

# OCORRÊNCIA DO PROCESSO DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO NA FERMENTAÇÃO DE FÉCULA DE MANDIOCA<sup>1</sup>

Luiz Ermindo CAVALLET<sup>2,\*</sup>, Sila Mary Rodrigues FERREIRA<sup>3</sup>, Jair J. de LIMA<sup>3</sup>,  
Lindamir T. TULLIO<sup>3</sup>, Diomar Augusto de QUADROS<sup>4</sup>

## RESUMO

A fase inicial do processo de fermentação natural de fécula de mandioca apresenta a ocorrência de fermentação vigorosa em apenas 24 h, mesmo com o meio tendo uma relação carbono/nitrogênio muito alta. Assim, o nitrogênio necessário à formação da biomassa nos primeiros estágios da fermentação seria originário de fora do sistema via fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico, já que o teor protéico disponível na fécula de mandioca é muito baixo. Para verificar tal hipótese, foram feitos dois experimentos fundamentados no balanço de nitrogênio na suspensão com grânulos de fécula durante as primeiras 120 h do processo fermentativo, conduzido sob temperatura ambiente e sob temperatura controlada a 28 °C. Não foram detectados aumentos de nitrogênio na fase estudada, o que sugere a não existência do processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico. Os resultados sugerem que a origem do nitrogênio para o processo fermentativo é a própria fécula, que, quando na forma de polvilho apresenta alta relação C/N, porém, quando em suspensão essa relação abaixa propiciando uma fermentação vigorosa em apenas 24 h.

**Palavras-chave:** polvilho doce, polvilho azedo, biomassa, nitrogênio, relação C/N, bactérias produtoras de ácido láctico.

## SUMMARY

BIOLOGICAL FIXATION OF ATMOSPHERIC N<sub>2</sub> IN THE INITIAL PHASE OF CASSAVA STARCH FERMENTATION. The initial phase of natural fermentation of cassava starch presents vigorous fermentation within the first 24 h and is characterized by a high ration of carbon/nitrogen. Consequently, the necessary nitrogen to the formation of biomass would be originated from outside of the system because the available protein content from cassava starch is very low and depending on biological fixation of atmospheric N<sub>2</sub>. To verify that hypothesis two essays were conducted with the nitrogen balance in the starch granule suspension during the initial 120 h of the fermentation process. The essays were set at room temperature and at the controlled temperature of 28 °C. No increase in the nitrogen content was detected suggesting that no involvement of atmospheric N<sub>2</sub>. Results suggest that the origin of the nitrogen to the fermentation process is the cassava starch itself. The cassava starch in the flour form possesses high C/N ratio whereas in the aqueous suspension the C/N ratio is lowered propitiating vigorous fermentation.

**Keywords:** cassava starch flour form, fermented cassava starch, biomass, nitrogen, C/N ratio, acid lactic bacteria.

## 1 - INTRODUÇÃO

A fermentação natural de fécula de mandioca ocorre sem inoculação e sem suplementações nutricionais, sendo que a fécula de mandioca é o único substrato empregado para esse processo e o produto formado é o polvilho azedo. Estudos mostram que a fermentação natural que origina o polvilho azedo ocorre principalmente devido à ação de bactérias do ácido láctico [3]. A fécula de mandioca tem cerca de 98% de amido na forma granular e cerca de 0,06% de nitrogênio total, expressos em matéria seca. No processo, o produto é suspenso em água e 24 h após é visível a turvação da água sobrenadante e presença de bolhas na fécula decantada, que, posteriormente, sobem à superfície formando espuma [2]. Os

componentes não amiláceos da fécula de mandioca somam menos de 1% [12].

A principal evidência para a existência de uma origem externa de nitrogênio na fermentação seria a ocorrência de fermentação vigorosa em apenas 24 h e início do processo com alta relação carbono/nitrogênio, a qual situa-se ao redor de 730/1. Assim, o nitrogênio necessário à formação da biomassa nos primeiros estágios da fermentação seria originário da atmosfera, uma vez que o teor protéico disponível na fécula de mandioca é muito baixo [4].

A hipótese adotada é da existência do processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico no meio fermentativo natural de fécula de mandioca e, para isso, há a suposição de ligação daquele com qualquer incremento no balanço de nitrogênio. Em se tratando de processo biossintético, é esperado que a presença de microrganismos esteja correlacionada com o aumento do conteúdo de nitrogênio. Ensaios de laboratório com fermentação natural de fécula de mandioca confirmaram a presença de diferentes grupos de microrganismos não simbióticos fixadores de N<sub>2</sub> atmosférico, ao mesmo tempo em que se observou aumento do teor total de nitrogênio de 1,4 para 5,6% (p v<sup>-1</sup>) no líquido sobrenadante [4].

A ocorrência de fixação biológica de N<sub>2</sub> é relatada em processo fermentativo natural de outros alimentos amiláceos,

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 24/1/2005. Aceito para publicação em 6/7/2006 (001465)

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Paranaguá (FAFIPAR), Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), Rua Comendador Corrêa Júnior, 117, Centro, C. P. 236, CEP 83203-280, Paranaguá (PR)  
E-mail: luizcvl@yahoo.com

<sup>3</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, CEP 80210-170, Curitiba (PR)

<sup>4</sup>Campus Litoral, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Jaguariaíva, 512, CEP 83260-000, Matinhos (PR)

\* A quem a correspondência deve ser enviada

como o Pozol, uma típica bebida utilizada no México obtida do amido de milho, em que os autores verificaram um aumento de N no substrato, bem como encontraram bactérias do gênero *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Chlostridium*, que são fixadoras de nitrogênio e presentes no solo. Outro exemplo é com o processo fermentativo do "Tempeh" pelo *Rhizopus oligosporus* Saito, feito a partir de grãos de soja na Ásia, na qual houve aumento do nitrogênio solúvel, ainda que o nitrogênio total permanecesse quase inalterado [13, 7].

O presente trabalho teve como objetivo investigar a hipótese da presença de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico na fase inicial do processo fermentativo de fécula de mandioca, tendo como indicador a determinação dos valores totais de N na suspensão água/fécula.

## 2 - METODOLOGIA

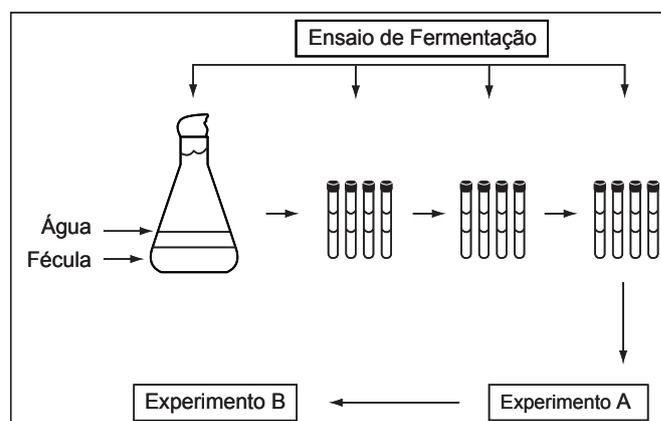
Os experimentos de quantificação de nitrogênio foram desenvolvidos no Laboratório de Pesquisa do curso de Nutrição da Universidade Federal do Paraná (UFPR), na cidade de Curitiba (PR). Utilizando-se o processo fermentativo natural de fécula de mandioca em sua fase inicial como base para a realização dos ensaios, foi definido como substrato de fermentação uma amostra de fécula de mandioca e água, utilizados conjuntamente. Dessa forma procurou-se obter a fécula de forma similar àquela que ocorre na indústria de polvilho azedo, na qual a fécula úmida é encaminhada imediatamente para os tanques onde ocorre o processo de fermentação. A amostra foi obtida a partir de 10 kg de raízes da cultivar Branca de Santa Catarina, com 12 meses de idade e colhidas no setor de recepção de uma indústria de polvilho azedo da cidade de Marechal Cândido Rondon (PR). A extração, separação e secagem da fécula de mandioca foram feitas artesanalmente, sendo que a secagem foi feita aproximadamente uma hora após a extração, durante 24 h em ambiente aberto, em bandeja de alumínio e com jato de ar de aproximadamente 70 °C direcionado de baixo para cima e sem entrar em contacto com a amostra de fécula. Para adicionar às unidades experimentais foi utilizada água potável não clorada.

A caracterização físico-química da amostra de fécula de mandioca utilizada na condução do experimento seguiu metodologia utilizada pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ [9], exceto a quantificação de amido que foi feita segundo RICKARD & BEHN [11]. A leitura de pH foi feita com potenciômetro marca MS Tecnon, modelo PA200. A relação C/N foi calculada teoricamente por estequiometria considerando haver 44,44% de carbono em uma molécula de amido.

Os dois experimentos de quantificação de nitrogênio das amostras de substrato tiveram procedimento metodológico de extração, destilação e titulação feitos conforme metodologia oficial de análises químicas da AOAC [1] e o fluxograma dos processamentos do experimento, como um todo, são apresentados na *Figura 1*.

Antes de iniciar o experimento, foi feito um ensaio de fermentação para otimizar condições favoráveis ao aumento do teor de nitrogênio no substrato de fermentação. O ensaio

de fermentação consistiu em coletar a água sobrenadante em 48 h após a mistura de 300 g da mesma fécula de mandioca utilizada para o experimento, juntamente com 500 mL de água em um copo Erlenmeyer de 1000 mL. A água sobrenadante coletada foi transferida em volume de 50 mL para copo Becker de 200 mL e, com auxílio de pipeta graduada de 1,0 mL, foi colocado 0,2 mL desta em 4 tubos de ensaios de 16 x 150 mm, juntamente com 8,000 ± 1 g de fécula de mandioca e 20,0 mL de água potável não clorada. Após 48 h do início do ensaio de fermentação, foi determinada a quantidade de nitrogênio total em cada um dos quatro tubos e selecionado aquele que apresentou o maior teor de nitrogênio, sendo este mantido posteriormente sob refrigeração a 5 °C. O procedimento de repicagem e seleção do tubo com o maior teor de nitrogênio foi repetido mais duas vezes. Após cinco dias, retirou-se a água sobrenadante desse tubo de ensaio e foi introduzido 0,2 mL em cada um dos 16 tubos do primeiro experimento.



**FIGURA 1** – Fluxograma dos processamentos (Ensaio de Fermentação, Experimento A e Experimento B) do experimento de balanço de nitrogênio no substrato de fermentação de fécula de mandioca.

O primeiro experimento (experimento A) foi conduzido em ambiente sem controle de temperatura e variou de 8 a 25 °C. Foi colocado 8,000 ± 1 g de fécula de mandioca em tubos de ensaios de 16 x 150 mm, com tampa, juntamente com 20,0 mL de água e 0,2 mL de inóculo obtido do ensaio de inicial de fermentação. Determinou-se a percentagem de nitrogênio total no início (0 h), 24, 48, 72, 96 e 120 h, em quadruplicata, totalizando 24 tubos de ensaio. Antes da coleta de amostra, o peso de cada tubo de ensaio foi ajustado àquele que possuía no início do experimento. A percentagem de nitrogênio foi feita em 5,0 mL de amostra colhida com pipeta de vidro a 3,0 cm abaixo do nível da suspensão fécula + água e imediatamente após a homogeneização dessa. A coleta de amostra, portanto, foi obtida volumetricamente e havia grânulos de amido na suspensão. Após a determinação selecionou-se o tubo de ensaio com o maior teor de nitrogênio e foi armazenado em geladeira a 5 °C durante 15 dias, quando o seu conteúdo foi utilizado como inóculo para o experimento B.

O segundo experimento (experimento B) foi conduzido sob temperatura constante de 28 °C, em banho-maria.

Adotou-se o controle de temperatura para buscar um experimento conduzido de forma diversa daquela utilizada no experimento A, assim como também diferiram a quantidade de fécula e água utilizada. O nível da temperatura escolhida não influenciou a condução do experimento, uma vez que a temperatura não é fator limitante para o processo fermentativo da fécula de mandioca [5].

Para esse experimento, colocou-se 10,000 ± 1 g de fécula de mandioca em tubo de ensaios de 16 x 150 mm, juntamente com 15 mL de água e 0,2 mL de inóculo proveniente do tubo de ensaio do experimento A, selecionado pela maior percentagem de nitrogênio, que, com o auxílio de uma pipeta de vidro, foi coletado a aproximadamente 3 cm abaixo do nível da suspensão água + fécula, imediatamente após homogeneização. A percentagem de nitrogênio foi determinada em 5,0 mL de amostra no início (0 h), 24, 48, 72, 96 e 120 h, em quadruplicata, totalizando 24 tubos de ensaio. O ajuste de peso antes da coleta e a forma de coleta (volumetricamente) foram iguais ao experimento A.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 - Características físico-químicas das amostras de fécula

As características físico-químicas da amostra de fécula de mandioca “*in natura*” utilizada nos experimentos são apresentadas na *Tabela 1*. Observa-se que o teor de nitrogênio é 0,09% e, portanto, a amostra de fécula apresenta teores de nitrogênio um pouco acima do normal, uma vez que o teor de nitrogênio encontrado normalmente na fécula de mandioca é de 0,06% [12]. Isso pode ter ocasionado impedimentos quanto à ocorrência de fixação biológica de nitrogênio atmosférico no processo de fermentação, uma vez que concentrações desse elemento podem inibir tal processo quando acima de determinados níveis [10, 8]. A relação carbono/nitrogênio possui valor em torno de 478, o qual é considerado alto [2]. Pouco nitrogênio para muito carbono implica em uma condição de dificuldade para a ocorrência de um processo fermentativo rápido e vigoroso, como é característico no início do processo de fermentação de fécula de mandioca. Embora a amostra de fécula tenha tido teores de nitrogênio acima dos valores normais, esses não foram elevados o suficiente para descaracterizar uma elevada relação C/N, e essa condição é que suporta a hipótese da existência de origem externa de nitrogênio [4].

**TABELA 1** – Características físico-químicas da amostra de fécula de mandioca utilizadas nos experimentos de quantificação de N total.

Umidade %	8,57
pH	5,60
Acidez titulável*	1,54
<b>% na matéria seca</b>	
Nitrogênio total	0,09
Amido	96,94
Teor de carbono	43,08
Relação C/N	478,60

\* mL de NaOH N 100 g de matéria seca<sup>-1</sup>.

O valor da acidez titulável apresentou-se acima de 0,94 mL de NaOH N 100 g de matéria seca<sup>-1</sup>, valor esse tido como normal para fécula de mandioca [11]. O valor de pH foi de 5,6, portanto abaixo de 6,2, valor este apontado como normal para fécula de mandioca [11]. Isso pode indicar que, na amostra de fécula de mandioca usada para o experimento, parte do processo fermentativo já tenha ocorrido, uma vez que pH e acidez titulável são indicadores do seu início [2].

#### 3.2 - Balanço de nitrogênio no substrato de fécula de mandioca

A princípio, os resultados obtidos apontaram para a não confirmação da hipótese da ocorrência de fixação biológica de N<sub>2</sub> no processo de fermentação de fécula de mandioca. Os valores do balanço de nitrogênio no substrato de fécula de mandioca nos experimentos A e B são apresentados na *Tabela 2*.

**TABELA 2** – Valores de nitrogênio total ao longo do tempo no substrato de fécula de mandioca, sendo experimento A conduzido em condições ambientais e experimento B conduzido com temperatura constante de 28 °C.

Horas	Experimento A		Experimento B	
	% N total	C.V.	% N total	C.V.
0(início)	0,00640 a	25,20	0,01007 a	6,97
24	0,00510 a	26,64	0,01075 a	14,11
48	0,00526 a	19,30	0,01177 a	8,09
72	0,00526 a	34,42	0,00980 a	13,80
96	0,00803 a	14,02	0,01109 a	2,37
120	0,00708 a	25,14	0,01008 a	6,03

Resultados na coluna seguidos da mesma letra não diferem pelo teste Tukey (F < 0,05).

Tanto no experimento A, que foi conduzido em condições ambientais, como no experimento B, que foi conduzido sob temperatura constante de 28 °C, não foi possível detectar variação do conteúdo de nitrogênio total durante o experimento. Ainda assim, observou-se em ambos uma tendência de aumento após às 96 h. O fato de não haver sido detectado aumento de nitrogênio total na suspensão contendo água e fécula nos experimentos A, B, quando comparado com o início (tempo 0), faz supor que não ocorreu nesses o processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico. Também se pode apontar que a condição de temperatura do meio pouco influenciou para a ocorrência ou não do processo em estudo. Ou seja, utilizando-se temperatura controlada ou temperatura ambiente, a princípio essa condição não contribuiu para diferenciar condições de ocorrência de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico no processo de fermentação de fécula de mandioca.

Por outro lado, a constatação de não ocorrência do processo em estudo pode ser explicado quando se considera o conteúdo de N total na amostra de fécula utilizada no experimento. Um indício dessa constatação é o fato de que a amostra de fécula de mandioca utilizada possuía um valor de 0,09% de nitrogênio total, ou seja, uma vez e meia a média de 0,06% encontrada normalmente na fécula de mandioca [12]. O fato de que a amostra de fécula de man-

dioca utilizada teve uma concentração de nitrogênio acima dos valores normais quando do início dos experimentos, aponta para a possibilidade de que já haveria ocorrido parte da fixação biológica de nitrogênio atmosférico durante o período entre a obtenção das amostras e o início do experimento. É possível, portanto, que tenha ocorrido fixação de N<sub>2</sub> durante a obtenção do substrato utilizado para o experimento e o pouco N<sub>2</sub> fixado do ar foi suficiente para a condição de ocorrência do processo fermentativo, porém essa quantidade de N<sub>2</sub> fixado não foi detectada, uma vez que ocorreu antes do início dos experimentos.

### 3.3 - Relação carbono/nitrogênio na fécula e no substrato da fermentação

Constatada a não ocorrência de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico no processo de fermentação de fécula de mandioca durante o período estudado, ainda assim fica a ser explicada a fermentação vigorosa que ocorre em apenas 24 h do processo fermentativo, uma vez que a quantidade de nitrogênio total no substrato foi muito pouca (< 0,06%) em relação à grande quantidade de carbono (aproximadamente 44%).

Uma das possíveis explicações para isso seria o fato de que uma alta relação C/N na amostra de fécula de mandioca utilizada como substrato, decresceu para valores relativamente baixos quando do início do processo fermentativo, sem, entretanto, ter havido aporte de nitrogênio de fora do sistema. Quando se adicionou água na amostra de fécula de mandioca para constituir o meio fermentativo, ficaram constituídas duas fases físicas, quais sejam: fase sólida e fase líquida (Figura 2). A fase sólida foi representada pela massa dos grãos de fécula que possuíram alta relação C/N, e fase líquida, representada pela água sobrenadante, que ocupou o espaço entre os grãos e que teve uma relação C/N baixa.

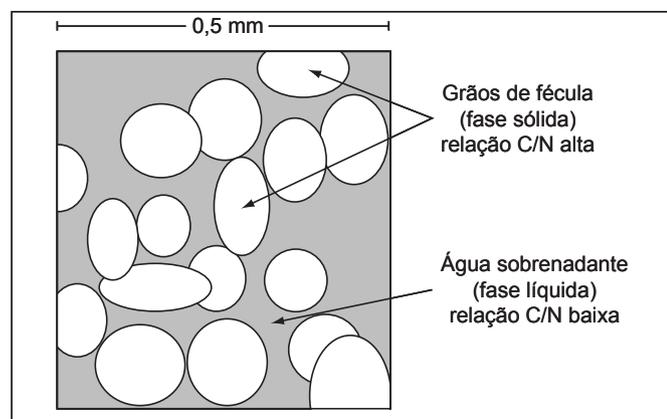


FIGURA 2 – Meio fermentativo de fécula de mandioca.

Imediatamente após a formação do meio fermentativo, a fase líquida dissolveu parte do nitrogênio mineral que pudesse estar na superfície ou mesmo solto entre os grãos de fécula. A fase líquida conteve também uma pequena parte

de carbono, representada principalmente pelos de açúcares redutores, formados por moléculas de maltotetraoses, maltotrioses, maltose e glicose originados da superfície dos grãos de fécula [6]. Por outro lado, a fase que conteve os grãos de fécula continuou com uma alta relação C/N. Já a fase líquida, por menor que fosse o nitrogênio dissolvido nela, teve uma relação C/N não tão alta, uma vez que ela não teve grandes quantidades de carbono.

Como a atividade metabólica dos microrganismos responsáveis pelo processo de fermentação ocorre necessariamente na fase líquida, a relação C/N dessa não atuou de forma limitante quanto ao fato de haver uma fermentação vigorosa em apenas 24 h, uma vez que esta foi considerada baixa.

Houve, portanto, no meio fermentativo de fécula de mandioca, duas fases com relações C/N diferentes, sendo que aquela da fase líquida, na qual ocorreu uma imediata fermentação vigorosa, teve relação C/N baixa. Dessa forma, pode-se excluir a hipótese da ocorrência de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico, uma vez que não houve necessidade de considerar entrada do elemento nitrogênio no sistema. Por outro lado, ficou evidenciada a presença da fase líquida com baixa relação C/N, lugar onde realmente ocorreu o processo fermentativo e isso porque o pouco nitrogênio dos grãos de fécula foi suficiente para a atividade metabólica dos microrganismos que realizaram o processo fermentativo. Essa pouca quantidade de nitrogênio presente nos grãos de fécula, juntamente com pouca quantidade de carbono dos açúcares redutores foram para a fase líquida, propiciando ao final uma baixa relação C/N no meio fermentativo, o que favoreceu uma fermentação vigorosa e rápida em apenas 24 h.

## 4 - CONCLUSÕES

Não houve aumento de nitrogênio total durante a fase inicial do processo de fermentação de fécula de mandioca e assim sendo não ocorreu o processo de fixação biológica de N<sub>2</sub> atmosférico.

A origem do nitrogênio para o processo fermentativo foi a própria fécula que, na forma de polvilho, apresenta alta relação C/N, porém, quando em suspensão aquosa no meio fermentativo, essa relação abaixou consideravelmente propiciando uma fermentação vigorosa e rápida.

Para experimentos de balanço de N no meio fermentativo de fécula de mandioca, devem ser consideradas separadamente as duas fases físicas que o compõem.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**, 17<sup>th</sup>. edition. Gaythersburg: AOAC, 2000.
- [2] CEREDA, M. P. **Alguns aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca**. Botucatu, 1973. 89 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

- [3] CEREDA, M. P. Microorganismos e ácidos orgânicos ocorrentes na fermentação de fécula de mandioca. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 361-362, 1975.
- [4] CEREDA, M. P.; GIAJ-LEVRA, L. A. Constatação de bactérias não simbióticas fixadoras de nitrogênio em fermentação natural de fécula de mandioca. **Revista Brasileira da Mandioca**, Cruz das Almas, v. 6, n. 1, p. 29-33, 1987.
- [5] CEREDA, M. P.; LIMA, U. de A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. II Controle das fermentações realizadas em laboratório. **Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.**, Campinas, v. 15, p. 107-122, 1981.
- [6] CEREDA, M. P.; BONASSI, I. A.; LIMA, V. de A.; WOSIACKI, G. Ensaio de fermentação de fécula de mandioca utilizando substrato esterilizado com brometo de metila. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÃO. 1982, Viçosa. **Anais...Viçosa**, 1982.
- [7] HESSELTINE, C. W. A millennium of fungi, food and fermentation. **Mycology**, v. 57, p. 149-197, 1965.
- [8] HILL, S. Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In: STACEY, G.; BURRIS, R. M.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation.**, New York: Chapman and Hall, 1992. p. 87-134.
- [9] INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do instituto Adolfo Lutz - métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 2. ed. São Paulo, 1985. 533 p.
- [10] LIMMER, C.; DRAKE, H. L. Effects of carbon, nitrogen, and electron acceptor availability on anaerobic N<sup>2</sup>-fixation in a beech forest soil. **Soil Biol. Biochem.**, v. 30, n. 2, p. 153-158, 1998.
- [11] RICKARD, J. E., BEHN, K. R. Evaluation of acid and enzyme hydrolytic methods for determination of cassava starch. **Journal of Science, Food and Agriculture**, v. 4, n. 4, p. 373-379, 1987.
- [12] SARMENTO, S. B. S.; CEREDA, M. P.; BONASSI, I.; NUNES, O. L. G. S. Caracterização do polvilho azedo comercial produzido no Estado de Minas Gerais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA MANDIOCA. 1994, Salvador. **Anais...Salvador: EMBRAPA**, 1994. 21 p.
- [13] ULLOA, M.; HERRERA, T.; LANZA G. Fijación de nitrógeno atmosférico por microorganismos del Pozol. **Ver. Lat-amer. Microbiol.**, México, v. 13, p. 113-124, 1971.