Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial

Martins, M.B.G[1].; Martins, A.R.[2]; Telascrêa, M.[3]; Cavalheiro, A.J.[3]

[1] *Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus do Litoral Paulista – Unidade de São Vicente-SP. Praça Infante Dom Henrique, s/n – Parque Bitaru, CEP-11330-900. e-mail: bernadgm@bot.ibilce.unesp.br;*

[2] *Universidade Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Zoologia e Botânica; São José do Rio Preto – SP;*

[3] *Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Química Orgânica, NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Araraquara-SP.*

RESUMO: Objetivo do trabalho foi realizar o estudo anatômico e ultra-estrutural da folha adulta de Cymbopogon citratus (Poaceae) e analisar o óleo essencial bruto através de Cromatografia Gasosa (CG). Para o estudo anatômico, utilizou-se fixador FAA, seguido da desidratação etílica e infiltração do material em resina sintética. Para o estudo ultra-estrutural, o material foi fixado em solução de Karnovsky modificada, desidratado em acetona, seco ao ponto crítico e metalizado. Para a análise em CG, o óleo essencial foi extraído das folhas secas por arraste à vapor e analisado em cromatógrafo gasoso. Através do estudo anatômico observou-se que o limbo foliar é dorsiventral, as células buliformes ocupam o lado adaxial da folha e na região mediana situam-se os feixes vasculares maiores, envolvidos por bainha esclerenquimática com extensões alcançando ambas epidermes. Entre as nervuras maiores observaram-se três a cinco pequenos feixes vasculares ligados apenas a epiderme abaxial. Foram observados tricomas aculiformes caracterizados por serem curtos, pontiagudos e unicelulares, inseridos nas áreas vasculares do mesofilo e micro-pêlos que consistem de uma célula proximal longa e uma célula distal oval, que estão presentes entre as regiões dos feixes vasculares. O cromatograma obtido mostra que o óleo essencial analisado apresenta três componentes majoritários, responsáveis por 87% da composição relativa do óleo bruto. Esses componentes são monoterpenos, justificando o forte odor do óleo essencial.

Palavras-chave: *Cymbopogon citratus*, anatomia foliar, óleos essenciais, plantas medicinais

ABSTRACT: Anatomical characterization of leaf of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae) and chemical profile of the essential oil. The objective of the work was to accomplish an anatomical and ultrastructural study of mature leaf of Cymbopogon citratus (Poaceae) and analyze the essential oil through Gas Chromatography (GC). For the anatomical study, the material was fixed in FAA, followed bytheethyl dehydration and infiltration of the material in synthetic resin. For the ultrastructural study, the material was fixed and Karnovsky, dehydrated in acetone, dried to the critical point and metallized. For the analysis in GC, the essential oil it was obtained by steam distillation of leaves and analyzed by Gas Chromatography. Through the anatomical study it was observed that the faces of mesophyll are distinctly, the bulliform cells occupy the adaxial surface of the leaf and in the medium region are situated the biggest vascular bundles involved by sclerenchymatous hem with extensions reaching both epidermis. Between the biggest vascular bundles are observed three to five small vascular bundles, linkage only in the abaxial epidermis. Shortly, pointed and unicellular structures, called prickle-hair, had been observed inserted above the veins and micro-hair, that they consist of a long basal cell and an oval distal cell, that are located between the regions of vascular bundles. The chromatogram sample shows that the analyzed essential oil presented three majority components, responsible for 87% of the relative composition of the oil. These components are monoterpenos, justifying the strong smell of the essential oil.

Key words: Cymbopogon citratus, leaf anatomy, essential oils, Plants Medicinal

INTRODUÇÃO

As plantas são consideradas uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos. Pesquisadores da área de produtos naturais mostraram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem ampla diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Wall & Wani, 1996). Apesar do aumento de estudos nessa área, os dados disponíveis revelaram que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial

Recebido para publicação em 24/02/03
Aceito para publicação em 15/03/04.

https://doi.org/10.70151/147z7t70

medicinal (Soejarto, 1996).

Cymbopogon citratus (DC.) Stapf é uma Poaceae originária da Índia e aclimatada no Brasil. É uma planta muito conhecida com os nomes vulgares de erva-cidreira, capim-limão e capim-santo (Paviani, 1964).

Suas folhas são frequentemente usadas, sob a forma de infusão, como sedativo e calmante do sistema nervoso (Paviani, 1964). Estudos comprovam sua eficiência antiespasmódica, analgésica, bactericida, inseticida, inibidora do crescimento de fungos (Sargenti & Lanças, 1997) e antimutagênica (Suaeyun *et al.*, 1997).

A espécie caracteriza-se por ser uma planta herbácea, com longas folhas aromáticas, estreitas, agudas e ásperas, com nervura central proeminente. As flores, dificilmente vistas, se reúnem em panículas de pequenas espigas escuras (Craveiro *et al.*, 1981).

O óleo extraído do capim-limão, é um dos mais importantes óleos essenciais conhecidos internacionalmente como essência de "lemongrass". Grandes quantidades são usadas para obtenção de Citral, seu constituinte principal. O Citral é utilizado como matéria prima de importantes compostos químicos denominados iononas, utilizados na perfumaria (Merck & CO., 1960) e, ainda, na síntese da vitamia A (Craveiro *et al.*, 1981).

O objetivo desse trabalho foi caracterizar a estrutura da folha adulta de *Cymbopogon citratus* e caracterizar os constituintes químicos do óleo essencial .

MATERIAL E MÉTODO

O espécime vegetal foi cultivado na Área Experimental do Departamento de Botânica – IBILCE-UNESP – São José do Rio Preto (SP). O exemplar de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf não recebeu tratamento especial no seu cultivo. A exsicata com amostra do material vegetal foi depositada no Herbário da UNESP de São José do Rio Preto com o número SJRP 26227.

1-Confecção de lâminas permanentes: Com a finalidade de se estudar a histologia da lâmina foliar foram utilizadas doze folhas adultas, na região do terço médio da nervura central e da região internervural, colhidas do exemplar da espécie, no estágio vegetativo. O preparo do material para obtenção do laminário histológico para microscopia de luz, constitui-se basicamente de processos usuais utilizados em microtomia, que incluem: fixação em FAA 50 por 24 horas, desidratação em série etílica, infiltração em resina sintética, emblocamento, seccionamento, coloração e montagem de lâminas permanentes. As peças incluídas em resina sintética foram seccionadas em micrótomo rotativo, obtendo-se secções transversais e longitudinais da lâmina foliar e da nervura principal, com 4 mm (Gerrits, 1964). Utilizou-se o corante Azul de Toluidina 1% com Borato de Sódio 1%, em 100 ml de água destilada (O'Brien *et al.*, 1964).

2-Microscopia Eletrônica de Varredura: Porções do terço médio da folha de *Cymbopogon citratus* foram fixadas em uma solução de Karnovsky modificada, composta por paraformoldeído 4%, glutaraldeído 0,5%, em tampão cacodilato de sódio, pH 7,2, 0,1M e água destilada, por uma noite no vácuo. No dia seguinte foram feitas três lavagens com cacodilato 0,05M (com a duração de dez minutos cada) e uma pós fixação com tetróxido de ósmio (OsO_4) "overnight". Após, o material foi desidratado com acetona seguindo a série de concentrações: 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. O material foi levado à secagem até o ponto crítico e fixado a um suporte através de um adesivo condutor e em seguida metalizado (Danilatos, 1998). A análise foi realizada no Microscópio Eletrônico de Varredura, MEV LEO 435 VP.

3-Extração do óleo essencial : Os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, sendo por isso, arrastados pelo vapor d'água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger, que fica acoplado em um balão que contém a planta moída e água destilada em ebulição. O vapor de água juntamente com o óleo passa pelo Clevenger, onde é condensado e segue para um reservatório. O óleo volátil obtido, após separar-se da água, é então coletado (Simões & Spitzer,1999). A extração do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi realizada no Laboratório de Farmacognosia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara-SP.

4- Análise por cromatografia gasosa: O óleo essencial foi análisado no Cromatógrafo Gasoso CG 3800 Varian, Injetor Automático 8200 Autosampler. **Condições:** Coluna: capilar DB5 30m x 0,25mm x 0,25 mm. Injetor: 250°C; Detector: 290°C. Detetor FID. Gás de arraste: He. Fluxo: 1,0mL/min. , 60°C a 240°C; 3°C/min., 1,0mL/min., split: 1/20. Volume de injeção: 1mL. Concentração da amostra: óleo essencial (5,0mg/mL). Solvente: éter *terc*-butilmetílico (Adams, 1995).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Através do estudo anatômico observou-se que o mesofilo é homogêneo, as células buliformes ocupam o lado adaxial da folha e na região mediana situam-se os feixes vasculares maiores, ligados por extensões de bainha esclerenquimática a ambas as

faces da epiderme. Entre os feixes vasculares maiores observam-se três a cinco pequenos feixes vasculares ligados apenas a epiderme abaxial (Figura 1 A-C). O mesofilo apresenta-se com clorênquima composto por células pequenas e isodiamétricas. A bainha que envolve o feixe vascular é dupla, esclerenquimática e cercada por células com parede espessada uniformemente (Figura 1 B).

As epidermes são formadas por células pequenas de parede cutinizada e consistem de células retangulares longas e curtas, com o eixo paralelo ao comprimento da folha. Ocorre a presença de abundantes estômatos. As células podem ter paredes retas, (Figura 1 D e 3 B), o que está de acordo com Metcalfe (1960).

Lewinsohn *et al.* (1998) utilizaram o reagente de Schiff em secções transversais da lâmina e da bainha foliar de *Cymbopogon citratus*, para localizar o óleo essencial, e observaram que o mesmo está presente nas células parenquimáticas do lado adaxial da folha, adjacentes aos tecidos não fotossintéticos entre os feixes vasculares.

Foram encontrados nas epidermes tricomas aculiformes, caracterizados por serem pontiagudos e unicelulares inseridos na região das nervuras da folha (Figura 2 A-B e 3 A). Segundo Metcalfe (1960), essas estruturas são denominadas "prickle–hairs", com a base alongada e dilatada, frequentemente sobre o feixe vascular, e apontando para o ápice da folha.

Paviani (1964), em seu trabalho com *Cymbopogon citratus*, observa que nas duas faces da epiderme há estômatos, formações de sílica e pêlos unicelulares curtos, terminados em ponta. Esses pêlos, geralmente, estão inseridos em pequenas depressões que coincidem com as áreas vasculares do mesofilo.

Liberali *et al.* (1946) descrevem em plantas de *Cymbopogon citratus* que o bordo foliar apresenta longas cerdas unicelulares.

Foram também encontrados micro-pêlos ("micro-hairs") que consistem de uma célula proximal longa e uma célula distal oval, que estão presentes entre as regiões das nervuras (Figura 2 C e 3 A), o que está de acordo com descrição de Metcalfe (1960).

Iruthayathas & Herath (1975) descreveram os diferentes tipos de micro-pêlos presentes em onze linhagens de citronela (*Cymbopogon nardus* L.). Eles também mostraram que esses micro-pêlos contribuem para a produção e estocagem do óleo essencial, com variações de composição química de linhagem para linhagem (Iruthayathas *et al.*, 1977). O micro-pêlo encontrado no presente trabalho, na folha de *Cymbopogon citratus*, se assemelha ao descrito por Iruthayathas & Herath (1982), sendo denominado como tipo IV ou "forma específica", no qual a célula basal é muito dilatada apresentando constrição na base. A célula basal é muito maior do que a célula distal que possui a forma de um sino e uma ponta longa e fina (Figura 4 A-B e 3 A-B).

O cromatograma obtido para *Cymbopogon citratus* mostra que o óleo essencial analisado apresentou três componentes majoritários (Figura 5), responsáveis por 87% da composição relativa do óleo bruto (Tabela 1). Esses componentes são monoterpenos (Figura 5), justificando o forte odor do óleo essencial.

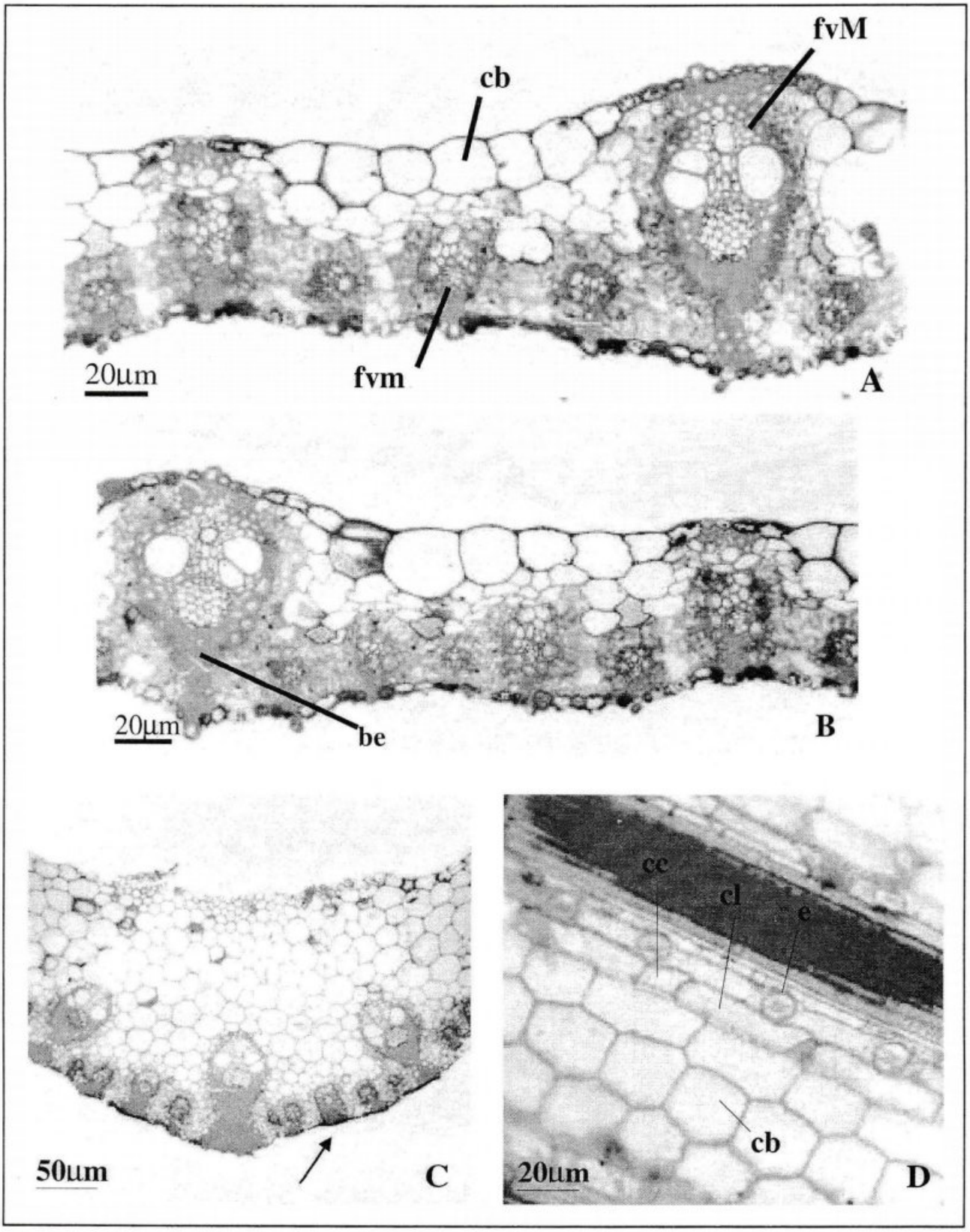


FIGURA 1 - Secções transversais do limbo foliar (A-B), secção transversal da nervura central (C), secção paradérmica da epiderme adaxial (D) de *Cymbopogon citratus*. (cb) células buliformes, (fvM) feixe vascular Maior, (fvm) feixe vascular menor, (e) estômato, (cc) célula curta, (cl) célula longa, (be) bainha esclerenquimática. A seta mostra os pequenos feixes vasculares entre os feixes vasculares maiores que podem variar em número de 3 a 5, como mostram as figuras A, B e C.

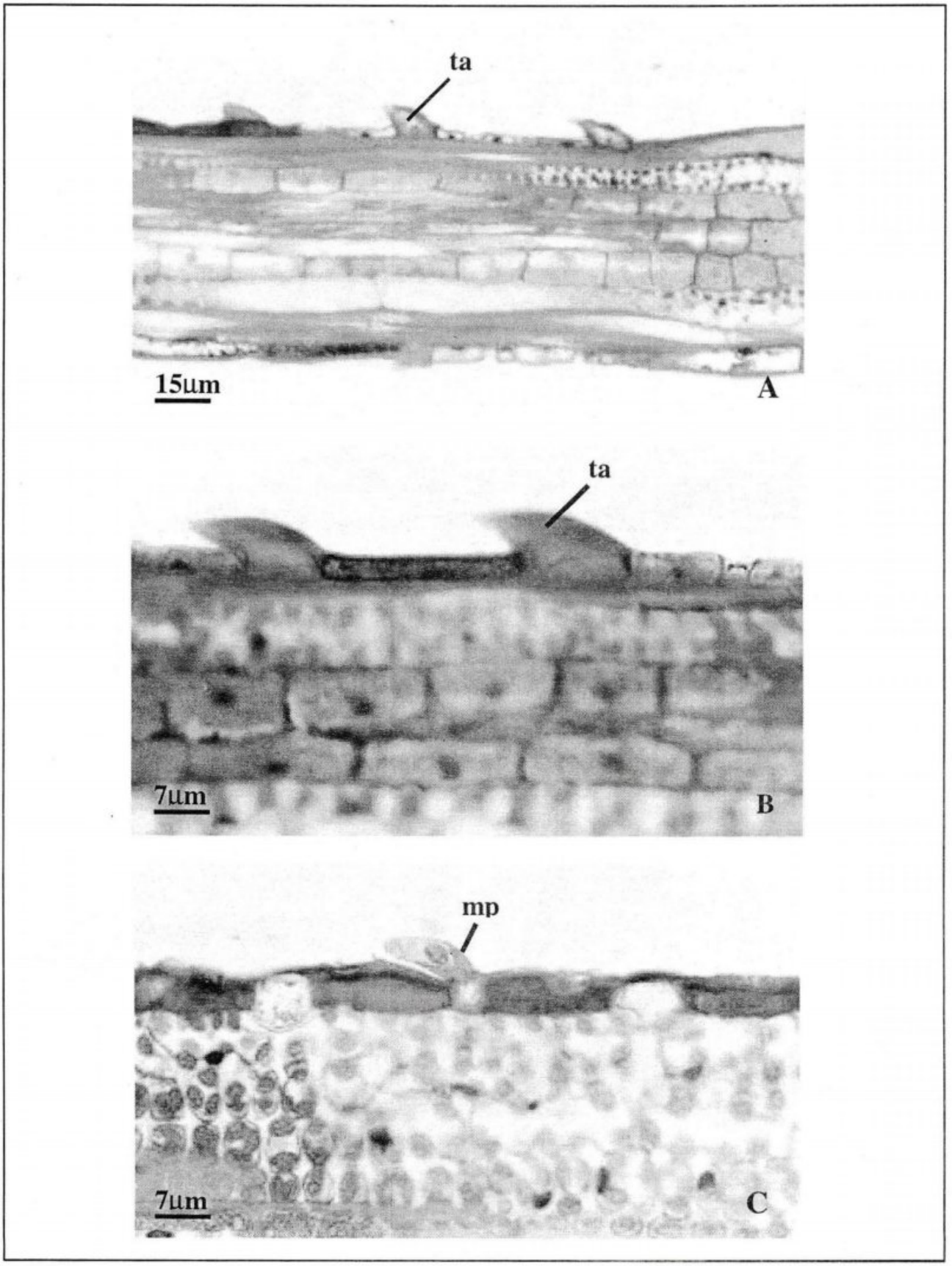


FIGURA 2 - Secções longitudinais da folha de *Cymbopogon citratus* (A-C). (ta) tricoma aculiforme ("prickle-hair"), (mp) micro-pêlo bicelular.

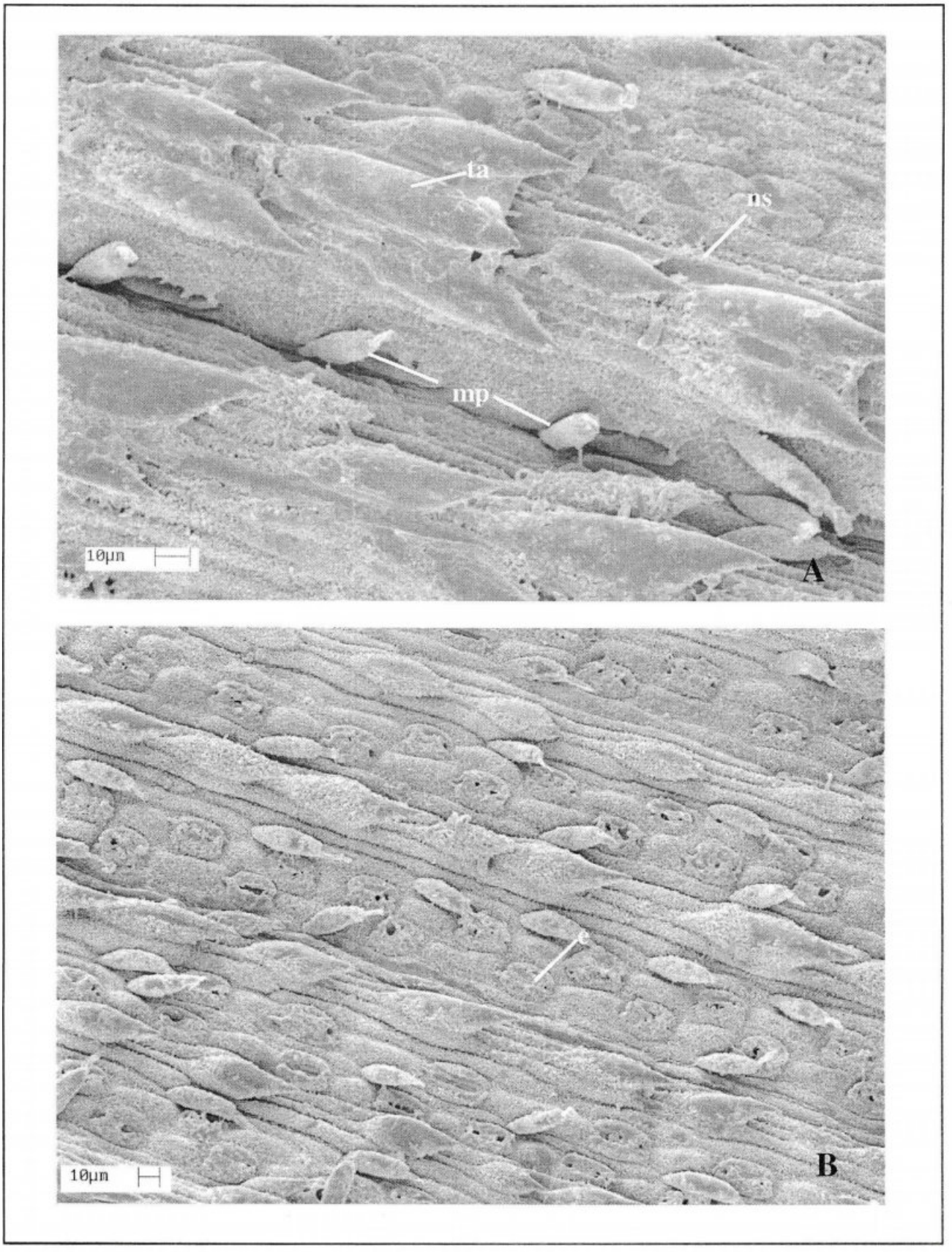


FIGURA 3 - Micrografia eletrônica de varredura da folha de *Cymbopogon citratus* na superfície abaxial (A-B). (ta) tricoma aculiforme (unicelular) disposto ao longo dos feixes vasculares, (mp) micro-pêlo disposto nas depressões entre os feixes vasculares, (ns) nervura secundária, (e) estômato.



FIGURA 4 - Micrografia eletrônica de varredura da folha de *Cymbopogon citratus* na superfície abaxial (A-B). (ta) tricoma aculiforme; (mp) micro-pêlo, formado por uma célula proximal (cp) e por uma célula distal (cd).

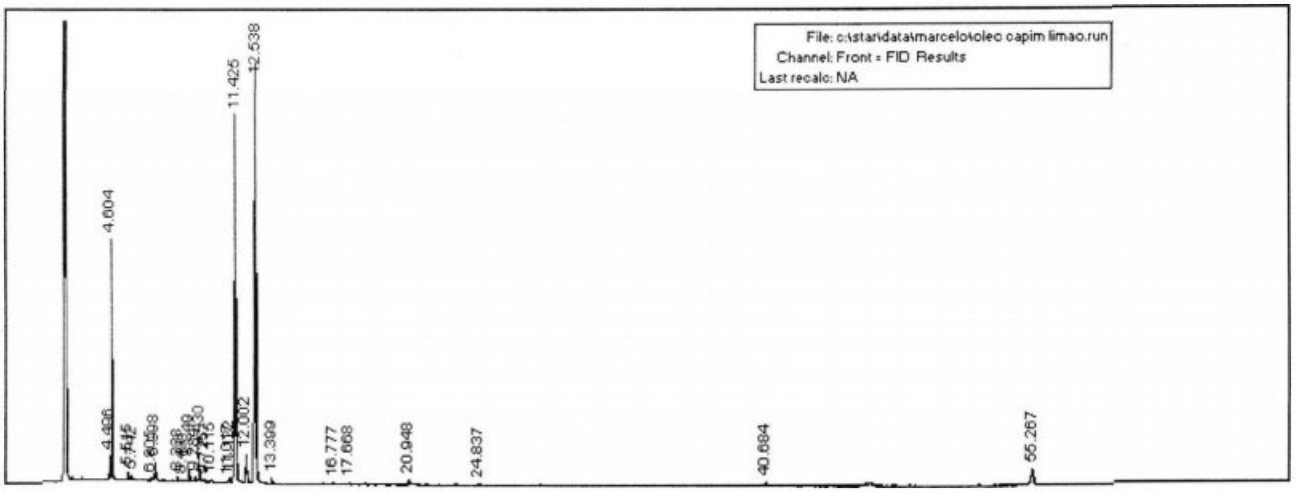


FIGURA 5 - Cromatograma típico do óleo bruto de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, mostrando a presença de três compostos majoritários, sendo os três (tempos de retenção: 4,604; 11,425 e 12,538) componentes monoterpenos.

TABELA 1 - Tempos de retenção e porcentagens relativas obtidas do óleo bruto de Cymbopogon citratus (DC.) Stapf.

Tempo de Retenção (Tr)	% Relativa
4,60	8,49
11,42	34,17
12,53	44,44
	Total: 87,10

Segundo Costa (1994), esse óleo essencial é caracterizado por apresentar citral como um componente majoritário na forma de seus dois isômeros: geranial e neral. Em pequenas quantidades, podem ser encontrados citronelal, isovaleraldeído, metil-heptenol, e ainda geraniol e nerol. Um outro componente encontrado é o mirceno, um hidrocarboneto acíclico, que se polimeriza e resinifica-se quando exposto à luz.

O estudo da composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, com base em dados obtidos por espectrometria de massas, cálculos dos índices de retenção para os picos cromatográficos e comparações com Adams (1995), foi realizado no Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais no Instituto Agronômico de Campinas – IAC, e permitiu identificar a composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, como mostra a TABELA 2, que apresenta as substâncias identificadas, ordenadas segundo os tempos de retenção.

Ferrua *et al.*(1994), verificando o óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus)* obtido através de extração com dióxido de carbono líquido, encontraram alto conteúdo de citral (constituídos por isômeros neral e geranial), o qual é usado na produção de ionona, vitamina A e betacaroteno.

Carlson *et al.* (2001), observando a extração do óleo essencial do *Cymbopogon citratus* através de dióxido de carbono líquido, obtiveram grandes quantidades de neral, geranial e mirceno.

Cicogna Júnior *et al.* (1986/1987) apontam que entre os componentes do *Cymbopogon citratus*, 12 foram identificados em suas análises: mirceno, limoneno, aldeído C-9, metil-heptenona, citronelal, aldeído C-10, linalol, citral b, citral a, acetato de geranila, citronelol e geraniol. Do ponto de vista de número de componentes extraídos do óleo, as amostras obtidas com tempos de extração de 4 a 6 horas são mais ricas. Quanto ao teor de citral, o principal componente da essência, foi verificado que a maior quantidade encontrada de citral a e b foi de 43,6%, muito abaixo dos valores registrados na literatura especializada (75-85%), porém dentro dos padrões da Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959), a qual indica teor de 49% de aldeídos, calculados em citral.

Ekundayo (1984) descreve a ocorrência de 57% de citral no óleo essencial de *Cymbopogon citratus* nigeriano, mas esta porcentagem está abaixo do esperado para as espécies africanas, ou seja, 70%. Ele ainda explica que essa variação na quantidade de citral é devida a fatores genéticos e não ambientais, já que a porcentagem de citral em *Cymbopogon citratus* nigeriano é a mesma durante as diferentes estações do ano.

TABELA 2 - Identificação proposta para os constituintes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.

Composição Química do ódleo essencial de Capim-limão	
Tempo de Retenção (min.)	**Substâncias**
4,496	6-metil-5-hepten-2-ona
4,604	β-mirceno
11,425	neral
12,002	geraniol
12,538	geranial

Onawunmi *et al.* (1984), estudando o óleo essencial de *Cymbopogon citratus,* encontraram três componentes majoritários através do estudo de cromatografia gasosa, e identificaram as frações como sendo mirceno, geranial (citral a) e neral (citral b), respectivamente. Os mesmos autores testaram o citral a e o citral b e comprovaram sua atividade antibacteriana. O mirceno também foi testado, porém não apresentou atividade antimicrobiana.

CONCLUSÃO

O estudo anatômico foliar revelou que o mesofilo de *Cymbopogon citratus* é homogêneo, com clorênquima composto por células pequenas e isodiamétricas, células buliformes ocupando o lado adaxial da folha. Na região mediana situam-se os feixes vasculares maiores ligados por extensões de bainha esclerenquimática a ambas as epidermes. Entre os feixes vasculares maiores observam-se três a cinco pequenos feixes vasculares, ligados apenas a epederme da face abaxial. Foram encontrados na epiderme tricomas aculiformes e micro-pêlos.

O perfil químico do óleo essencial é constituído pelas seguintes substâncias: 6-metil-5-hepten-2-ona, b-mirceno, neral, geraniol e geranial.

AGRADECIMENTO

Ao NAP-MEPA, pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura, ESALQ-USP, Piracicaba, em especial ao Prof. Dr. Elliot Kitajima, Coordenador do Núcleo.

Ao Laboratório de Farmacognosia, pela utilização do Clevenger, em especial à Profa. Dra. Raquel Regina Duarte Moreira da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Unesp - Araraquara-SP.

Ao Centro de P&D de Recursos Genéticos Vegetais no Instituto Agronômico de Campinas – IAC, em especial à Profa. Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil by Ion trap mass spectroscopy.** San Diego: Academic Press, 1995.

CARLSON, L.H.C., MACHADO, R. A. F., SPRICIGO, C. B. *et al.* Extration of lemongrass essential oil with dense carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, p. 33-9, 2001.

CICOGNA JÚNIOR, O., MANCINI, B., JORGE NETO, J. Influência do tempo de destilação na composição quali e quantitativa de óleos essenciais. II-Essências de cravo-da-índia e capim-limão. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 9/9, p. 173-81, 1986/1987.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994, v. 1.

CRAVEIRO, A. A., FERNANDES, A. G., ANDRADE, C. H. S. *et al.* Óleo essencial de lemongrass. In: **Óleos essenciais de plantas do Nordeste.** Fortaleza: Edições UFC, 1981. p.153.

DANILATOS, G.D. Foundations of environmental scanning electron microscopy. **Advances Eletronics Electron Physical** v.71, p.109-250, 1998.

EKUNDAYO, O. Composition of the leaf volatile oil of *Cymbopogon citratus*. **Fitoterapia**, v.6, p.339-42, 1984.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2.ed. São Paulo. Siqueira, 1959.

FERRUA, F. Q., MARQUES, M.O.M., MEIRELLES, M. A. M. Óleo essencial de capim-limão obtido por extração com dióxido de carbono líquido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.14, Supl., p. 83, 1994.

GERRITS, P.O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology:** some fundamental principles. Germany: Leica GmbH, 1964.

IRUTHAYATHAS, E.E., HERATH, W.H.M. Investigation on lemon-grass and citronella (*Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon nardus*). **Proceeding of Agricultural Research Seminar of Faculty of Agriculture, University of Peradeniya, Sri Lanka,** p. 75-6, 1975.

IRUTHAYATHAS, E.E., HERATH, W.H.M. Micro-hairs of citronella leaves and their relationship to components of citronella oil. **Tropical Agriculture,** v. 59, n.3, p. 227-30, 1982.

IRUTHAYATHAS, E.E.,HERATH, W.H.M., WIJESEKERA, R. O. B., JAYAWARDENE, A.L. Variations in the composition of oil in citronella strains. **Journal of the**

National Science Council of Sri Lanka, v. 5, p. 133-46, 1977.

LEWINSOHN, E., DUDAI, N., TADMOR, Y. *et al.* Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**, v. 81, p. 35-9, 1998.

LIBERALLI, C.H., HELOU, J. H., FRANÇA, A.A. Contribuição ao estudo de gramíneas aromáticas: O capim-limão – *Cymbopogon citratus* (D.C.) Sapf. **Revista Brasileira de Farmácia**, p.189-209, 1946.

MERCK & CO., INC. (Ed.) **The Merck Index of Chemical and Drugs.** 7 ed. Rahway: Merck, 1960.

METCALFE, C.R. **Anatomy of the Monocotyledons** : I. Gramineae. Oxford: At the Clarendon Press, 1960.

O'BRIEN, T.P., FEDER, N., MC.CULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-73, 1964.

ONAWUNMI, G.O., YISAK, W., OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Etnopharmacology**, v. 12, p. 279-86, 1984.

PAVIANI, T.I. Algumas considerações acêrca da anatomia foliar de *Cymbopogon citratus* Stapf. **Revista da Faculdade de Farmácia de Santa Maria**, v. 10, p.97-108, 1964.

SARGENTI, S.R., LANÇAS, F.M. Supercritical Fluid Extraction of *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. **Cromatographia**, v. 46, p. 285-90, 1997.

SIMÕES, C. M. O., SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade / UFRGS, Ed. da UFSC, 1999.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal Ethnopharmacology**, v.51, p. 1-15, 1996.

SUAEYUN, R., KINOUCHI, T., ARIMOCHI, *et al.* Inibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) on formation of azoxymethane-induced DNA adducts and aberrant crypt foci in rat colon. **Carcinogenesis**, v.18, p. 949-55, 1997.

WALL, M. E., WANI, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal Ethnopharmacology**, v.51, p. 239-54, 1996.