# ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PLANTAS DA CAATINGA SOBRE Fusicoccum sp.

## Paulo Nogueira BARROS (1); Jéssica de Sousa LIMA (2); Wilza Carla Oliveira de SOUZA (3); Erbs Cintra de Souza GOMES (4); Jane Oliveira PEREZ (5)

- (1) IF SERTÃO-PE, Campus Petrolina Zona Rural, BR 235, km 22, PISNC N4, CEP: 56.302-910, Petrolina, PE, Brasil, e-mail: paulonogueirabarros@hotmail.com
- (2) IF SERTÃO-PE, Campus Petrolina Zona Rural, BR 235, km 22, PISNC N4, CEP: 56.302-910, Petrolina, PE, Brasil, e-mail: jessyka\_llima@hotmail.com
- (3) IF SERTÃO-PE, Campus Petrolina Zona Rural, BR 235, km 22, PISNC N4, CEP: 56.302-910, Petrolina, PE, Brasil, e-mail: wilza-souza@hotmail.com
- (4) IF SERTÃO-PE, Campus Petrolina Zona Rural, BR 235, km 22, PISNC N4, CEP: 56.302-910, Petrolina, PE, Brasil, e-mail: erbs.cintra@ifsertao-pe.edu.br
- (5) IF SERTÃO-PE, Campus Petrolina Zona Rural, BR 235, km 22, PISNC N4, CEP: 56.302-910, Petrolina, PE, Brasil, e-mail: jane.perez@ifsertao-pe.edu.br

#### **RESUMO**

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de manga (*Mangifera indica* L.), ocupando lugar de destaque no cenário internacional principalmente pela qualidade dos frutos aqui produzidos. No entanto, perdas significativas são observadas em todas as etapas da cadeia produtiva da manguicultura, principalmente as de origem fitopatogênica causada por fungos. Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a ação fitotóxica de extratos etanólicos de plantas da caatinga a *Fusicoccum* sp. agente causal de doenças na pós-colheita da manga. Amostras de folhas de angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronium urundeuva*), maniçoba (*Manihot aesculifolia*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), catingueira (*Caesalpinia microphylla* Mart.) e alecrim (*Lippia microphylla* Cham.) foram coletadas em diferentes regiões do Vale do São Francisco, levadas ao Laboratório de Produção Vegetal do IF SERTÃO-PE, Campus Petrolina Zona Rural, para secagem e extração dos compostos pelo método de destilação a vácuo. Os ensaios microbiológicos foram realizados em placas de Petri. O uso de extrato etanólico de alecrim (*L. microphylla*) e jurema preta (*M. hostilis*) apresentaram ação fungitóxica com controle de 53,6 e 25%, respectivamente, sobre *Fusiccocum* sp. constituindo-se nesta, uma alternativa promissora de controle de podridões póscolheita.

Palavras-chave: Atividade fungitóxica, extrato etanólico, agroecologia, Mangifera indica L

## INTRODUÇÃO

A produção de manga no Brasil apresenta grande potencial de crescimento tanto para exportação quanto para abastecimento do mercado interno, sendo que no ano de 2000, a produção brasileira foi de 969 mil toneladas (AGRIANUAL, 2002) e as exportações em 2002 atingiram U\$ 50 milhões e 103 mil toneladas (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2003), conferindo à fruta o primeiro lugar entre as frutas exportadas em valor e o segundo em peso.

O Nordeste do Brasil é a principal região produtora de manga do país com 53% da produção nacional, sendo o submédio do Vale do São Francisco considerado o maior exportador de manga no Brasil (PINTO, 2002), isso em virtude dos altos níveis de produtividade, aliados à qualidade final do produto.

Apesar do volume de manga exportado por essa região representar 35% de sua produção total, é essencial que se invista em qualidade do processo de produção para que se obtenham frutos de maior valor comercial. Essa valorização é requisito para que o Brasil consolide sua posição de principal exportador de manga para a Europa, aumente sua participação no mercado norte americano e atinja o recém-aberto mercado asiático.

Entretanto, os frutos são acometidos por diversas doenças na pré e pós-colheita que afetam em especial, as exportações brasileiras. As perdas podem atingir níveis superiores a 25%.

As doenças pós-colheita podem iniciar no campo e ficarem latentes por longos períodos, vindo a manifestarse apenas na pós-colheita e ainda, em condições ambientais favoráveis (Gomes, 1996) ou, em condições inadequadas de armazenamento. Quando infectados ainda no campo, os frutos apenas manifestam os sintomas de deterioração em consequência das doenças quando completam o amadurecimento, cerca de 30 dias depois de colhidos. Neste tempo, em geral, já estão desembarcadas nos portos dos países importadores e prestes a serem levadas para venda ao consumidor.

Nas últimas décadas, esforços têm sido realizados na tentativa de se utilizar métodos alternativos, visando a redução do uso do controle químico tradicional, pois este além de causar prejuízos aos ecossistemas naturais vem causando danos diretos à saúde humana (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003). Assim, visando minimizar os efeitos negativos do uso de pesticidas no controle de doenças pós-colheita de manga 'Tommy atkins', objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito fitotóxico de extratos de Angico (*A. macrocarpa*), Aroeira (*A. urundeuva*), Maniçoba (*M. aesculifolia*), Jurema Preta (*M. hostilis*), Catingueira (*C. microphylla* Mart.) e Alecrim (*L. microphylla* Cham.)

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## Mangueira (Mangifera indica L.)

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores e exportadores de frutas tropicais do mundo, sendo a manga (*Mangifera indica* L.) um dos principais itens de exportação. Em 2007, a exportação brasileira desta fruta atingiu aproximadamente 89,6 milhões de dólares, representando 13,9% do valor das exportações brasileiras de frutas frescas (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS, 2008).

A variedade de manga Tommy Atkins no mercado brasileiro representa 79% da comercialização da área plantada, e o bom rendimento físico e boa resistência ao transporte a longas distâncias são os principais atributos a seu favor. (MARTIN, 2006).

Atualmente, a Tommy Atkins é a mais produzida e a que possui a maior participação no volume comercializado no mundo, devido principalmente a sua coloração intensa, produções elevadas e resistência ao transporte a longas distâncias. No Brasil, principalmente, na região do vale do São Francisco, os plantios comerciais incorrem em sérios riscos biológicos (pragas e doenças) e econômicos devido à concentração da maior parte da produção basear-se em apenas um cultivar. Desta forma, a diversificação de cultivares comerciais é de fundamental importância para proporcionar maior sustentabilidade ao agronegócio da manga na região (EMBRAPA, 2004).

#### Fusiccocum sp.

Estudos têm relatado espécies de *Fusicoccum* infectando mangas na Califórnia (Ramos et al., 1991) e abacate na Nova Zelândia (HARTILL, 1991). Isolados de *Dothiorella dominicana* Petr. & Cif. foram encontrados infectando mangas na Austrália (JOHNSON, 1992), sendo identificados como a espécie *Fusicoccum parvum* (PENNYCOOK & SAMUELS, 1985; SLIPPERS et al., 2004; 2005). JOHNSON (1992) mostra claramente que *F. parvum* (reportada como *D. dominicana*) é um dos fitopatógenos mais comuns infectando mangueira, causando morte dos ponteiros, queima de botão na mangueira e podridão peduncular em frutas.

No hemisfério norte, fungos do gênero *Fusicoccum* tem causado sérios prejuízos em pomares de ameixeira (*Prunus domestica* L.), localizados em regiões úmidas, onde uma infecção severa pode acarretar a morte da planta, sendo observado em épocas de muita chuva, em pomares mal cuidados, na maioria das cultivares plantadas comercialmente. No sul do Brasil, tem sido encontrada com freqüência em pomares de pessegueiros (*Prunus persicae* L.) (ANDRADE & DOCROQUET, 2002).

## Extratos vegetais no controle de fitopatógenos

Algumas plantas são naturalmente resistentes a danos causados por patógenos, pois produzem compostos que são tóxicos ou que rompem o ciclo de vida desses organismos (ARNASON et. al, 1989). Essas substâncias, denominadas compostos secundários ou aleloquímicos (WHITTAKER, 1972), são compostos biossinteticamente derivados de metabólitos primários e não têm função aparente, mas têm importante papel ecológico servindo, entre outros, como defesa química contra microrganismos, insetos e predadores (GUIRADO, 2004).

Pesquisas desenvolvidas com extrato bruto ou óleo essencial, obtidos de plantas medicinais, têm indicado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungitóxica direta quanto por alterações fisiológicas na planta, como indução de enzimas relacionadas à patogênese e fitolexinas, lignificação da folha, entre outras (STANGARLIN et al., 1999; SCHWAN-ESTRADA & STANGARLIN, 2005).

A homeopatia, método terapêutico que consiste na prescrição de substâncias em preparações altamente diluídas e sucussionadas que produzem efeitos semelhantes ao da doença, é permitida na agropecuária orgânica (MAPA, 1999). Há relatos da eficiência de preparações homeopáticas no controle de doenças e pragas: em tomateiro, a podridão pós-colheita dos frutos, causada por *Fusarium roseum* (Link) Sny. et Hans., foi reduzida com tratamentos homeopáticos. Em testes in vitro e in vivo, os preparados de *Arsenicum album* (C1), *Kali iodatum* (C149), *Phosphorus* (C35) e *Thuja occidentalis* (C87) inibiram a germinação de esporos de *F. roseum*, e os de *K. iodatum* e *T. occidentalis* inibiram o crescimento micelial do fungo (Khanna & Chandra, 1976). A incidência do oídio, causado por *Oidiopsis siculae* Scalia, em tomateiros tratados com *K. iodatum* (C100), 46,6%, foi inferior à da testemunha, 58% (ROLIM et al., 2001). Um produto homeopático foi avaliado para o controle da requeima, porém não foi eficiente como a calda bordalesa (VAN BOL et al., 1993).

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Produção Vegetal do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Sertão Pernambucano (IF SERTÃO-PE), Campus Petrolina Zona Rural, Petrolina, PE.

### Obtenção do isolado de Fusicoccum sp

Fusicoccum sp. foi isolado de frutos de manga 'Tommy atkins' com sinais e sintomas do patógeno, oriundas de pomares do submédio do Vale do São Francisco, e mantido em meio batata dextrose agar (BDA) no Laboratório de Produção Vegetal. O isolamento foi realizado por plaqueamento de fragmentos da fruta que possuíam sintomas de doenças e/ou sinais de fitopatógenos. Fragmentos da área de transição das lesões foram retirados e plaqueados em meio BDA, acrescido de antibiótico. Cada placa continha três pontos de isolamento. As placas foram incubadas em B.O.D. à 27°C e fotoperíodo de 12 horas durante 25 dias, quando então ocorreu a identificação dos fitopatógenos através da visualização de lâminas em microscópio óptico.

#### Extratos de plantas da caatinga

Folhas de plantas da caatinga para obtenção dos extratos de angico (*A. macrocarpa*), aroeira (*A. urundeuva*) e catingueira (*C. microphylla*) foram coletadas na Fazenda experimental do Campus Petrolina Zona Rural (IF SERTÃO-PE), e as folhas maniçoba (*M. aesculifolia*), jurema preta (*M. hostilis*) e alecrim (*L. microphylla*) foram coletadas no distrito de Riacho Pequeno, município de Belém do São Francisco, PE.

Após a coleta, o material vegetal foi colocado em sacos de polietileno de baixa densidade, acondicionados em caixas isotérmicas e transportados ao Laboratório de Produção Vegetal. No laboratório, as amostras foram lavadas e sanificadas com hipoclorito de sódio a 1% deixando-as secar a temperatura ambiente ( $28 \pm 2$  °C e UR 75  $\pm$  6%). Posteriormente, procedeu-se a secagem em estufa de circulação forçada a 40°C por 72 horas. Em seguida, as amostras foram maceradas em etanol p.a. na proporção de 10:1g de material vegetal por 24 horas. Para a extração, seguiu-se o método de destilação vácuo, utilizando-se um evaporador rotativo acoplado a bomba de vácuo, sendo obtido ao final 30 ml de cada extrato.

## Atividade fungitóxica de extratos a Fusiccocum sp.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com sete tratamentos (extratos): T1 - Testemunha (ADE); T2 - angico (A. macrocarpa); T3 - maniçoba (M. aesculifolia); T4 - alecrim (L. microphylla); T5 - jurema preta (M. hostilis); T6 - aroeira (A. urundeuva) e T7 - catingueira (C. microphylla.) e quatro repetições. O crescimento das colônias foi determinado medindo-se o diâmetro das colônias diariamente, em dois sentidos perpendicularmente opostos, com uma régua milimetrada. Os dados observados foram submetidos a análise de variância sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade com o auxílio do software estatístico SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2000).

De cada tratamento foram retirados 50 μL do extrato transferidos para o centro das placas de Petri com BDA. A partir de colônias puras de *Fusicoccum* sp. com 25 dias de cultivo, foram retirados discos de micélio de 5 cm de diâmetro. Estes discos individualmente foram inseridos nos centros das placas com os respectivos tratamentos. A incubação foi realizada até a testemunha atingir 100% da placa de Petri. Para cada um dos tratamentos, foram utilizados quatro repetições, constituídas por uma placa de Petri cada. Na testemunha, foram adicionados 50 μL de ADE (Água Destilada Esterilizada).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os extratos avaliados, os extratos de alecrim (*L. microphylla*) e jurema preta (*M. hostilis*) apresentaram ação fungitóxica sobre o crescimento micelial de *Fusiccocum* sp. (**Tabela 1**). Resultados semelhantes com o uso de extratos vegetais foram observados por Fiori et al. (2000) utilizando extratos de *Eucalyptus citriodora*, *Ageratum conyzoides* e *A. millefollium* sob o crescimento micelial e a inibição da germinação de esporos de *Didymella brioniae*.

TABELA 1 - Fitotoxidez de extratos etanólicos de angico (Anadenanthera macrocarpa), aroeira (Astronium urundeuva), maniçoba (Manihot aesculifolia), jurema preta (Mimosa hostilis), catingueira (Caesalpinia microphylla) e alecrim (Lippia microphylla) a Fusicoccum sp. Petrolina, PE. 2009. Média de leitura após oito dias de incubação.

| Tratamentos                       | Médias (cm) | % de Controle |
|-----------------------------------|-------------|---------------|
| T1 - Testemunha (ADE)             | 9,00 с      | 0 %           |
| T2 - angico (A. macrocarpa)       | 9,00 c      | 0 %           |
| T3 - maniçoba (M. aesculifolia)   | 9,00 c      | 0 %           |
| T4 - alecrim (L. microphylla)     | 4.18 a      | 53,6 %        |
| T5 - jurema preta (M. hostilis)   | 6,75 b      | 25%           |
| T6 - aroeira (A. urundeuva)       | 9,00 c      | 0 %           |
| T7 - catingueira (C. microphylla) | 9,00 c      | 0 %           |
| CV (%)                            | 4,14        | -             |
| D.M.S                             | 0,77        | -             |
| Valores Médios                    | 7, 99       | -             |

<sup>\*</sup> Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5%).

Não houve efeito significativo dos tratamentos com extrato de angico (A. macrocarpa), maniçoba (M. aesculifolia); aroeira (A. urundeuva) e T7 - catingueira (C. microphylla) sob o crescimento micelial de Fusiccocum sp. Ao final das avaliações, os tratamentos com extratos de alecrim (L. microphylla.) e jurema preta (M. hostilis) apresentaram percentuais de controle de 53,6 e 25%, respectivamente, quando comparados à testemunha (ADE), evidenciando o potencial desses extratos no manejo de podridões póscolheita causadas por Fusiccocum sp. A grande vantagem potencial do uso desse sistema de proteção de plantas é a possibilidade de redução direta do uso de pesticidas no campo, resultando em ganhos tanto para o homem como para meio ambiente.

Assim, é relevante o desenvolvimento de estudos que comprovadamente abordam a apropriação de produtos naturais, oriundos de plantas da flora nativa, com potencial de uso no controle de fitopatógenos. Furlan (1998) afirma que a importância desses estudos, independem do modo de ação dos extratos utilizados, quer seja por ação fungitóxica direta ou fungistática, ou ainda pela inibição do crescimento micelial e germinação de esporos. Trabalhos que utilizam extratos vegetais na proteção de plantas contra moléstias, mostram seu potencial no controle de fitopatógenos, por sua ação fungitóxica direta, inibindo o crescimento micelial e a germinação de esporos, e pela capacidade de induzir o acúmulo de fitoalexinas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003; STANGARLIN et al., 1999).

#### CONCLUSÕES

O uso de extrato etanólico de alecrim (*L. microphylla*) e jurema preta (*M. hostilis*) apresentaram ação fungitóxica com controle de 53,6 e 25%, respectivamente, a *Fusiccocum* sp. constituindo-se nesta, uma alternativa promissora de controle de podridões pós-colheita.

## REFERÊNCIAS

AGRIANUAL 2003. Manga. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2002. p. 392-398.

ANDRADE, E.R.; DUCROQUET, J.P.H.J. Controle das doenças da ameixeira. *In:* ZAMBOLIM, L.; VALE, F.X.R.; MONTEIRO, A.J.A.; COSTA, H. (Eds.) Controle de doenças de plantas fruteiras. Viçosa UFV, v.1, p.1-45, 2002.

ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORANDI, P. **Inseticides of plant origin.** Washington: The American Chemical Society, 1989. 213p.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Embrapa Meio Ambiente, 2003, p.79-96.

Embrapa Semiárido, **Cultivo da Mangueira, principais cultivares de manga para as condições do vale do São Francisco.** Petrolina, 2004. Disponível em: <a href="http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/cultivares.htm">http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Manga/CultivodaMangueira/cultivares.htm</a> Acesso em: 15 jul 2010.

FERREIRA, D. F. **Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0.** *In:* Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria, 45., 2000, São Carlos, SP. Programas e Resumos... São Carlos: UFSCar, p. 235.

FIORI, A.C.G.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; VIDA, J.B.; SCAPIMCA, C.M.; PASCHOLATI, S.F. **Antifungal activity of leaf exctracts and essential oils of some medicinal plants against** *Didymella bryoniae*. Journal of Phytopathology, v.148, p.483-87, 2000.

FURLAN, M. R. Cultivo de Plantas Medicinais. Cuiabá: SEBRAE/MT, 137 p. 1998. Coleção Agroindústria, vol. 13.

GOMES, M.S.O. Conservação pós-colheita: frutas e hortaliças. Brasília. Embrapa-SPI. 1996. 134p.

GUIRADO, N.; AMBROSANO, E.J.; MENDES, P.C.D.; ROSSI, F.; ARÉVALO, R.A. Controle de doenças em sistemas agroecológico. Summa Phytopathologica, Botucatu, v.30, p.153-156, 2004.

HARTILL, W.F.T. **Postharvest diseases of avocado fruit in New Zealand.** Crop Hort Science, v.19, p.297-304, 1991.

IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas. Disponível em: < <a href="http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\_frutas.asp">http://www.ibraf.org.br/estatisticas/est\_frutas.asp</a> Acesso em: 13 jul 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Mercanotas. Informativo IBRAF, São Paulo, n.18, 2003.

JOHNSON, G.I. **Biology and control of stem-end rot pathogens of mango**. Queensland, Austrália. University of Queensland. 1992.

KHANNA, K.K.; CHANDRA, S. Control of tomato fruit rot caused by *Fusarium roseum* with homeopathic drugs. Indian Phytopathology, v.29, p.269-272, 1976.

MAPA, **Portaria do Ministério da Agricultura nº 07, de 17 de maio de 1999**. Dispõe sobre normas para a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília DF. nº. 94:11-14 Seção 1. 1999.

MARTIM, N.S.P.P.; WASZCZYNSKYI, N.; MASSON, M.L. **Estudo das características de processamento da manga** (*Mangifera indica* **L.**) **variedade Tommy Atkins desidratada**. Dissertação (mestrado) — Universidade Federal do Paraná. Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Defesa: Curitiba, 2006.

PENNYCOOK, S.R.; SAMUELS, G.J. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. Mycotaxon, v.24, p.445–458, 1985.

PINTO, A.C.Q. **A produção, o consumo e a qualidade da manga no Brasil.** Revista Brasileira de Fruticultura, v.24, 2002.

RAMOS, L.J.; LARA, S.P.; MCMILLAN, J.R.R.T.; NARAYANAN, K.R. **Tip dieback of mango** (*Mangifera indica*) caused by *Botryosphaeria ribis*. Plant Disease, v.75, p.315–318, 1991.

ROLIM, P.R.R., BRIGNANI NETO, F.; SOUZA, J.M. Ação de produtos homeopáticos sobre oídio (*Oidium lycopersici*) do tomateiro. Summa Phytopathologica, v.27, p.129, 2001.

SCHWAN-ESTRADA KRF, STANGARLIN JR (2005) Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (Eds.) Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. PiracicabaSP. Fealq. pp. 125-132.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. Fitopatologia Brasileira, Brasília, v. 28, p. 54-56, 2003.

SLIPPERS, B. CROUS, P.W.; DENMAN, S.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. Mycologia, v.96, p.83-101, 2004.

SLIPPERS, B.; JOHNSON, G.I.; CROUS, P.W.; DENMAN, S.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. **Phylogenetic and morphological re-evaluation of the** *Botryosphaeria* **species causing diseases of** *Mangifera indica.* Mycologia, v.97, p.99-110, 2005.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.; NOZAKI, M.H. **Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, v.1, p.16-21, 1999.

VAN BOL, V.; DECAMPS, C.; MARAITE, H.; PEETERS, A. Control of *Phytophthora infestans* in potato crops. Test of methods usable in organic farming. Medelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen, Universiteit Gent, v.58, p.1315-1320, 1993.

WHITTAKER, R. H. **The biochemical ecology of higher plants.** *In:* SONDJEIMER, E.; SIMEONE, J.B. (Ed.). Chemical ecology. New York: Academic Press, p.43-47, 1972.