



Teor e composição de óleo essencial em cones de *Humulus lupulus* L. com incidência de míldio.

Submissão: 20/03/2025
Aceito: 08/04/2025

Ana Vitória de Resende Lisboa Piassetta¹ – <https://orcid.org/0009-0008-7125-6077>

Abelardo Máximo de Carvalho Filho¹ – <https://orcid.org/0000-0003-0365-6972>

Roger Raupp Cipriano^{1*} – <https://orcid.org/0000-0002-3896-9074>

Cícero Deschamps¹ – <https://orcid.org/0000-0003-0786-0532>

¹Laboratório de Ecofisiologia Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná

Autor para correspondência: Roger Raupp Cipriano – rogerrarupp@gmail.com

Resumo: *Humulus lupulus* L. amplamente utilizada na produção de cerveja, apresenta óleos essenciais produzidos nas glândulas de lupulina presentes nos cones, de inflorescências femininas da espécie. O teor e a composição do óleo essencial são influenciados por diversos fatores, entre eles à infecção pelo fungo *Pseudoperonospora humuli*, que é responsável por causar o míldio. O estudo teve como objetivo avaliar o teor e a composição dos óleos essenciais de cultivares de lúpulo extraídos de cones com e sem sintomas da doença. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação dos cultivares Chinook, Cascade e Rio Grande do Sul (RGS) durante duas horas e a composição determinada por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. Os resultados demonstraram teor inferior de óleo essencial nos cones contaminados do cultivar Chinook, quando comparados às outras cultivares. Na determinação da composição do óleo foi observado menor quantidade do composto mirceeno no cultivar Chinook. O mirceeno apresenta forte ação fungicida, portanto, o maior efeito do fungo nos teores de óleos essenciais pode estar associado com os menores teores deste composto.

Palavras-chave: Lúpulo; *Pseudoperonospora humuli*; compostos aromáticos; mirceeno.

1. Introdução

Humulus lupulus, conhecido popularmente como lúpulo, é uma planta trepadeira perene, amplamente utilizada na produção de cerveja. Seu crescimento vegetativo é mais intenso durante os meses quentes, enquanto nos meses frios a planta entra em dormência, concentrando seu desenvolvimento nos órgãos subterrâneos. Pertence à família Cannabaceae, e faz parte de um gênero que inclui outras espécies, como o *Humulus japonicus* e o *Humulus yunnanensis* (Biendl et al., 2014; Durello, Silva e Bogus, 2019).

O óleo essencial do lúpulo é composto por componentes químicos voláteis produzidos nas glândulas de lupulina, presentes nas inflorescências femininas, denominadas cones (Olsovská et al., 2016; Durello, Silva e Bogus, 2019). Os óleos são normalmente extraídos por destilação e representam de 0,2% a 3% do peso seco dos cones (Biendl et al. 2014). A sua composição é complexa, podendo incluir mais de 1000 componentes, embora nem todos tenham sido identificados. No entanto, os mais relevantes, como o mirceeno, o farneseno, α-humuleno e (E)-cariofileno, são bem conhecidos, com efeitos tanto na produção de cerveja quanto na fabricação de fármacos e totalizam cerca de 80 a 90% do teor de muitos óleos essenciais de lúpulo (Durello, Silva e Bogus, 2019).

A produção e o teor de óleo essencial na espécie são influenciados por uma série de fatores, incluindo as condições climáticas, práticas agrícolas e presença de patógenos (Sharp et al. 2014). Dentre as doenças que afetam o lúpulo, o míldio causado por *Pseudoperonospora humuli*, destaca-se como uma das mais devastadoras, capaz de afetar significativamente tanto a produção quanto a qualidade do óleo essencial (Arruda et al., 2024).

Portanto, o objetivo deste estudo foi comparar o teor e a composição do óleo essencial extraído de inflorescências femininas (cones) com e sem sintomas de míldio de *Humulus lupulus* L., variedades Cascade, Chinook e Rio Grande do Sul (RGS).

2. Material e Métodos

Área de estudo

O trabalho foi conduzido na Fazenda Experimental Canguiri da Universidade Federal do Paraná, na Área Experimental de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, situada na região da bacia hidrográfica do rio Iraí, no município de Pinhais-PR. As coordenadas geográficas aproximadas são 25°23'15" S e 49°07'30" W, com uma altitude de cerca de 900 metros. O local do experimento possui um clima classificado como Cfb (classificação de Köppen), com uma média anual de precipitação de 1400 mm, temperatura média anual de 19,2°C e solo predominantemente do tipo cambissolo háplico distrófico latossólico.

Plantio, condução e colheita

Antes do plantio foi aplicada na área uma adubação de potássio com 200 g/planta, dividida em três parcelas, e nitrogenada realizada aplicando 125 kg.ha⁻¹ de ureia no plantio e aos 30 e 60 dias após o plantio.

O plantio teve início em abril de 2023. Para este estudo, foram selecionados os cultivares Cascade, Rio Grande do sul e Chinook. A área de pesquisa consistiu em quatro linhas de plantio, com espaçamento de 1 metro entre plantas e 3 metros entre linhas, totalizando 54 plantas, 18 por cultivar. Após a brotação os ramos foram conduzidos no formato de "V" por cordas de sisal fixadas em arame colocado a 5 metros de altura.





A colheita dos cones foi realizada em abril de 2024. Os cones foram separados em dois grupos com base na incidência de mísio (sintomáticos e assintomáticos). Após a colheita, todas as amostras de cones foram secas em estufa a 35°C até peso constante.

Extração e Análise dos Óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da Universidade Federal do Paraná, por hidrodestilação em aparelho Clevenger por um período de duas horas em três repetições, cada uma com aproximadamente 100 g de cones em 1000 mL de água destilada. O teor de óleo essencial foi determinado em base de massa seca, expresso em porcentagem (% m m⁻¹).

As amostras de óleos essenciais foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento de análise. Para identificação e quantificação dos componentes dos óleos essenciais as amostras foram diluídas em hexano chegando a uma concentração de óleo igual a 1%. Uma alíquota de 1 µL desta solução foi injetada em cromatógrafo gasoso acoplado em espectrômetro de massas (CG/EM) Shimadzu (2010 Plus), lotado no Departamento de Química da UFPR. O injetor foi mantido a 250 °C. Na separação dos constituintes foi utilizada a coluna capilar HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25µm) e gás hélio como carreador (1 mL min⁻¹). A temperatura do forno foi programada de forma crescente de 60 a 240°C a um taxa de 3°C min⁻¹. A identificação dos constituintes químicos foi obtida por comparação de seus espectros de massas com banco de dados e também dos seus índices de retenção linear, calculados a partir da injeção de uma série homóloga de *n*-alcanos (Van Den Doll e Kratz, 1963) e comparados com dados da literatura (Adams, 2017). Na quantificação dos compostos foi utilizado um CG com detector DIC (ionização de chamas) nas mesmas condições descritas acima, exceto pelo gás carreador, hidrogênio a 1,5 mL min⁻¹. A composição percentual foi obtida pela integração eletrônica do sinal do DIC pela divisão da área de cada componente pela área total (%).

Análise Estatística

Para a análise estatística foi considerado o modelo estatístico associado ao delineamento inteiramente casualizado no arranjo fatorial 3 x 2, três cultivares de lúpulo (Cascade, Chinook e Rio Grande do Sul) e dois tipos de cones (sintomáticos e assintomáticos).

Os dados de teor de óleo essencial e dos compostos majoritários foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P<0,05$) com auxílio do programa estatístico SISVAR 5.8.

3. Resultados e Discussão

Teor de Óleos Essenciais

Os teores de óleos essenciais foram distintos entre os cultivares, quando comparados com os cones sintomáticos e assintomáticos (Tabela 1). Chinook apresentou teores inferiores nos cones sintomáticos, com média de 0,01%. Os cones sem sintomas deste cultivar apresentaram média igual a 0,19%. O cultivar RGS apresentou comportamento inverso ao cultivar Chinook. A maior média foi observada em cones sintomáticos (0,39%) e a menor em cones assintomáticos (0,27%). Porém, o teor de óleo essencial não foi afetado pela contaminação com mísio no cultivar Cascade (Tabela 1).

Tabela 1 – Teor de óleos essenciais (%) de cones de diferentes cultivares de *Humulus lupulus*, sintomáticos e assintomáticos, contaminados por mísio.

Cultivar	Sintomas		Média
	Com	Sem	
Chinook	0,01Bc	0,19Aa	0,10
Cascade	0,25Ab	0,26Aa	0,25
RGS	0,39Aa	0,27Ba	0,33
Média	0,22	0,24	
CV (%) = 19,70			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; CV = coeficiente de variação.

A tendência de aumento no teor de óleo essencial em cones contaminados do cultivar RGS corrobora estudos que demonstram a capacidade das plantas de responder ao estresse biótico através da produção de metabólitos secundários (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Essa resposta pode ser interpretada como uma estratégia de defesa, visando a inibir o crescimento do patógeno (Zolfaghari et al., 2013; Nazzaro et al., 2017).

Os teores de óleos essenciais observados nos cones das três cultivares sem sintomas, não apresentaram diferenças significativas e estes valores corroboram com outros trabalhos realizados no Brasil com a espécie. No cultivar Chinook, Lagos et al. (2023), estudando fertilização nitrogenada de plantas cultivadas no estado do Paraná obtiveram valores de 0,31% na safra 2018/2019. A determinação no rendimento de óleo essencial em peletes de diferentes cultivares no Rio Grande do Sul, variaram entre 0,1 e 2,0% no trabalho de Duarte et al. (2023). Valores semelhantes de teor de óleos essenciais foram observados por Souza et al. (2024) em plantas cultivadas no estado de São Paulo.

A diminuição drástica no teor de óleo essencial no cultivar Chinook pode supor a maior agressividade do fungo neste cultivar, promovendo efeito no desenvolvimento dos cones e consequentemente das glândulas de armazenamento de óleos essenciais, lupulina.





Composição dos Óleos Essenciais

Um total de 30 compostos foram identificados nas amostras de óleos essenciais, totalizando em média 95,18% de compostos identificados nos cones com e sem sintomas nos cultivares de *Humulus lupulus* (Tabela 2).

Os compostos majoritários foram mirceno, (*E*)-cariofileno, (*E*)- β -farneseno, β -selineno e α -selineno (Tabela 2; Figura 1). Estes compostos estão entre os majoritários em estudos realizados por Nascimento et al. (2024) e Souza et al. (2024).

O mirceno destaca-se como um componente de grande relevância (Haslbeck et al., 2017). Sua abundância nos óleos essenciais, variando entre 20% e 60% do total, confere-lhe um papel central na definição do aroma e sabor da cerveja (Takoi et al., 2010; Ligor et al., 2014). Além disso, a capacidade de terpenos, como o mirceno, serem biotransformados durante a fermentação em outros compostos aromáticos, amplia ainda mais sua contribuição para a complexidade sensorial da bebida (Kumar et al., 2023).

Apenas a quantidade de mirceno, dentre os compostos majoritários analisados, diferiram estatisticamente entre os cultivares e tipos de cones (Tabela 3). A maior diferença neste composto ocorreu com a cultivar Chinook. Cones dessa cultivar apresentaram a menor quantidade de mirceno nas condições com e sem a doença, além disso, a média desse composto nos cones com sintomas foi menor quando comparado com os cones assintomáticos.

Tabela 2 – Composição de óleos essenciais de cones sintomáticos e assintomáticos de diferentes cultivares de *Humulus lupulus*.

Composto	IRC	IRT	Cultivares					
			Chinook		Cascade		RGS	
			Sem sintomas	Com sintomas	Sem sintomas	Com sintomas	Sem sintomas	Com sintomas
β -pineno	974	974	0,42	-	0,92	0,80	0,72	0,88
mirceno	991	988	35,08	1,94	51,04	52,07	55,38	61,28
heptenoato de metila	1022	1021	0,16	-	0,17	0,20	0,21	0,28
β -felandreno	1026	1025	0,39	-	0,53	0,50	0,44	0,58
linalol	1099	1095	0,94	0,25	0,52	0,63	0,47	0,67
n-nonanal	1103	1100	0,24	0,1	0,20	0,22	0,24	0,22
2-decanone	1192	1190	0,29	0,13	0,17	0,19	0,17	0,18
2-undecanone	1292	1293	0,37	0,24	0,18	0,21	0,20	0,16
decanoato de metila	1323	1323	0,26	0,48	0,64	0,67	0,56	0,52
2-dodecanona	1394	1388	0,20	0,26	0,15	0,11	-	-
(E)-cariofileno	1412	1417	7,55	8,02	5,28	5,49	4,40	4,06
α -trans-bergamoteno	1431	1432	0,81	1,19	0,69	0,69	0,64	0,53
α -humuleno	1445	1452	0,24	0,37	0,11	-	-	-
(E)-β-farneseno	1457	1454	19,08	29,35	15,38	14,09	14,68	11,23
9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-cariofileno	1462	1464	0,35	0,44	0,26	0,27	0,24	0,21
<i>trans</i> -cadina-1(6),4-dieno	1469	1475	1,80	2,43	1,31	1,30	1,21	1,04
β-selineno	1479	1489	9,30	13,22	7,90	7,68	7,01	6,09
δ-selineno	1488	1492	10,70	15,33	8,92	8,85	8,12	7,07
2-tridecanona	1494	1495	0,30	0,59	0,44	0,36	0,33	0,29
γ -cadineno	1507	1513	0,21	0,58	0,44	0,33	0,33	0,24
δ -cadineno	1518	1522	0,44	0,83	0,25	0,23	0,23	0,18
α -cadineno	1527	1537	0,78	1,85	-	-	-	-
α -calacoreno	1533	1544	0,94	2,28	-	-	-	-
(<i>E</i>)-nerolidol	1568	1561	0,15	0,34	-	-	-	-
alcool de cariofilenila	1573	1570	0,46	0,97	0,28	0,35	0,22	0,25
oxido de cariofileno	1603	1582	-	-	-	0,42	0,40	0,35
<i>epi</i> - α -cadinol	1633	1638	0,13	0,49	0,10	-	-	-
α -cadinol	1645	1652	2,14	4,53	1,54	1,41	1,32	1,17
(6Z)-pentadecen-2-ona	1668	1667	-	0,22	-	-	-	-
(2Z, 6E)-farnesol	1718	1722	0,28	0,93	0,14	0,13	-	-
Identificados (%)			94,00	87,36	97,55	97,20	97,51	97,48

IRC = Índice de retenção calculado; IRT = Índice de retenção Adams (2017).



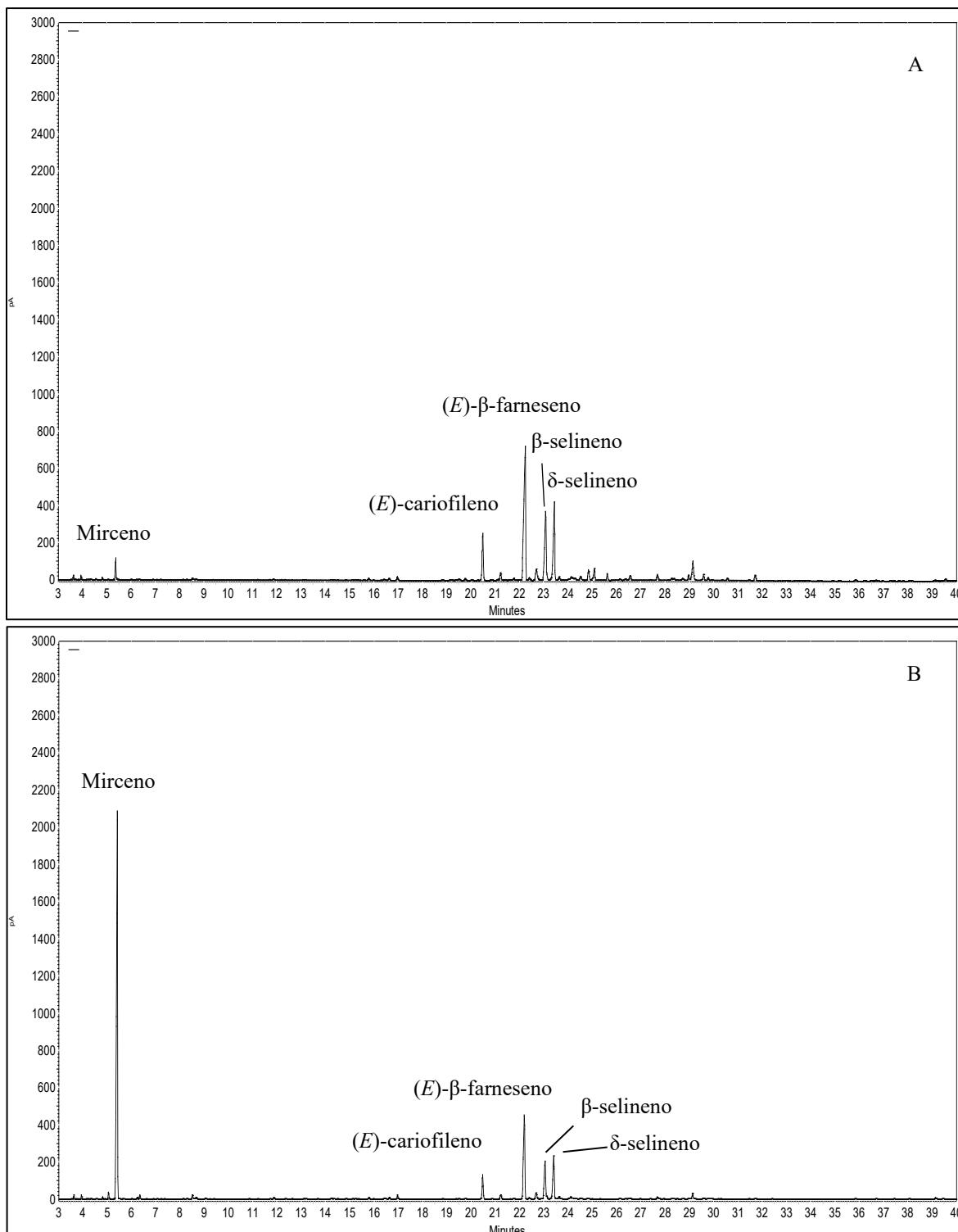


Figura 1 – Cromatogramas representativos dos compostos majoritários de óleos essenciais de cones (A) com sintomas e (B) sem sintomas de mísldio em *Humulus lupulus* (cultivar Chinook).



Tabela 3 – Médias do teor (%) dos compostos majoritários (mirceno, (E)-cariofileno, (E)-β-farneseno, β-selineno e α-selineno) em cones sintomáticos e assintomáticos em diferentes cultivares de *Humulus lupulus L.* contaminados por míldio.

Mirceno			
Cultivar	Sintomas		Média
	Com	Sem	
Chinook	1,94Bb	35,08Ab	18,51
Cascade	52,07Aa	51,04Aa	51,55
RGS	61,28Aa	55,38Aa	58,33
Média	38,43	47,16	
CV (%) = 21,20			
(E)-cariofileno NS			
Cultivar	Sintomas		Média
	Com	Sem	
Chinook	8,02	7,55	7,79
Cascade	5,49	5,28	5,39
RGS	4,06	4,40	4,23
Média	5,86	5,74	
CV (%) = 49,24			
(E)-β-farneseno NS			
Cultivar	Sintomas		Média
	Com	Sem	
Chinook	29,35	19,08	24,22
Cascade	14,09	15,38	14,74
RGS	11,23	14,68	12,96
Média	18,22	16,38	
CV (%) = 57,52			
β-selineno NS			
Cultivar	Sintomas		Média
	Com	Sem	
Chinook	13,22	9,30	11,26
Cascade	7,68	7,90	7,79
RGS	6,09	7,01	6,55
Média	9,00	8,07	
CV (%) = 53,16			
δ-selineno NS			
Cultivar	Sintomas		Média
	Com	Sem	
Chinook	15,33	10,70	13,02
Cascade	8,85	8,92	8,89
RGS	7,07	8,12	7,60
Média	10,42	9,25	
CV (%) = 53,24			

Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na linha e minúscula na coluna não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; CV = coeficiente de variação; NS = não significativo.

Os menores teores de mirceno no cultivar Chinook podem explicar o baixo rendimento de óleos essenciais. O mirceno é um monoterpeno hidrocarboneto acíclico que apresenta forte ação antifúngica (Albayrak et al., 2023). Seu mecanismo de ação se dá pelo efeito que este composto provoca na morfologia da membrana celular (Poléc et al., 2020). Também é relatado que o mirceno é capaz de inibir a expressão de enzimas antioxidantes o que leva o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e consequentemente morte celular em espécies de *Fusarium* (Albayrak et al., 2023). Portanto, o baixo teor do composto mirceno pode ter menor ação sobre o fungo e consequentemente ter afetado o desenvolvimento dos cones e da lupulina. Nos outros dois cultivares os teores de mirceno são estatisticamente maiores e após a contaminação ainda houve um aumento, ainda que não significativo, permitindo que a ação do fungo não tenha sido tão drástica.

A alteração na composição do óleo essencial, com destaque para a produção de mirceno em cones com sintomas, reforça a hipótese de uma resposta defensiva da planta. O mirceno, além de seu papel no aroma da cerveja também pode contribuir para o controle da infecção do fungo *Pseudoperonospora humuli*.

4. Referências





- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. 4.1 ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2017.
- ALBAYRAK, G.; YÖRÜK, E.; TEKER, T.; SEFER, Ö. Investigation of antifungal activities of myrcene on *Fusarium* reference Strains. Archives of Microbiology, v.205, n.82, 2023.
- ARRUDA, M. M.; SOARES, F. S.; LIMA, M. T.; DORACENZI, E. L. COSTA, P. B.; OLIVEIRA, D. N.; FONSECA, T. K. S.; JESUS Jr, W. C.; Santos, A. R. Bibliographic Analysis of Scientific Research on Downy Mildew (*Pseudoperonospora humuli*) in Hop (*Humulus lupulus L.*). Agriculture, v.14, n. 714, 2024.
- BIENDL, M.; ENGELHARD, B.; FORSTER, A.; GAHR, A.; LUTZ, A.; SCHMIDT, R.; SCHÖNBERGER, C. Hops: their cultivation, composition and usage. Nuremberger, Germany: Fachverlag Hans Carl. 2014.
- DUARTE, P. F.; NASCIMENTO, L. H.; FISHER, B.; LOHMANN, A. M.; BANDIERA, V. J.; FERNANDES, I. A.; DAL MAGRO, J.; VALDUGA, E.; CANSIAN, R. L.; PAROUL, N.; JUNGES, A. Efect of Extraction Time on the Yield, Chemical Composition, and Antibacterial Activity of Hop Essential Oil Against Lactic Acid Bacteria (*Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*) Beer Spoilage. Current Microbiology, v.80, n.237, 2023.
- DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ JR, S. QUÍMICA DO LÚPULO. Quim. Nova, v. 42, n 8, 900-919, 2019.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- HASLBECK, K; BUB, S; SCHÖNBERGER, C; ZARNKOW, M; JACOB, F; COELHAN, M. On the Fate of β -Myrcene during Fermentation – The Role of Stripping and Uptake of Hop Oil Components by Brewer's Yeast in Dry Hopped Wort and Beer. BrewingScience, v. 70, 159-169, 2017.
- KUMAR, A.; WARBURTON, A.; SILCOCK, P.; BREMER, P.J.; EYRES, G.T. Yeast Strain Influences the Hop-Derived Sensory Properties and Volatile Composition of Beer. Foods, v.12, 2023.
- LAGOS, F. S.; DESCHAMPS, C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; ANTONIAZZI, N. Biomass and essential oil production of hops cv Chinook in response to nitrogen fertilization. Rev. Ceres, v. 70, n. 5, e70509, aug/sep, 2023.
- LIGOR, M.; STANKEVIČIUS, M.; WENDA-PIESIK, A.; OBELEVIČIUS, K.; RAGAŽINSKIENĖ, O.; STANIUS, Z.; MARUŠKA, A.; BUSZEWSKI, B. Comparative Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Evaluation of Hop (*Humulus lupulus L.*) Essential Oils and Extracts Obtained Using Different Sample Preparation Methods. Food Anal. Methods. v.7, p.1433–1442, 2014.
- NASCIMENTO, F. M. G.; TREVISAN, M. T. S.; ALVES NETO, M. L.; OWEN, R. W.; BRITO, E. S.; SILVA, L. M. A.; ROCHA, K. A. D.; CESAR, C. L.; CARVALHO, H. F.; PELEGATI, V. B.; SILVA, S. A.; MARQUES, S. P. D. Comparison of α and β -acid isomerization in hops and beer using HPLC, confocal microscopy, spectrofluorimetry and chemical analysis of metabolites and essential oils in flowers of different hop cultivars produced in Brazil. Food Chemistry, v.15, 2024.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Essential Oils and Antifungal Activity. Pharmaceuticals, v.10, n.86, 2017.
- OLSOVSKA, J.; BOSTIKOVA, V.; DUSEK, M.; JANDOVSKA, V.; BOGDANOVA, K.; CERMAK, P.; BOSTIK P.; MIKYSKA, A.; KOLAR, M. *Humulus lupulus L.* (Hops) – A Valuable Source Of Compounds With Bioactive Effects For Future Therapies. Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy), v.85, n.1, p. 19-30, 2016.
- POLÉC, K.; BRONIATOWSKI, M.; WYDRO, P.; HAC-WYDRO, K. The impact of β -myrcene – the main component of the hop essential oil – on the lipid films. Journal of Molecular Liquids, v.308, 2020.
- SHARP, D. C.; TOWSEND, S.; QIAN, Y.; SHELLHAMMER, T. H. Effect of Harvest Maturity on the Chemical Composition of Cascade and Willamette Hops. J. Am. Soc. Brew. Chem. v.72, n.4, p.231-238, 2014.
- SOUZA, B. C.; CONTIN, D. R.; VIEIRA, P. C.; COSTA, F. B. Análise De Óleos Voláteis De Lúpulo (*Humulus lupulus L.*) Cascade E Chinook Cultivados Sob Clima Tropical No Estado De São Paulo. Quim. Nova, v.47, n. 3, p.1-8, 2024.
- TAKOI, K.; KOIE, K.; ITOGA, Y.; KATAYAMA, Y.; SHIMASE, M.; NAKAYAMA, Y.; WATARI, J. Biotransformation of Hop-Derived Monoterpene Alcoholsby Lager Yeast and Their Contribution to the Flavorof Hopped Beer. Agric. Food Chem, v.58, p.5050–5058, 2010.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalisation of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid chromatography. J. Chromatogr., v. 11, p. 463-471, 1963.
- ZOLFAGHARI, M.; NAZERI, V.; SEFIDKON, F.; REJALI, F. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and essential oil content and composition of *Ocimum basilicum L.*. Iranian Journal of Plant Physiology, v.3, n.2, p. 643-650, 2013

