratamento k ; e e_{ijkl} é o erro aleatório associado à cada observação.

Resultados e discussão

Observações climáticas

As condições climáticas durante o experimento (Tabela 2) demonstram que os animais estiveram expostos a condições estressantes durante o experimento. Segundo Hahn (1985), um valor de ITU igual ou menor do que 70 indica condições normais não estressantes, e que um valor acima de 83 já constitui uma situação de emergência.

Balanço mineral no sangue e na urina

Conforme a Tabela 3, nenhum efeito ($p > 0,05$) dos tratamentos foi encontrado para os minerais analisados no sangue e na urina.

Tabela 2. Valores médios, máximos e mínimos das variáveis meteorológicas durante o período experimental.

Variáveis meteorológicas			Média	Máxima	Mínima
Temperatura do ar (°C)	Manhã		23,1	29,5	17,0
	Tarde		28,5	35,0	20,0
Umidade relativa do ar (%)	Manhã		78,8	100,0	57,8
	Tarde		49,8	81,2	30,7
Velocidade do vento (m.s ⁻¹)	Manhã		0,8	2,7	0,1
	Tarde		1,5	4,9	0,4
Temperatura do globo negro (°C)	Manhã	Sol	30,7	42,0	17,0
		Sombra	25,6	38,6	18,5
	Tarde	Sol	38,0	48,0	20,0
		Sombra	32,6	43,0	21,0
Índice de temperatura e umidade (ITU)	Manhã		71,6	79,1	46,0
	Tarde		76,7	84,7	46,0

Tabela 3. Médias dos valores dos elementos minerais no sangue e na urina nos diferentes tratamentos e os erros-padrão (EP).

Variáveis	Tratamentos			EP	CV(%)
	KCl	NaCl	Controle		
	Sangue				
Ca, mg/dL	9,36	8,94	9,23	0,46	15,10
P, mg/dL	4,77	4,83	5,36	0,29	17,75
Mg, mg/dL	2,01	2,12	2,20	0,08	11,93
Creatinina, mg/dL	1,51	1,48	1,43	0,07	14,26
Na, mEq/L	142,3	138,1	139,3	1,54	3,32
K, mEq/L	4,47	4,35	4,36	0,15	10,55
Cl, mEq/L	109,51	105,03	102,10	2,17	6,17
	Urina				
Ca, mg/dL	2,50	1,65	1,32	0,79	131,09
P, mg/dL	9,64	19,20	16,48	4,73	94,01
Mg, mg/dL	9,77	16,57	14,02	2,46	55,00
Creatinina, mg/dL	93,77	73,86	72,48	11,05	41,44
Na, mEq/L	54,66	86,11	49,54	13,05	61,74
K, mEq/L	105,91	121,13	73,10	28,04	84,08
Cl, mEq/L	57,97	75,17	20,74	16,10	94,21

EP = erros-padrão; CV = coeficiente de variação.

Embora não tenha apresentado diferenças entre as dietas, observa-se que a concentração de Ca e Creatinina na urina tendeu a ser maior para o tratamento KCl, e as de P, Mg, Na, K e Cl para o tratamento NaCl (Tabela 3). Com relação ao P e ao Mg, estes tenderam a diminuir para o tratamento KCl, e o Ca, Creatinina, Na, K e Cl para o tratamento controle. Isso demonstra que a excreção urinária desses elementos minerais se baseia unicamente em relação a sua suplementação na dieta, estando esses resultados de acordo com os obtidos por Tucker *et al.* (1988).

LaManna *et al.* (1999) também não observaram diferenças para as concentrações de Na, K, Mg, Ca e P, quando empregaram suplementações de NaCl, NH₄Cl e Na₂SO₄. Apenas a concentração de Cl foi alterada; fato justificado como função dos tratamentos utilizados e do consumo de Cl.

Shalit *et al.* (1991) confirmaram que uma acentuada redução na concentração de Na, K e Cl na urina pode ser resultado da elevação do sistema aldosterona-renina-angiotensina, que é ativado quando o Na é deficiente, fato não observado no presente trabalho, mostrando inexistir deficiência do mineral.

O aumento da excreção urinária de Ca para o tratamento KCl e menor para o tratamento controle sugere uma competição entre o K e o Ca, quando da reabsorção renal pelos filtros glomerulares. Segundo Delaquis e Block (1995), o aumento da excreção urinária de Ca tem sido constantemente relatado e atribuído ao estresse ácido e à reduzida capacidade de os rins absorverem o Ca, também resultado da acidose, mecanismo este ainda não bem conhecido.

Resultados diferentes foram obtidos por Tucker e Hogue (1990), que encontraram excreção maior de Ca para a dieta NaCl + 20 mEq/100g MS, e menor para KCl + 20 mEq/100g MS. A justificativa foi a ocorrência da maior competição entre Na e Ca nos rins. A possibilidade de maior secreção do hormônio da paratireóide, quando do fornecimento da dieta KCl, fato que contribuiria pela maior retenção de Ca, também foi abordada.

Quanto ao P e ao Mg, a tendência foi de serem menos excretados, quando recebiam o tratamento KCl, em relação ao tratamento NaCl, podendo ser resultado do aumento na absorção do P e do Mg pelo trato gastrointestinal (TGI) devido à maior presença de K, resultados estes semelhantes aos obtidos por Tucker e Hogue (1990).

Com relação à Creatinina, por ser um produto final do metabolismo dos compostos nitrogenados, tais como aminoácidos (glicina, arginina e metionina), segundo Harper *et al.* (1982), ela é excretada em quantidade relativamente constante, independente da dieta.

Estado ácido-básico no sangue e na urina

Não foram verificados efeitos do BCAD (Tabela 4) para o pH no sangue, permanecendo o mesmo entre 7,35 a 7,50, valores dentro da normalidade, segundo Tucker *et al.* (1988).

Tabela 4. Médias dos valores do pH e do estado ácido-básico do sangue e do pH da urina, nos diferentes tratamentos e os erros-padrão (EP).

Estado ácido-básico	Tratamentos			EP	CV(%)
	KCl	NaCl	Controle		
pH (sangue)	7,46	7,45	7,46	0,005	0,22
pO ₂	29,70	30,97	31,16	1,23	12,11
pCO ₂	33,96	33,62	35,21	0,61	5,34
HCO ₃	24,30	24,70	25,55	0,38	4,63
TCO ₂	25,40	25,62	25,65	0,35	4,16
EB	1,20	1,10	2,23	0,35	71,12
O ₂ Sat.	60,22	62,12	64,13	2,63	12,71
pH (urina)	7,90b	8,06ab	8,23a	0,08	3,07

EP = erros-padrão; CV = coeficiente de variação; pO₂ = pressão de O₂; pCO₂ = pressão parcial de CO₂; HCO₃ = bicarbonato; TCO₂ = tensão de CO₂; EB = excesso de base; O₂Sat = O₂ saturado.

O equilíbrio do pH sanguíneo pode ser descrito de acordo com a equação de Henderson-Hasselbach (Guyton, 1986): $\text{pH sangue} = 6,1 + \log_{10} [(\text{HCO}_3 / (0,03 \times \text{pCO}_2))]$. Alterações no bicarbonato ou pCO₂ sanguíneas teriam efeito imediato no pH. Devido à manutenção do pH do sangue ser crítico para o funcionamento normal do corpo, mecanismo homeostático tem sido desenvolvido para manter a concentração de bicarbonato para pCO₂, numa relação constante. Isso é acompanhado pelo ajustamento da frequência respiratória e da excreção renal de bicarbonato, com finalidade de controlar, respectivamente, a pCO₂ e a concentração de bicarbonato no sangue.

Tucker *et al.* (1988) verificaram tendência de aumento no pH sanguíneo, quando do emprego do BCAD +20 (7,427) contra BCAD +0 (7,375), embora os valores se encontrem dentro da variação de 7,35 a 7,50. Parece que o mecanismo pelo qual o BCAD afeta o pH do sangue aumentaria a sua concentração de bicarbonato, o que ocorre por absorção de Na e K pelo trato gastrointestinal.

Devido ao Na e ao K também serem absorvidos pelo TGI, pela alteração na secreção de um próton, e

o Cl ser também absorvido pelo TGI, pela secreção de íon bicarbonato (Guyton, 1986), alguma alteração nas quantidades relativas de Na, K e Cl, absorvidos no TGI, pode afetar o estado ácido-básico do animal.

Escobosa *et al.* (1984) não encontraram efeito nos valores dos eletrólitos sanguíneos, quando do fornecimento de dieta com BCAD +195 mEq/kg MS e com BCAD +350 mEq/kg MS.

A Tabela 4 revela que o BCAD no sangue foi maior para as vacas que receberam o tratamento KCl, embora esse maior balanço não implicasse aumento na concentração de bicarbonato. Pelo contrário, foi o menor valor observado entre os tratamentos fornecidos, mostrando que o tratamento KCl apresentou efeito positivo na absorção desses elementos minerais.

Nenhum efeito significativo ($p > 0,05$) (Tabela 4) foi observado pelos tratamentos oferecidos, com relação ao estado ácido-básico das vacas.

Em relação ao pH da urina, maiores valores foram obtidos para as vacas que receberam os tratamentos controle (8,23) e NaCl (8,06). Tucker *et al.* (1988) reportaram que a excreção renal de ácido diminuía quando o BCAD era aumentado. A tendência para o pH da urina ser maior para vacas com o tratamento controle e NaCl pode ser atribuída à excreção renal compensatória de bicarbonato. Devido à variação inerente à diluição, torna-se difícil estabelecer o valor normal para o pH da urina, embora, de acordo com Harper *et al.* (1982), essa variação esteja em torno de 4,7 a 8,0.

Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que em dietas com balanço cátion-aniônico de +32 mEq/100g MS, para vacas nesse nível de produção, não resultou efeito significativo que justifique sua utilização.

Referências

- COLLIER, R. J. *et al.* Influence of environment and its modification on dairy animal health and production. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.65, p.2213-2227, 1982.
- DELAQUIS, A. M.; BLOCK, E. Dietary cation-anion difference, acid-base status, mineral metabolism renal function, and milk production of lactating cows. *J. Anim. Sci.*, Savoy, v.78, p.2259-2284, 1995.
- ESCOBOSA, A. *et al.* Effects of dietary sodium bicarbonate and calcium chloride on physiological responses of lactating dairy cows in hot weather. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.67, p.574-584, 1984.
- GUYTON, A. C. *Textbook of Medical Physiology*. 7. ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co. PA. 1986.
- HAHN, G. L. Management and housing of farm animals in hot environments. In: *Stress physiology in livestock*, vol II (M.K. Yousef, ed.). Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 151-174.
- HARPER, H. A. *et al.* *Manual de química fisiológica*. 5.

ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1982.

LAMANNA, A. F. *et al.* Impact of dietary cation anion balance on water intake and physiological measurements of feedlot cattle. *Animal Sci Reserach Report*, 1-9, 1999. Disponível em: <C:/http://www.ansi.okstate.edu/research/1999rr/27.htm.>

MOGIN, P. Role of sodium, potassium and chloride in eggshell quality. p. 213-223. *In: Proceedings of Nutrition Conference of Florida*. Florida: 1980.

NRC-NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 6.ed. Washington, DC: 2001.

SAS. *SAS User's Guide*. SAS Institute, Inc., Cary, NC. 2001.

SETTI, M. C. *et al.* Estudo do balanço cátion-aniônico da dieta no desempenho de vacas holandesas. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v.27, n.6, p.1241-1247, 1998.

SHALIT, W. *et al.* Water, sodium, potassium, and chlorine metabolism of dairy cows at the onset of lactation in hot weather. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.4, p.1874-1883, 1991.

SIGNORETTI, R. D. *et al.* Composição corporal e

exigências líquidas e dietéticas de macromelementos inorgânicos (Ca, P, Mg, K e Na) de bezerros da raça holandesa alimentados com dietas contendo diferentes níveis de volumoso. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v.28, n.1, p.205-213, 1999.

THOM, E. C. Cooling degree: day air conditioning, heating, and ventilating. *Trans. Amer. Soc. Heatg. Refrig. Air-Cond. Engrs.*, v.55, p.65-72, 1958.

TUCKER, W. B.; HOGUE, J. F. Influence of sodium chloride or potassium chloride on systemic acid-base status, milk yield, and mineral metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.73, p.3485-3493, 1990.

TUCKER, W. B. *et al.* Influence of dietary cation-anion balance on milk, blood, urine and rumen fluid in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, Savoy, v.71, p.346-354, 1988.

VALADARES, R. F. D. *et al.* Metodologia de coleta de urina em vacas utilizando sondas de folley. *Rev. Bras. Zootec.*, Viçosa, v.26, n.6, p.1279-1282, 1997.

Received on July 16, 2003.

Accepted on January 28, 2004.