

INFLUÊNCIA DO LOCAL DE CULTIVO E DO TIPO DE COLHEITA NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO GRÃO E QUALIDADE DO CAFÉ.

I - ATIVIDADE DA POLIFENOLOXIDASE, PROTEÍNA DO EXTRATO ENZÍMICO E ÍNDICE DE COLORAÇÃO¹

IRÃ PEREIRA LEITE² e VÂNIA DÉA DE CARVALHO³

RESUMO - Com o objetivo de determinar a influência de diferentes tipos de colheita e locais de amostragem nas atividades da polifenoloxidase, proteína enzimática e índice de cor do café, foram utilizados cafés de São Sebastião do Paraíso, Machado, Viçosa, Patrocínio e Lavras, MG. As amostras foram colhidas nos estádios de maturação "cereja", cereja despolpada e derriça no pano. Os cafés de Patrocínio, apresentaram alta atividade polifenoloxidase e proteínas; o tipo de colheita influenciou a composição química do café; o despolpamento aumentou a atividade polifenoloxidase; a classificação baseada na atividade polifenoloxidase e índice de coloração indicou bebida fina ou extrafina para as amostras de café despolpado de Patrocínio, Lavras e São Sebastião do Paraíso, e para derriça no pano de Patrocínio; bebida entre aceitável e fina, para despolpados de Viçosa, Machado e cereja de Patrocínio e Lavras; bebida aceitável para derriças de Lavras, São Sebastião do Paraíso, Viçosa e Machado e cerejas de São Sebastião do Paraíso e Machado, e bebida inferior, para cereja de Viçosa.

Termos para indexação: maturação, "cereja", despolpamento, classificação.

INFLUENCE OF CULTIVATION PLACE AND HARVESTING PROCEDURE ON PHYSICAL CHARACTERISTIC, GRAIN COMPOSITION AND COFFEE QUALITY I - POLIPHENOL OXIDASE ACTIVITIES, PROTEIN CONTENT AND COLOR INDEXES¹

ABSTRACT - With objective of determining the influence of harvesting type and cultivation place on poliphenol oxidase activities, protein content and color index of coffee grain, samples of São Sebastião do Paraíso, Machado, Viçosa, Patrocínio e Lavras, Minas Gerais State, Brazil, were evaluated. The coffee fruits were harvested and processed in three different stages: berry maturation, pulping, and coffee berry stripping on cloth ("derriça em pano"). Coffee of Patrocínio presented the highest poliphenol oxidase and protein values; the harvest type affected coffee grain chemical composition; pulping increased poliphenol oxidase activity; qualitative classification based in poliphenol oxidase activity and color index showed fine or extrafine beverage for pulped coffees from Patrocínio, Lavras and São Sebastião do Paraíso and "derriça de pano" for Patrocínio; beverage between acceptable and fine for pulped coffees from Viçosa, Machado and coffee berry for Patrocínio and Lavras; acceptable beverage for "derriça de pano" from Lavras, São Sebastião do Paraíso, Viçosa and Machado and coffee berry for São Sebastião do Paraíso and Machado and inferior beverage for coffee berry from Viçosa.

Index terms: maturation, berry, pulping, classification.

INTRODUÇÃO

O café ainda constitui uma das principais fontes de divisas do Brasil. Com o aumento da pro-

dução e melhoria da qualidade dos cafés de outros países e com as crescentes demandas por cafés de bebida superior pelos países importadores, a exportação brasileira tem sofrido quedas, levando a pesquisa à procura do conhecimento das técnicas de produção dos cafés de melhor qualidade.

Diversos fatores - principalmente os que atuam após a colheita do café - têm sido demonstrados como causadores de modificações químicas

¹ Aceito para publicação em 17 de setembro de 1993.

² Eng.-Agr., em curso de Doutorado, Esc. Sup. de Agric. de Lavras, ESAL, Caixa Postal 37, CEP 37200-000 Lavras, MG.

³ Enga.-Agra., Dra., Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), Caixa Postal 176, CEP 37200-000 Lavras, MG.

cas indesejáveis e detrimenais à sua qualidade. Algumas técnicas utilizadas após a colheita, como a separação de frutos em seus diferentes estádios de maturação, e o despoldamento dos frutos maduros, têm-se mostrado eficientes na melhoria da qualidade da bebida do café.

Para Amorim (1978), as transformações químicas que ocorrem no grão do café, conduzindo a uma qualidade de bebida inferior, são de natureza enzimática, uma vez que as enzimas são constituintes do próprio grão de café ou de microorganismos, se houver umidade elevada do grão.

Condições adversas aos frutos de café, tanto na fase pré-colheita, na colheita como no processamento e/ou armazenamento, dos grãos são fatores importantes que afetam a composição química dos frutos, principalmente os compostos fenólicos e enzimas oxidativas. Amorim & Silva (1968) afirmam que nestes casos as enzimas polifenoloxidasas atuam nos polifenóis, diminuindo sua ação antioxidante sobre os aldeídos e facilitando a sua oxidação enquanto se produzem quinonas, substâncias que, por sua vez, inibem a ação das polifenoloxidasas. Estabelece-se, então, uma correlação entre a baixa atividade da polifenoloxidase e os cafés de baixa qualidade.

Confirmando esta teoria, Sanint & Valência (1970), através de indução de cafés despoldados a diferentes qualidades de bebidas, por meio de diversos tempos de fermentação, concluíram que para os cafés despoldados a atividade da polifenoloxidase era maior nos cafés de melhor qualidade.

Para Chalfoun et al. (1992), em cafés classificados previamente quanto à bebida pela "prova de xícara", foram avaliados alguns teores de alguns constituintes químicos e atividades enzimáticas, concluindo que através dos valores de grau de escurecimento podem ser separados cafés duros e moles de rio e riado, e as atividades enzimáticas e o teor de proteína do extrato enzimático diferenciam o café mole das demais classificações (duro, riado e rio).

Visando conhecer fatores climáticos que influem na qualidade do café, e, conseqüentemente, os prejuízos advindo da bebida inferior, o presente trabalho objetiva mostrar a influência do tipo de colheita e dos locais de cultivo nas atividades da

polifenoloxidase, proteína do extrato enzimático e índice de coloração.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de café provenientes das fazendas experimentais da EPAMIG, de São Sebastião do Paraíso, de Machado, e da ESAL-Lavras - todas situadas na Região Sul do Estado - de Viçosa, localizada na Zona da Mata, e de Patrocínio, localizada no Alto Paranaíba.

As amostras recebidas dos locais mencionados foram analisadas quanto às características químicas, no Laboratório de Produtos Vegetais ESAL/EPAMIG do Departamento de Ciência dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura de Lavras.

As amostras consistiram de 50 kg de frutos de café pertencentes à cultivar Mundo Novo, colhidas no estádio de maturação cereja, que foram posteriormente despoldadas, e frutos colhidos sob a forma de derriça no pano, ou seja, uma mistura de frutos verdes, semi-maduros, cerejas, passas e secos. Estas foram levadas ao sol para secagem até atingirem a faixa de umidade de 11 a 13%, sendo posteriormente beneficiadas para retirada da casca e do pergaminho.

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 3, com quatro repetições.

Foram feitas, no grão beneficiado, as avaliações das atividades das enzimas peroxidase e polifenoloxidase, da proteína do extrato enzimático, e do índice de coloração.

Para obtenção do extrato enzimático da polifenoloxidase e peroxidase, foi utilizado o método descrito por Draetta & Lima (1976). As atividades de polifenoloxidase foram determinadas pelo método descrito por Ponting & Joslyng (1948), utilizando-se o extrato da amostra sem DOPA como branco.

A proteína do extrato enzimático foi determinada pelo método de Biureto, descrito por Layne (1957), sendo que as atividades da peroxidase e polifenoloxidase específica foram obtidas pela divisão do valor da atividade enzimática pelo valor da proteína obtida no extrato enzimático.

O índice de coloração foi determinado pelo método descrito por Singleton (1966).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade para comparação das médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior atividade da enzima polifenoloxidase foi observada nas amostras de Patrocínio (74,64 u/min/g de amostra), conforme a Fig. 1. Foi verificado, nas amostras de Lavras, atividade intermediária com valores médios de 66,00 u/min/g de amostra superando as de Viçosa e São Sebastião do Paraíso. Machado apresentou as menores atividades da enzima com valores inferiores a 55,00 u/min/g de amostra.

O despulpamento contribuiu para maior atividade da polifenoloxidase, correspondendo à hipótese de que cafés melhores têm maiores atividades da enzima, conforme citam Amorim & Silva (1968), Rotemberg & Iachan (1971), Sanint & Valência (1970), Oliveira (1972), Amorim (1978) e Chalfoun et al. (1992), uma vez que este processamento leva à melhoria da qualidade.

As amostras de café derriçado no pano superaram as colhidas no estádio de "cereja" sem despulpamento, apresentando atividade superior a 60,0 u/min/g de amostra. A presença da polpa com sua alta percentagem de açúcares parece ser a responsável pela baixa atividade enzimática,

devido às fermentações indesejáveis ocorridas no processo de secagem.

De acordo com a Fig. 2, verifica-se, para os frutos cerejas despulpados, maior atividade enzimática nas amostras oriundas de Patrocínio e Lavras. Para estes frutos, a menor atividade foi observada em Machado (62,00 u/min/g de amostra). Observa-se, também, para os cerejas não despulpados, uma atividade maior em Patrocínio, superando as amostras de Lavras. Machado apresentou também para estes frutos a menor atividade.

A maior atividade desta enzima em cafés de derriça foi verificada em Patrocínio. Observa-se que as amostras de Lavras, Viçosa e São Sebastião do Paraíso apresentaram valores de atividades inferiores às de Patrocínio, porém superiores à de Machado, com atividade inferior a 53,00 u/min/g de amostra.

Em trabalho de Chalfoun et al. (1992), foi observado que as atividades da polifenoloxidase em cafés de bebida mole foram superiores aos cafés de piores bebidas (duro, riado e rio). Estes autores citam valores de 70,83 u/min/g de amostra, 56,67 u/min/g de amostra, 53,18 u/min/g de amostra e 55,34 u/min/g de amostra para cafés mole, duro, riado e rio, respectivamente.

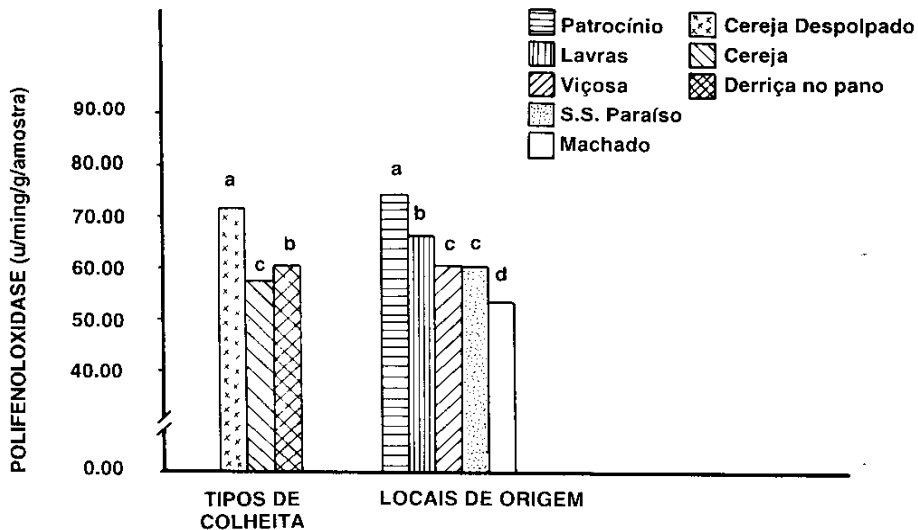


FIG. 1. Atividade da polifenoloxidase em grãos de café relativa às médias de três tipos de colheita e cinco locais de cultivo.

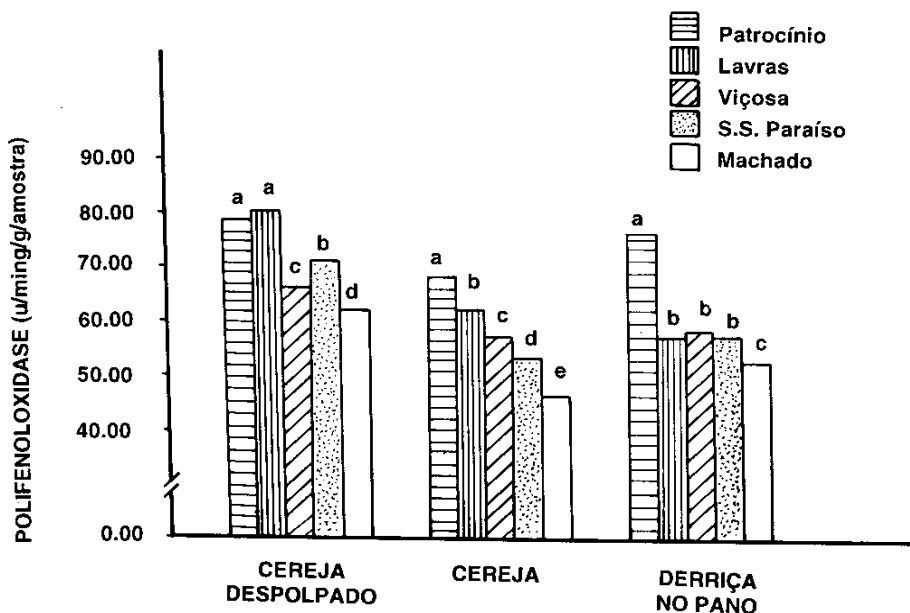


FIG. 2. Atividade da polifenoloxidase em grãos de café relativa a três tipos de colheita em cinco locais de cultivo.

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os de Chalfoun et al. (1992), observa-se que as atividades enzimáticas das amostras despulpadas de Patrocínio (78,90 u/min/g de amostra), Lavras (80,92 u/min/g de amostra), São Sebastião do Paraíso (71,17 u/min/g de amostra) e as derraças no pano de Patrocínio (76,56 u/min/g de amostra) apresentaram-se superiores aos classificados como de bebida mole por Chalfoun et al. (1992), indicando a excelente qualidade destes cafés, os quais poderiam ser classificados como finos ou extra-finos. Quanto às amostras despulpadas de Viçosa e Machado, observam-se valores respectivos de 66,32 e 62,12 u/min/g de amostra, intermediários aos valores de 70,83 e 56,67 u/min/g de amostra citados pelos autores acima para cafés moles e duros, respectivamente, o que indica que estes cafés têm bebida melhor que dura, podendo talvez classificar-se como superior. Cabe ressaltar que os cafés de Patrocínio, em todos os tipos de colheita - cereja, derraça no pano e despulpado -, apresentaram-se com alta atividade desta enzima, indicando que

esta região pode ser considerada de cafés finos, mesmo não se processando o despulpamento. Porém, nos demais locais, o despulpamento tem efeito acentuado no aumento da atividade polifenoloxidase, e, conseqüentemente, melhoria de qualidade, passando de café de bebida aceitável ou inferior para superior, fina ou extra-fina. Recomenda-se que nestes locais seja feito o despulpamento quando se pretende melhorar a qualidade dos cafés.

Ao se avaliar cafés derraçados no pano - com exceção de Patrocínio com altas atividades, nos demais locais os cafés apresentaram resultados na faixa de 50 a 59 u/min/g de amostra, ou seja, de qualidade, segundo Chalfoun et al. (1992), inferior (duro, riado e rio).

Segundo Amorim & Silva (1968), compostos fenólicos, principalmente os ácidos e clorogênicos exercem ação protetora, antioxidante dos aldeídos. Quando há qualquer condição adversa aos grãos - ou seja, colheita inadequada ou problemas no processamento e armazenamento -, as polifenoloxidases agem sobre os polifenóis, diminuindo

sua ação antioxidante sobre os aldeídos, e, conseqüentemente, facilitando a oxidação destes, ao mesmo tempo que produzem quinonas, as quais agem como inibidores da ação da polifenoloxidase. Devido a isso, os cafés são de pior qualidade (prova de xícara), ou seja, têm também baixa atividade da polifenoloxidase. Estes resultados estão de acordo com os do presente trabalho, em que cafés - cerejas não despulpados e derriçados no pano, mais sujeitos a fermentações indesejáveis, - devido a presença da polpa -, tiveram também mais baixas atividades da polifenoloxidase.

Os maiores teores de proteínas do extrato enzimático foram encontrados nas amostras de Patrocínio, correspondendo à maior atividade enzimática da polifenoloxidase observada neste mesmo local, o que indica ter talvez havido uma síntese maior desta enzima; Lavras apresentou, em suas amostras de café, altos teores de proteínas, porém inferiores aos de Patrocínio e superiores aos de Machado. Viçosa e São Sebastião do Paraíso apresentaram cafés com menores teores (Fig. 3).

O despulpamento dos frutos resultou em au-

mento dos teores de proteínas, o que indica, provavelmente, síntese de enzimas, uma vez que a atividade polifenoloxidase (Fig. 3) destes frutos mostrou-se elevada. Não foi observada diferença entre frutos-cerejas não despulpados e a derriça no pano quanto ao teor de proteínas.

A Fig. 4 mostra, em frutos despulpados, altos teores de proteínas do extrato enzimático nas amostras de Patrocínio e Lavras. Machado apresentou teores intermediários, enquanto Viçosa e São Sebastião do Paraíso apresentaram menores teores. Para os frutos não despulpados, os valores de proteína se mantiveram na faixa de 0,12-0,21 mg/g de amostra, sendo o maior teor observado na amostra de Patrocínio. A amostra de café em Lavras apresentou teores intermediários, e os demais mostraram teores de proteína inferiores a 0,1 mg/g de amostra.

Também para a derriça no pano observaram-se teores elevados nas amostras de Patrocínio com respeito a este componente. Teores mais baixos de proteína foram observados nas amostras de Viçosa e São Sebastião do Paraíso.

Pelo exposto acima, observa-se que cafés com

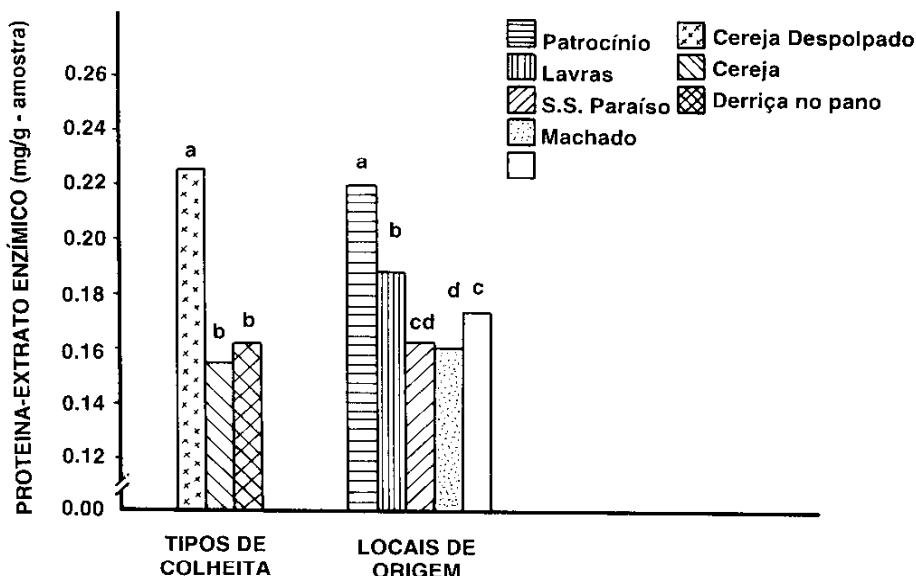


FIG. 3. Teores de proteínas do extrato enzimático em grãos de café relativos as médias de três tipos de colheita e cinco locais de cultivo.

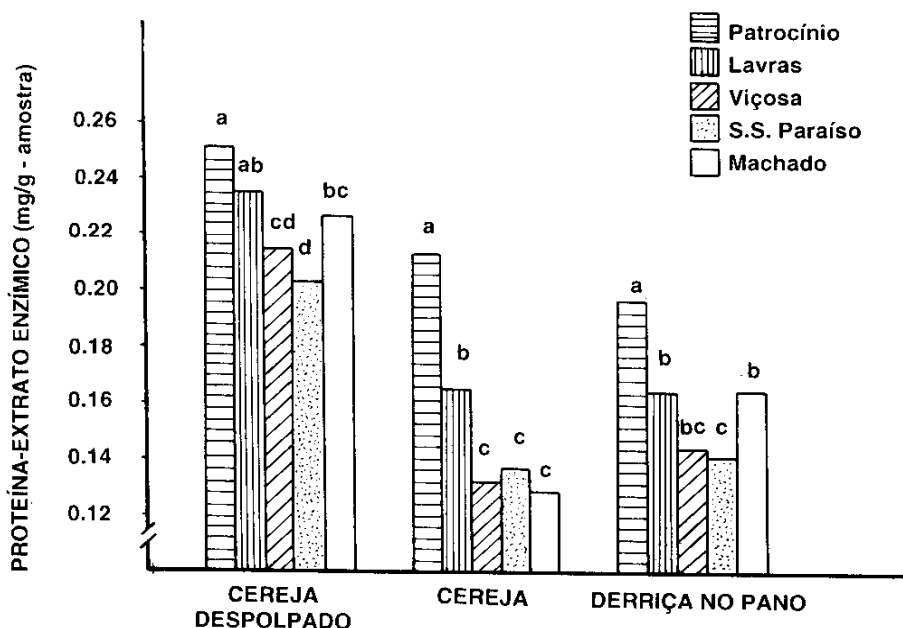


FIG. 4. Teores de proteínas do extrato enzimático em grãos de café relativos a três tipos de colheita em cinco locais de cultivo.

mais altas atividades enzimáticas da polifenoloxidase, ou seja, os despoldados e as amostras de Patrocínio, Lavras, etc., apresentaram simultaneamente altos teores de proteína do extrato enzimático, indicando que a quantidade destas proteínas pode também ser considerada como parâmetro medidor de qualidade de cafés.

Amostras de grãos de café procedentes de Viçosa e São Sebastião do Paraíso apresentaram maiores atividades específicas da polifenoloxidase, de acordo com a Fig. 5. Foi observado que as amostras de café de Machado apresentaram baixa atividade desta enzima.

O despoldamento dos frutos maduros diminuiu a atividade da enzima, sendo que para os frutos não despoldados se observou uma atividade específica maior se igualando aos derriçados no pano.

Quando se comparam os diferentes locais, quanto aos frutos despoldados (Fig. 6), nota-se que as amostras de café de Lavras e São Sebastião do Paraíso são superiores na atividade específica desta enzima, superando as de Machado.

Frutos cerejas, mostrados na mesma figura, tiveram mais alta atividade específica na amostra de Viçosa, com pequenas diferenças para as de São Sebastião do Paraíso e Machado, que apresentaram tendência a se igualar à atividade observada neste local. Patrocínio apresentou amostras de café com baixa atividade específica.

Quando observadas as amostras derriçadas no pano, verifica-se mais elevada atividade específica da polifenoloxidase nas de Viçosa e São Sebastião do Paraíso. Baixa atividade desta enzima foi observada na de Machado.

Uma maior atividade específica desta enzima indica estar havendo maior ativação da mesma.

Os valores de atividades específicas (Figs. 5 e 6) foram mais baixos nos cafés que apresentaram atividade enzimática elevada (Figs. 1 e 2), o que é devido ao fato de alta atividade estar relacionada aos altos teores de proteínas enzimática (Figs. 3 e 4). Pode-se afirmar, com base nos teores de proteína enzimática, que talvez a alta atividade dos cafés de melhor qualidade estejam relacionados à quantidade mais elevada de enzimas presentes

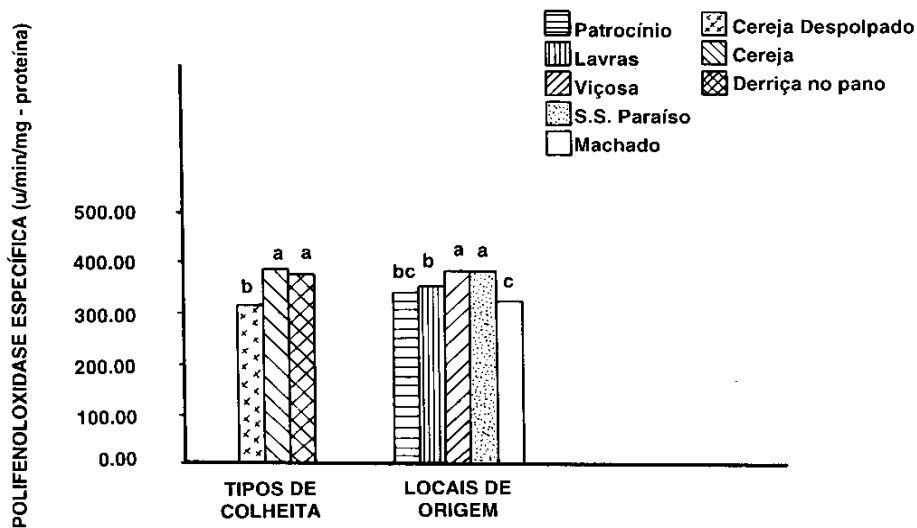


FIG. 5. Atividade específica da polifenoloxidase em grãos de café relativa as médias de três tipos de colheita e cinco locais de cultivo.

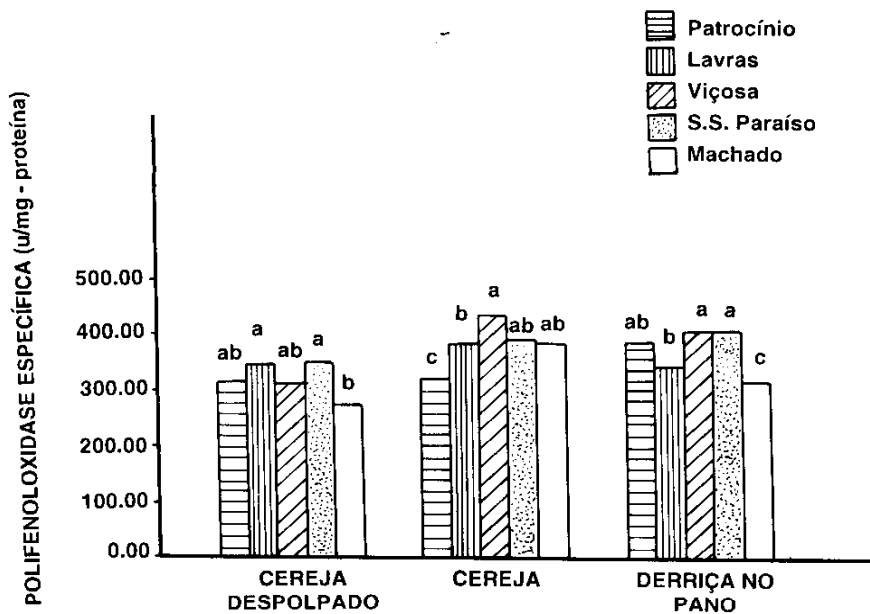


FIG. 6. Atividade específica da polifenoloxidase em grãos de café relativa a três tipos de colheita em cinco locais de cultivo.

neste café e não a uma maior ativação das enzimas já existentes, conforme Amorim & Silva (1968).

Pela Fig. 7, observa-se que o mais alto índice de coloração foi observado em amostras de grãos de café de Machado, seguido pelas de Patrocínio e Lavras, considerando os locais de modo geral. Viçosa apresentou índices baixos de coloração em suas amostras; isto indica ter havido maior nível de danos nos grãos, o que deve ter levado a uma reação de branqueamento. Este tipo de dano deve ter ocorrido também nos grãos dos frutos cerejas não despulpados, que apresentaram índices inferiores aos dos despulpados. Porém, foram os cafés derriçados no pano - talvez devido à presença dos frutos verdes -, que apresentaram maiores índices de coloração, o que é explicado pela alta presença, nestes frutos, dos compostos fenólicos e da clorofila.

Nos frutos cerejas despulpados (Fig.8), foi notada menor coloração na amostra de café de São Sebastião do Paraíso e maior índice na de Machado.

Entre as amostras de café cereja não despulpado, a de Viçosa apresentou menores índices de

coloração; os maiores foram observados nas amostras de Patrocínio, São Sebastião do Paraíso e Lavras. A de Machado teve índices intermediários.

O despulpamento, de modo geral, melhorou o índice de coloração, exceção feita à amostra de São Sebastião do Paraíso.

Nas amostras de café derriçado no pano sobressaiu com maiores índices de coloração a de Machado, seguida pela de São Sebastião do Paraíso; o menor índice foi observado na de Viçosa.

A coloração do café beneficiado tem sido um dos parâmetros utilizados na classificação pelo tipo. Segundo Amorim & Silva (1968), a cor do café beneficiado é devida à presença de clorofila, aos compostos fenólicos, ao clorogenato de magnésio, etc.

Segundo Chalfoun et al. (1992), um maior índice de coloração corresponde a cafés de melhor qualidade. Estes autores constataram, também, maior grau de coloração nas amostras de derriça no pano, observado em relação aos frutos cerejas não despulpados. Além disso, observaram superioridade no índice de coloração nos frutos cerejas e derriçados de Machado sobre os de Viçosa, o

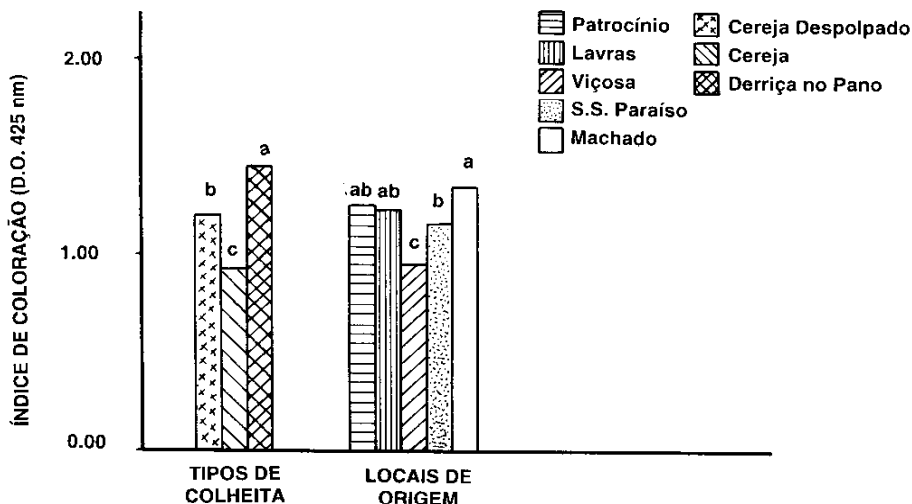


FIG. 7. Índices de coloração em grãos de café relativos as médias de três tipos de colheita e cinco locais de cultivo.

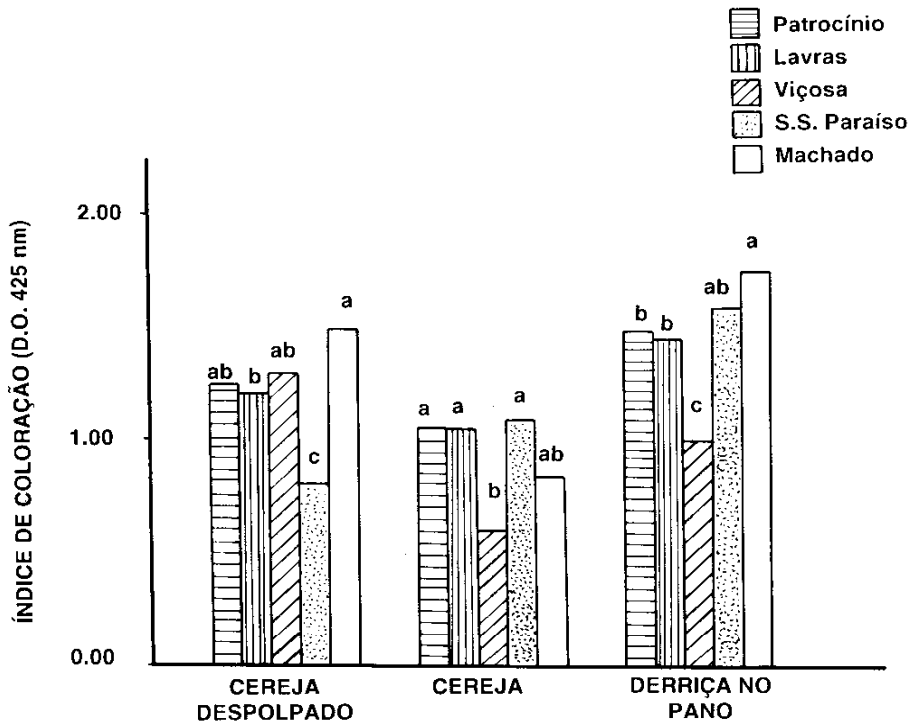


FIG. 8. Índices de coloração em grãos de café relativos a três tipos de colheita em cinco locais de cultivo.

que concorda com os resultados do presente trabalho.

O índice de coloração permite separar cafés de bebida mole e dura dos classificados como riado e rio; porém, este parâmetro não possibilita a distinção entre as bebidas mole e dura, devendo esta distinção ser feita pela análise da atividade enzimática da polifenoloxidase, de acordo com Chalfoun et al. (1992). Segundo estes autores, os cafés de piores bebidas (riado e rio) apresentam índices de coloração inferiores a 0,70. Cabe ressaltar que no presente trabalho os cafés de todos os tratamentos (locais e tipos de colheita) - excetuando as amostras cerejas de Viçosa com valor 0,60, o que lhes confere qualidade inferior (rio, riado) - apresentaram índices de escurecimento superiores a 0,80.

CONCLUSÕES

1. Há efeito do local de origem na qualidade dos cafés. Assim:

a. As amostras de grãos de café de Patrocínio apresentaram elevadas atividades enzimáticas da polifenoloxidase e altos teores de proteína do extrato enzimico. Os cafés deste local, independentemente do tipo de colheita (despolpado, cereja, derrça no pano), apresentaram alta atividade enzimática da polifenoloxidase e índice de cor, e, conseqüentemente, bebida fina ou superior à aceitável.

b. As amostras de grãos de café cereja de Viçosa apresentaram baixo índice de coloração e atividade enzimática da polifenoloxidase, podendo ser classificadas como de bebida inferior.

2. O tipo de colheita e preparo do café afeta-

ram a composição química, e, conseqüentemente, a qualidade dos cafês, ou seja:

a. O despulpamento melhorou a qualidade dos cafês, aumentando a atividade da polifenoloxidase e índice de coloração.

b. Os cafês derriçados no pano apresentaram altos índices de cor.

c. Os cafês cerejas não despulpados apresentaram menores atividades da polifenoloxidase e índice de coloração.

3. Através da classificação qualitativa com base na atividade da polifenoloxidase e índice de cor, os cafês se classificam em:

a. Bebida fina ou extra-fina - despulpados de Patrocínio, Lavras e São Sebastião do Paraíso; derriça no pano de Patrocínio.

b. Bebida entre aceitável e fina (superior) - despulpados de Viçosa e Machado; cerejas de Patrocínio e Lavras.

c. Bebida aceitável - derriças no pano de Lavras, São Sebastião do Paraíso, Machado e Viçosa; cerejas de São Sebastião do Paraíso e Machado.

d. Bebida inferior - cerejas de Viçosa.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, H.F.; SILVA, O.M. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. *Nature*, London, v.219, p.381-382, Sept. 1968.
- AMORIM, H.V. Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a deterioração de qualidade. Piracicaba: ESALQ, 1978. 85p. Tese de Livre-Docência.
- CHALFOUN, S.M.; CARVALHO, V.D.; GUIMARÃES, P.T.G. Manual de preservação e melhoria da qualidade do café nas fases de pré e pós-colheita. Lavras: [s.n.], 1992. 44p. Programa Nacional de Qualidade Total na Produção de Café.
- DRAETTA, I.S.; LIMA, D.C. Isolamento e caracterização das polifenoloxidases do café. *Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v.7, p.13-28, jun. 1976.
- LAYNE, E. Spectrophotometric and turbidimetric methods of measuring proteins. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Eds.). *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1957. v.3, p.447-454.
- OLIVEIRA, J.C. Relação da atividade enzimática da polifenoloxidase, peroxidase e catalase dos grãos de café e a qualidade da bebida. Piracicaba: ESALQ, 1972. 80p. Tese de Doutorado.
- PONTING, J.D.; JOSLYN, M.A. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Archives of Biochemistry*, New York, v.19, p.47-63, 1948.
- ROTEMBERG, B.; IACHAN, A. Método químico automático para diferenciação de "café bebida". *Revista Brasileira de Tecnologia*, São Paulo, v.2, n.2, p.67-69, jun. 1971.
- SANINT, O.B.G.; VALÊNCIA, A.G. Actividad enzimática en el grano de café en relación con la calidad de la bebida. I. Duración de la fermentación. *Cenicafé*, Colômbia, v.21, n.2, p.59-71, abr./jun. 1970.
- SINGLETON, V.L. The total phenolic content of grapes berries during the maturation of several varieties. *American Journal of Enology Viticulture*, v.17, p.126-134, 1966.