

## Variação de carboidratos em folhas da videira 'Itália' submetida a diferentes de níveis de desfolhas

Essione R. Souza<sup>1</sup>, Valtemir G. Ribeiro<sup>2</sup>, Bárbara F. Dantas<sup>3</sup> & José M. P. Lima Filho<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Horticultura), Rua José Barbosa de Barros, 1780, s/n, CEP 18610-307, Botucatu-SP, Brasil. E-mail: [essione.r@hotmail.com](mailto:essione.r@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Av. Edgard Chastinet, s/n, Campus III, CEP 48900-000, Juazeiro-BA, Brasil. E-mail: [vrbeiro@uneb.br](mailto:vrbeiro@uneb.br)

<sup>3</sup> Embrapa Semi-Árido, Rodovia BR 428, km 152, Laboratório de Sementes, Zona Rural, CEP 56300-970, Petrolina-PE, Brasil. Caixa Postal 23. E-mail: [barbara@cpatsa.embrapa.br](mailto:barbara@cpatsa.embrapa.br); [zemoa5@hotmail.com](mailto:zemoa5@hotmail.com)

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variação de carboidratos, proteínas e aminoácidos livres em folhas da videira na cv. Itália submetida a diferentes de níveis de desfolhas em diferentes fases fenológica. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso em esquema fatorial 4 (5, 10, 15 e 20 folhas deixadas no ramo de produção) x 4 (fases fenológicas aos 60, 72, 84 e 106 dias após a poda) e três repetições. Foram selecionadas as folhas mais expostas à luz solar, totalmente expandidas, opostas ao cacho, sem sinais de senescência e sadias, para as medidas indiretas de clorofila (Índice clorofila) em valor SPAD utilizando-se medidor portátil de clorofila SPAD-502. As folhas foram submetidas às análises quantitativas de proteínas, aminoácidos, amido, açúcares totais, açúcares redutores e sacarose. O teor de amido foi alto na fase inicial de amolecimento de bagas e com 15 folhas deixadas no ramo de produção e baixo no início da fase de maturação de frutos. A quantidade de 15 folhas deixadas nos ramos de produção em plantas de videira cv. Itália é a mais recomendada, pois essas plantas apresentaram maior eficiência, tanto no transporte como no acúmulo de reserva e este acúmulo foi influenciado pela fase fenológica da videira.

**Palavras-chave:** macromoléculas, número de folhas, *Vitis vinifera* L.

### *Variation of carbohydrates in leaves of Italia grapevine under different levels of defoliation*

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the variation of carbohydrates, proteins and free amino acids in vine leaves in cv. Italy under different levels in different phases phenological defoliation. The experimental design was randomized blocks in factorial scheme 4 (5, 10, 15 and 20 sheets left in the industry) X 4 (phenological phases at 60, 72, 84 and 106 days after pruning) and three replications. We selected leaves were exposed to sunlight, fully extended, opposite the bunch, with no signs of senescence and healthy for the indirect measurement of chlorophyll (chlorophyll index) in SPAD readings using portable chlorophyll meter SPAD-502. The leaves were subjected to quantitative analysis of proteins, amino acids, starch, total sugars, reducing sugars and sucrose. The starch content was high in the initial softening of berries and sheets 15 left on the field of production and low at the start of the ripening of fruits. 15 The amount of leaves left on the branches of production in grapevine cv. Italy is recommended, therefore, these plants showed greater efficiency in both transmission and reserve accumulation and this accumulation was influenced by the phenological stage of grapevine.

**Key words:** macromolecules, number of leaves, *Vitis vinifera* L.

## Introdução

O polo Petrolina-PE/Juazeiro-BA, localizado na região do Vale do São Francisco, é considerado pioneiro na produção de uva de mesa, vinho e suco, em condições tropicais. No entanto, todas as cultivares utilizadas foram introduzidas e, portanto, apresentam problemas de adaptação, o que implica em maiores ou menores produtividades.

A exploração vitícola, de forma cada vez mais intensiva, tem conduzido a um desequilíbrio profundo das videiras, alterando seu metabolismo e, conseqüentemente, o balanço hormonal das plantas (Botelho et al., 2006). Dentre as várias práticas utilizadas no manejo da cultura esta a desfolha que consiste na eliminação de folhas da videira, sobretudo a situada próximo aos cachos e mais velhas, para não comprometer o fornecimento de nutrientes.

A desfolha deve ser realizada durante a fixação do fruto para melhorar as condições de maturação da uva e diminuir as condições de incidência das podridões. Quando realizada inadequadamente e sem cuidados, pode comprometer a atividade fotossintética da planta (Mandelli & Miele, 2003) e o conteúdo de clorofila, que são estreitamente relacionados com seu crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes (Taiz & Zeiger, 2009).

Os tecidos fotossinteticamente ativos, como folhas maduras, produzem mais carboidratos que o necessário para manter seu metabolismo e crescimento, exportando os fotoassimilados excedentes na forma de sacarose, para tecidos fotossinteticamente menos ativos ou inativos, como folhas jovens, raízes, cachos ou ramos; mesmo assim, as relações fonte dreno não são estáticas.

Os carboidratos são importantes na fruticultura em virtude do seu potencial de modificação na alocação de carbono na planta, com reflexos no aumento ou diminuição da produção de frutos comerciais. Essas alterações são influenciadas diretamente pelas práticas culturais de determinada cultura que causam efeitos significativos na translocação e alocação de carbono fixado durante o processo fotossintético (Silva et al., 2011).

Sendo os açúcares indicadores de estresses da videira a diferentes condições ambientais (Ait Barka et al., 2006), o objetivo deste trabalho foi avaliar a variação de carboidratos, proteínas e aminoácidos totais em folhas da videira na cv. Itália submetida a diferentes de níveis de desfolhas em diferentes fases fenológicas.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado em vinhedo comercial, no Perímetro Irrigado Nilo Coelho, em Petrolina, PE, situado entre as latitudes de 9°20'11" S e longitude de 40°32'01" W e a 388 m de altitude. O clima da região é classificado como BswH, que corresponde a uma região semiárida muito quente, com índice pluviométrico anual de 549,2 mm, temperatura média anual de 26,3 °C, com média das mínimas de 21,6 °C, e média das máximas 32,9 °C (Köppen, 1948).

Foram utilizadas 36 plantas da cultivar Itália, enxertadas sobre o porta-enxerto IAC 572 ('Jales'), com 17 anos de idade,

conduzida em sistema tipo latada, com espaçamento entre filas de 3,0 m e entre plantas de 3,0 m, padronizando-se 12 unidades de produção (seis saídas de cada lado da planta, com quatro sarmentos cada uma), perfazendo a densidade de 960 plantas ha<sup>-1</sup> e irrigadas por microaspersão.

A desfolha manual foi realizada quando ocorreu o pegamento dos cachos, em que as bagas apresentavam de 6 a 8 mm, na seguinte ordem: T1 - plantas com 5 folhas; T2 - plantas com 10 folhas; T3 - plantas com 15 folhas e T4 - plantas com 20 folhas, deixadas no ramo de produção.

Para determinação do teor de carboidratos foram selecionadas as folhas mais expostas à luz solar, totalmente expandidas, opostas ao cacho, sem sinais de senescência e sadias. As coletas foram realizadas nas diferentes fases fenológicas 60 dias após a poda - DAP (crescimento de bagas); 72 DAP (crescimento de bagas); 84 dias após a poda (amolecimento de baga); 106 dias após a poda (maturação). As folhas foram colocadas em sacos plásticos, identificadas segundo sua procedência e armazenadas em freezer com temperatura com -20°C, até as análises bioquímicas.

Foram avaliados os teores foliares de açúcares redutores, quantificados pelo método Dinitrossalicilato - DNS, que quantifica a glicose, frutose e manose nos tecidos vegetais (Miller, 1959); açúcares totais segundo metodologia descrita por Morris (1948); Yemm & Willis (1954); proteínas seguindo o método descrito por Bradford (1976); total de aminoácidos livres realizado pelo método da Ninhidrina de Rosen (1957) e os teores de sacarose pela metodologia descrita por Passos (1996).

Para as medidas indiretas de clorofila (Índice clorofila) em valor SPAD, foram feitas leituras utilizando-se quatro pontos de cada folha nas faces abaxial e adaxial e se selecionando as folhas mais expostas à luz solar, totalmente expandidas, opostas ao cacho, sem sinais de senescência e sadias, através de medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development, Minolta Camera Co., Osaka, Japan).

Para fins de análises estatísticas os dados foram submetidos à análise de regressão, variância (teste F) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, pelo programa estatístico SISVAR.

## Resultados e Discussão

O teor de açúcares redutores (AR) nas folhas foi mais baixo durante as fases iniciais do desenvolvimento do fruto apresentando um acréscimo durante a fase de crescimento de bagas e na fase de maturação (Figura 1A), evidenciando grande transporte de fotoassimilados nessas fases.

Segundo Chaves Filho & Oliveira (2008), os fotoassimilados são transportados continuamente do local de produção para outros locais e seu sentido de translocação segue o gradiente de concentração entre os centros de consumo e o de reserva da planta.

A sacarose (Figura 1A) está presente em maior quantidade nas folhas, na fase de crescimento e na fase de maturação de bagas, o qual se constitui no principal substrato para a respiração do vegetal. Segundo Lawlor & Cornic (2002) quando a síntese de sacarose é limitada a translocação pode diminuir a concentração desta molécula nas folhas.

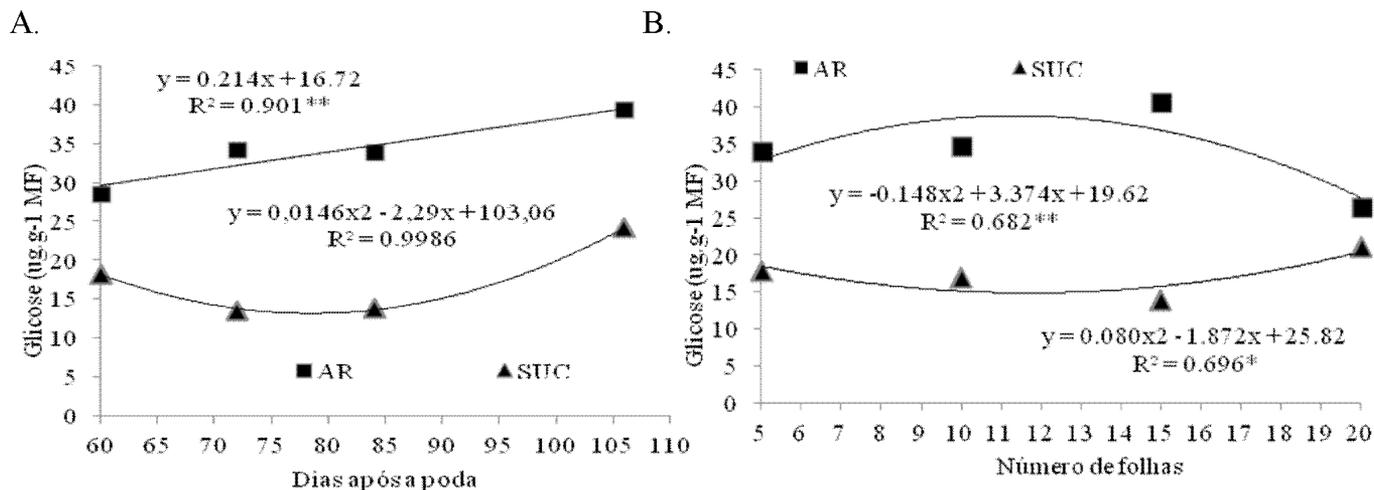


Figura 1. (A, B) Teores foliares de açúcares redutores (AR) e sacarose (SUC) (mg.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) em videira cultivar Itália, em diferentes fases fenológicas e com diferentes quantidades de folhas deixada no ramo de produção

Durante o crescimento vegetativo a maioria dos carboidratos é transportada para as raízes e folhas jovens enquanto após o florescimento os carboidratos são direcionados prioritariamente para os frutos (Roitsch et al., 2003).

Observou-se que, quando avaliadas pela quantidade de folhas deixadas no ramo de produção, as plantas com 15 folhas apresentaram maior teor de amido e muito transporte de sacarose (Figura 1B).

A sacarose e os açúcares redutores (glicose e frutose) são sintetizados nas folhas e se translocam durante o dia e a noite em todas as partes da planta, através do floema (Galdiano, 2008). Segundo Lebon et al. (2008) a sacarose, glicose e frutose são os principais açúcares da seiva do xilema e floema, que alimentam o desenvolvimento da inflorescência.

Para a quantidade de 15 folhas a planta apresentou maior eficiência tanto no transporte como no acúmulo de reserva. Holzappel et al. (2006) observaram, estudando a variedade Semillon, que a desfolha total na colheita reduziu a produção no ano seguinte em 21%; um efeito acumulativo foi registrado quando o ensaio foi realizado duas vezes, alcançando uma redução de 50% no número de inflorescência.

Conforme Borba et al. (2005), quando uma planta entra em crescimento ativo o metabolismo dos carboidratos se torna mais intenso e o incremento da sacarose se dá à custa da produção de carboidratos, através da fotossíntese.

Na Figura 2A observa-se que no início do crescimento de bagas (dreno forte) os teores foliares de açúcares totais (AST) são mais baixos aumentando durante a maturação e o maior teor foliar de AST foi encontrado na maturação. O teor foliar de amido foi alto no início de crescimento de bagas e baixo na fase de amolecimento e maturação. Nesta fase há, em geral, baixo status de açúcar foliar devido à força do dreno imposto pelas bagas em crescimento, que melhora a fotossíntese, a mobilização de reservas e a exportação. Por outro lado, o açúcar em abundância promove o crescimento e a estocagem de carboidratos nos drenos e quando a taxa de fotossíntese é alta, ocorre o acúmulo de AST e amido nas folhas (Taiz & Zeiger, 2009).

Na fase de maturação de bagas ocorreram baixo teor foliar de amido e crescente teor foliar de AST, devido ao maior consumo de açúcares dos drenos em relação à sua produção pelas fontes.

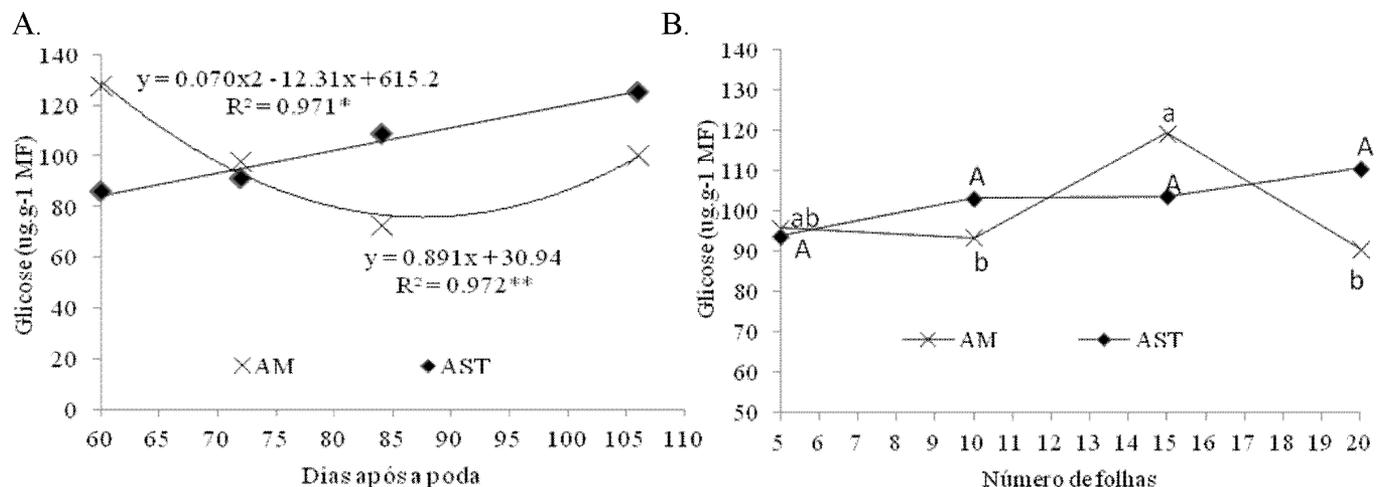
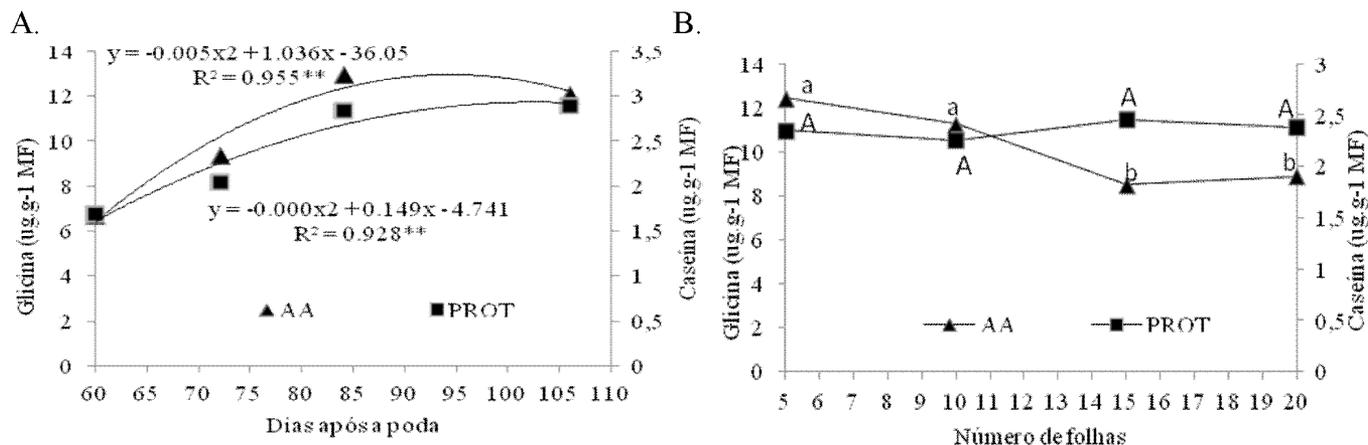


Figura 2. (A, B) Teores foliares de amido (AM) e açúcares totais (AST) (mg.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) em videira cultivar Itália em diferentes fases fenológicas e com diferentes quantidades de folhas deixadas no ramo de produção



**Figura 3.** (A, B) Teores foliares de aminoácidos (AA) e proteína (PROT) (e, f) (mg.g<sup>-1</sup> de matéria fresca) em videira cultivar Itália em diferentes fases fenológicas e com diferentes quantidades de folhas deixadas no ramo de produção

Dantas et al. (2007) encontraram, estudando a cultivar Syrah, teor de amido das folhas mais jovens de 1,85 mg g<sup>-1</sup> matéria fresca, considerando-o baixo. Na folha posterior ao cacho os autores observaram 12,16 mg g<sup>-1</sup> matéria fresca, considerado o teor mais alto de amido. Durante a maturação das bagas ocorreu redução do teor foliar de amido (Figura 2A); sendo assim, todos os açúcares produzidos pelas folhas são translocados para as bagas prioritariamente em relação aos meristemas apicais, acumulando açúcares totais e amido nas folhas próximas ao cacho. Enfim, os açúcares em folha podem refletir o estado metabólico da fotossíntese ou, também, a capacidade de translocação desses açúcares para os tecidos de reserva.

Ressalta-se que os carboidratos estocados na forma de amido e sacarose devem ser, portanto, hidrolisados, para liberar os monossacarídeos (glucose e frutose), sendo que o amido armazenado é degradado dentro dos plastídios.

Não foi encontrada diferença estatística no teor foliar de AST nas diferentes intensidades de desfolhas; contudo, a quantidade de 15 folhas apresentou maior teor de amido havendo diferença estatística entre os tratamentos (Figura 2A).

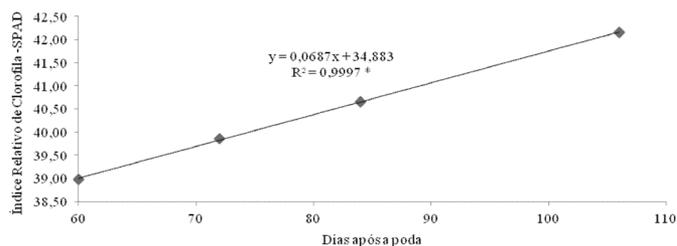
O teor de aminoácidos (AA) e de proteínas (PROT) (Figura 3A) foi maior nas fases de crescimento e maturação. Os aminoácidos estão envolvidos, em grande parte, no metabolismo primário e secundário, levando à síntese de vários compostos que influenciam na produção e na qualidade dos frutos.

Os aminoácidos asparagina e glutamato interligam os dois ciclos metabólicos mais importantes da planta, o ciclo do carbono e o ciclo do nitrogênio, influenciando na produção tanto de açúcares como de proteínas. A glicina é um aminoácido que inibe a fotorrespiração aparente realizada pelas plantas C3, como a videira, levando à maior eficiência da fotossíntese e assim ao maior teor de açúcares e maior produtividade (Taiz & Zeiger, 2009).

A produção de proteínas corretamente estruturadas e sua manutenção, é importante para uma função celular eficiente (Lawlor, 2002). Sendo o aminoácido precursor de proteína haverá, com o aumento de aminoácidos, um aumento de proteína; contudo, nos diferentes índices de desfolhas o menor teor de aminoácidos ocorreu nas plantas com 15 e 20 folhas, aumentado nas plantas com 5 e 10 folhas deixadas no ramo de produção (Figura 3B).

Segundo Bouquet et al. (2006); Vidal et al. (2006) além do papel como fonte de energia os açúcares podem estar envolvidos na regulação do desenvolvimento reprodutivo da videira como moléculas de sinalização.

Observou-se, na Figura 4, que o teor de clorofila foi crescente nas fases fisiológicas, sendo sua maior concentração 42,15 SPAD, aos 106 dias após a poda, na fase de maturação, acompanhando os resultados de proteínas e aminoácidos nas folhas.



**Figura 4.** Índice de clorofila (SPAD) em videira cultivar Itália em diferentes fases de crescimento de bagas

Segundo Taiz & Zeiger (2009), o teor de clorofila nas folhas está diretamente relacionado com o potencial de atividade fotossintética das plantas. O aumento do teor de clorofila por unidade de área foliar evidencia que folhas maduras produzem mais carboidratos do que necessitam para manter suas atividades metabólicas e crescimento e exportam os fotoassimilados excedentes, na forma de sacarose, para tecidos fotossinteticamente menos ativos ou inativos, como folhas jovens, raízes, cachos ou ramos (Scarpore Filho et al., 2010).

## Conclusões

Os carboidratos são os principais substratos utilizados como fonte de energia para o processo de absorção.

O acúmulo de carboidratos nas folhas foi influenciado pela fase fenológica da videira cv. Itália.

Plantas com 15 folhas deixadas no ramo de produção apresentaram maior teor de amido, açúcares redutores, muito transporte de sacarose e menor teor de aminoácidos.

A quantidade de 15 folhas deixada nos ramos de produção em plantas de videira cv. Itália, é o mais recomendado por

apresentar maior eficiência tanto no transporte como no acúmulo de reserva.

## Agradecimento

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa.

## Literatura Citada

- Ait Barka, E.; Nowak, J.; Clément, C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium Burkholderia phytofirmans strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.11, p.7246-7252, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01047-06>>.
- Borba, M. R. da C.; Scarpore Filho, J. A.; Kluge, R. A. Teores de carboidratos em pessegueiros submetidos a diferentes intensidades de poda verde em clima tropical. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.27, n.1, p.68-72, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452005000100019>>.
- Botelho R. V.; Pires E. J. P.; Terra M. M. Fertilidade de gemas em videiras: fisiologia e fatores envolvidos. *Ambiência*, v.2, n.1, p.129-144, 2006. <<http://web01.unicentro.br/revistas/index.php/ambiencia/article/viewArticle/366>>. 20 Ago. 2012.
- Bouquet, A.; Torregrosa, L.; Iocco, P.; Thomas, M. R. Grapevine (*Vitis vinifera* L.). In: Wang, K. (Ed.) *Agrobacterium* protocol. *Methods in molecular biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. v.344, p.273-286.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976. <[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)905273](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)905273)>.
- Chaves Filho, J. T.; Oliveira, R. F. de. Variação sazonal do amido armazenado em ramos plagiotrópicos do cafeeiro. *Estudos*, v.35, n.1/2, p.85-102, 2008. <<http://link.seer.ueg.br/index.php/estudos/article/viewFile/561/446>>. 20 Jun. 2012.
- Dantas, B. F.; Ribeiro, L. S.; Pereira, M. S. Teor de açúcares solúveis e insolúveis em folhas de videiras, cv. Syrah, em diferentes posições no ramo e épocas do ano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.29, n.1, p.42-47, 2007. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452007000100011>>.
- Galdiano, L. C. Qualidade da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) submetida à aplicação de maturadores químicos em final de safra. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2008. 42p. Dissertação Mestrado.
- Holzappel, B. P.; Smith, B. P.; Mandel, R. M.; Keller, M. Manipulating the postharvest period and its impact on vine productivity of semillon grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.57, n.2, p.148-157, 2006. <<http://ajevonline.org/content/57/2/148.short>>. 12 Jul. 2012.
- Köppen, W. *Climatologia*. Cidade do México: Fundo da Cultura Econômica, 1948. 325p.
- Lawlor, D. W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, v.53, n.370, p.773-787, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/53.370.773>>.
- Lawlor, D. W.; Cornic, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell and Environment*, v.25, n.2, p.275-294, 2002. <<http://dx.doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00814.x>>.
- Lebon, G.; Wojnarowicz, G.; Holzappel, B.; Fontaine, F.; Vaillant-Gaveau, N.; Clément, C. Sugars and flowering in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Experimental Botany*, v.59, n.10, p.2565-2578, 2008. <<http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v6i4a1277>>.
- Mandelli, F.; Miele, A. Poda. In: Miele, A.; Guerra, C. C.; Hickel, E.; Mandelli, F.; Melo, G. W.; Kuhn, G. B.; Tonietto, J.; Protas, J. F. da S.; Mello, L. M. R. de; Garido, L. da R.; Botton, M.; Zanús, M. C.; Sônego, O. R.; Soria, S. de J.; Fajardo, T. V. M.; Camargo, U. A. *Uvas viníferas para processamento em regiões de clima temperado*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Embrapa Uva e Vinho. Sistema de Produção, 4, Versão Eletrônica). <<http://www.cnpqv.embrapa.br/publica/sprod/UvasViniferasRegioesClimaTemperado/poda.htm#desfolha>>. 12 Abr. 2012.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic and reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, n.3, p.426-428, 1959. <<http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>>.
- Morris, D. L. Quantitative determination of carbohydrates with Derwood's anthrone reagent. *Science*, v.5, n.107, p.254-255, 1948. <<http://dx.doi.org/10.1126/science.107.2775.254>>.
- Passos, L. P. *Métodos analíticos e laboratoriais em fisiologia vegetal*. Coronel Pacheco: Embrapa – CNPGL, 1996. 223p.
- Roitsch, T.; Balibrea, M. E.; Hofmann, M.; Proels, R.; Sinha, A. K. Extracellular invertases: metabolic enzyme and metabolic protein. *Journal of Experimental Botany*, v.54, n.382, p.513-524, 2003. <<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erg050>>.
- Rosen, H. A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.67, n.1, p.10, 1957. <[http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90241-2](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(57)90241-2)>.
- Scarpore Filho, J. A.; Moraes, A. L.; Rodrigues, A.; Scarpore, F. V. Rendimento de uva 'Niágara rosada' submetida à redução de área foliar. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.32, n.3, p.778-785, 2010. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452010005000105>>.
- Silva, A. C. da; Leone, S.; Souza, A. P. de; Vasconcellos, M. A. da S.; Rodrigues, J. D.; Ducatti, C. Alocação de fotoassimilados marcados e relação fonte-dreno em figueiras cv. Roxo de Valinhos. 1. Relação fonte e dreno. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife*, v.6, n.3, p.409-418, 2011. <<http://dx.doi.org/10.5039/agraria.v6i3a988>>.
- Taiz, L.; Zeiger, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819p.
- Vidal, J. R.; Kikkert, J. R.; Donzelli, B. D.; Wallace, P. G.; Reish, B. I. Biolistic transformation of grapevine using minimal gene cassette technology. *Plant Cell Reports*, v.26, n.8, p.422-450, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-006-0132-7>>.
- Yemm, E. W.; Willis, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, v.57, n.3, p.508-514, 1954. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1269789/#reference-sec>>. 18 Mai. 2012.