



Atividade inseticida de compostos *N,S*-acetais sob o ciclo de vida da *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)

Insecticidal activity of N,S-acetal compounds under the life cycle of Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae)

Maraya Lira Kupfer Mota¹, Nelson Luís de Campos Domingues²; Rosilda Mara Mussury¹

¹Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA). Rodovia Dourados-Itahum, km 12. Dourados-MS. marayakupfer64@gmail.com; maramussury@ufgd.edu.br; ²Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas. Laboratório de Catálise Orgânica e Biocatálise. Rodovia Dourados-Itahum, km 12. Dourados-MS. nelsondomingues@ufgd.edu.br

Resumo

A necessidade de novas tecnologias e produtos eficazes para o controle da *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) motivaram diversos grupos de pesquisa em todo o mundo a descrever novos protocolos sintéticos com eficácia no controle do inseto. O objetivo da presente pesquisa foi determinar a atividade inseticida de compostos *N,S*-acetais sintetizados utilizando Lipase de Pâncreas de Porco (LPP) como biocatalizador sob o ciclo de vida da *P. xylostella*. Para tanto foram sintetizados compostos *N,S*-acetais com diferentes grupamentos, sendo eles grupamento metil (TB1), grupamento fluor (TB2), grupamento metoxi (TB3) e grupamento hidro (TB4) e avaliados sobre ciclo de vida de *P. xylostella*. As larvas que se alimentaram do composto TB3 apresentaram aproximadamente 5 dias de vida sendo o período mais curto entre os tratamentos realizados, enquanto o tratamento TB4 foi o mais longo período. Em relação a sobrevivência larval e duração pupal observou-se redução em todos os tratamentos com TB. A sobrevivência pupal reduziu em TB1 e TB3. O número de casais formados para os tratamentos foi variável, sendo formado cinco casais para água, TB2 e TB4. Os tratamentos TB1 e TB3 foram 2 e 4 casais respectivamente. Não foi observada diferença entre os tratamentos para o número de ovos produzidos, mas observou-se redução marcante na viabilidade em TB3 e TB4, ocasionando redução na formação de novas larvas. Novos estudos devem ser conduzidos visando avaliar a toxicidade destes ao longo do tempo.

Palavras – Chave: *N,S*-acetais, Brássicas, Traça-das-crucíferas, Compostos sintéticos, Síntese enzimática, Biocatalizadores.



Abstract

*The need for new technologies and effective products for the control of *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) motivated several research groups around the world to describe new synthetic protocols effectively in insect control. The objective of this research was to determine the insecticidal activity of N,S-acetal compounds synthesized using Pig Pancreas Lipase (PPL) as a biocatalyst under the life cycle of *P. xylostella*. N,S-acetal compounds with different groups were synthesized, being methyl grouping (TB1), fluor grouping (TB2), methoxy grouping (TB3) and hydro grouping (TB4) and evaluated on *P. xylostella* life cycle. The larvae that fed on the TB3 compound presented approximately 5 days of life being the shortest period among the treatments performed, while the TB4 treatment was the longest period. In relation to larval survival and pupal duration, a reduction was observed in all TB treatments. Pupal survival decreased in TB1 and TB3. The number of couples trained for the treatments was variable, and five couples were formed for water, TB2 and TB4. TB1 and TB3 treatments were 2 and 4 couples, respectively. No difference was observed between treatments for the number of eggs produced, but there was a marked reduction in viability in TB3 and TB4, causing a reduction in the formation of new larvae. Further studies should be conducted to evaluate their toxicity over time.*

Key Words: *N,S-acetals, Brássicas, Cruciferous moth, Synthetic compounds, Enzymatic synthesis, Biocatalysts.*

Introdução

A Brassicaceae também conhecida como Cruciferae compreende um grupo diversificado de 350 gêneros e mais de 3.500 espécies de dicotiledôneas representado por 10 famílias de plantas, importantes tanto economicamente e para a nutrição humana, devido a quantidade consumida, o alto valor nutricional e a grande produtividade (VICKERS et al., 2004). As culturas de brassicas são usadas como fontes de óleo, vegetais, condimentos de mostarda e forragem (WARWICK et al., 2003), onde se inclui inúmeras espécies, como o repolho, couve, brócolis, mostarda, couve-flor e nabo. Apesar das características botânicas bem definidas de cada uma delas, essas espécies apresentam vulnerabilidades fitossanitárias comuns (BRANDÃO FILHO et al., 2010).

Perdas significativas na produção dessas hortaliças são observadas devido ao ataque de algumas pragas, entre elas a traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)), um micro lepidóptero caracterizado como uma das pragas cosmopolitas mais destrutivas de culturas brássicas devido a sua alta taxa de alimentação e infestação durante o período, chegando a custar 1,0 bilhão de dólares anuais para o seu gerenciamento globalmente (TALEKAR; SHELTON, 1993). A *P. xylostella* causa grandes danos à cultura, chegando a atingir até 100% de perdas na produção, tornando sua comercialização e consumo inapropriados (BARROS et al., 1993; HAMILTON et al., 2005; HASEEB et al., 2004).



Para diminuir danos ocasionados pela herbivoria, as espécies da família Brassicaceae sintetizam, através do seu metabolismo secundário, um composto denominado glucosinolatos, que são tóxicos para insetos generalistas (LI et al., 2000; FAHEY et al., 2001), porém para a *P. xylostella*, que possui poderosos mecanismos adaptativos em seu organismo (WITTSTOCK; HALKIER, 2002) estes mesmos compostos atuam como estimulante de oviposição e alimentação em *P. xylostella* (IDRIS; GRAFIUS, 1996; SHELTON, 2004).

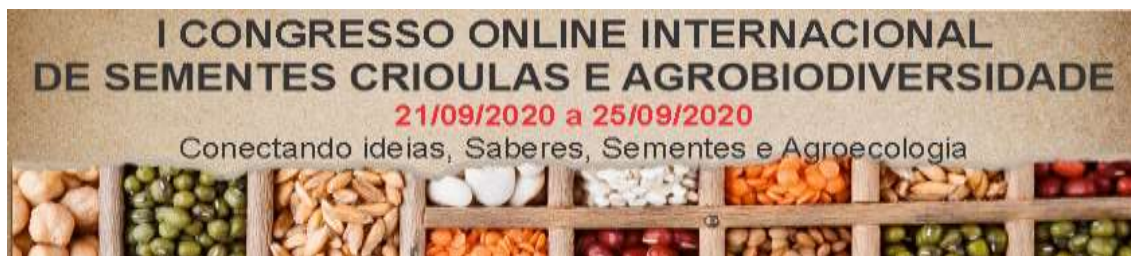
A aplicação de pesticidas é o método mais utilizado por produtores com o intuito de controlar populações e diminuir danos ocasionados pelo inseto praga em questão. Contudo o uso exacerbado e indevido, dessas substâncias fizeram com que a *P. xylostella* desenvolvesse resistência a uma grande quantidade de produtos, fazendo com que perdessem sua total eficácia (CHENG, 1988; MIYATA et al., 1982; CASTELO et al., 2002), outras complicações também foram apontadas, como a morte de insetos não alvo e inimigos naturais (SHELTON, 2004).

A necessidade de novos métodos, novas tecnologias e novos produtos eficazes para o controle da *P. xylostella* motivaram diversos grupos de pesquisa em todo o mundo com o objetivo de descrever novos protocolos sintéticos que não são prejudiciais ao meio ambiente, e que resultaram no uso de catalisadores com reações mais rápidas.

Diferente dos metais pesados, comumente utilizados em inseticidas, enzimas são uma ótima alternativa de catalisadores biodegradáveis de baixo custo, que permite seu uso em soluções aquosas evitando o uso de poluentes como solventes (SCHMID et al., 2001). Devido a importantes aplicações, ao longo dos anos, um grande número de estratégias sintéticas destinadas a produzir novos N, S-acetais foram desenvolvidas, porém ainda não havia procedimentos descritos para a síntese utilizando um catalizador biológico (ALBUQUERQUE et al., 2018). Assim, foi desenvolvido por Albuquerque et al. (2018) métodos sintéticos que usam enzimas como catalisador para sintetizar alguns N, S-acetais sob reação leve e verde.

A principal motivação para estes esforços foram claramente as importantes atividades biológicas de produtos naturais, que são não só de enorme interesse para a indústria farmacêutica e agroquímica, mas também têm um impacto sobre ciências naturais e no bem-estar de longa duração da nossa sociedade (GRONDAL et al., 2010), diminuindo o uso de compostos e solventes de grande impacto ao ambiente.

O objetivo da presente pesquisa foi determinar a atividade inseticida de compostos N,S-acetais sintetizados utilizando Lipase de Pâncreas de Porco (LPP) como biocatalizador sob o ciclo de vida de *P. xylostella* (L. 1758) (Lepidoptera: Plutellidae).



Material e Métodos

Esta criação e os ensaios experimentais foram realizados em ambiente controlado, com temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $86\% \pm 10\%$ e foto período de 12 horas, no Laboratório de Interação Inseto-Planta (LIIP) localizado no campus da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Criação De *P. xylostella*

Os adultos de *P. xylostella* foram coletados em um local de plantio de couve, localizado no município de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil e foram reclusos em uma gaiola. Esta gaiola consistiu em um recipiente de plástico esterilizado com álcool 70%, contendo uma abertura lateral coberta com plástico filme, adequadamente preparado para fluxo de ar. Dentro desta gaiola foi depositado um disco de couve (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) sobre um disco de papel filtro, para a postura dos ovos.

Os adultos foram alimentados a cada 24 horas, por meio de uma abertura superior da gaiola, onde foi colocado um tampão feito de algodão umedecido em uma solução de mel diluído a 10%, esse algodão era renovado a cada dois dias.

Os discos com posturas eram transferidos diariamente para gaiolas de larvas, estas gaiolas plásticas, continham uma abertura localizada na parte superior do recipiente, coberta com voil para fluxo de ar. Dentro da gaiola haviam um papel toalha e duas folhas de couve sobrepostas, com a face abaxial virada uma para outra, previamente lavadas com hipoclorito de sódio a 2% e água corrente.

A manutenção das gaiolas foi realizada diariamente, onde as folhas inferiores de couve envelhecidas foram descartadas. As folhas superiores, bem como as larvas, foram transferidas para uma nova gaiola limpa, onde ficaram cobertas por uma folha de couve nova. Este procedimento ocorreu até as larvas atingirem a fase pupal.

Na sequência do ciclo, as pupas formadas foram recolhidas e armazenadas em ambiente refrigerado, quando atingiram uma quantidade considerável, foram transferidas para uma gaiola de adultos, dando início à um novo ciclo de vida (Figura 1).

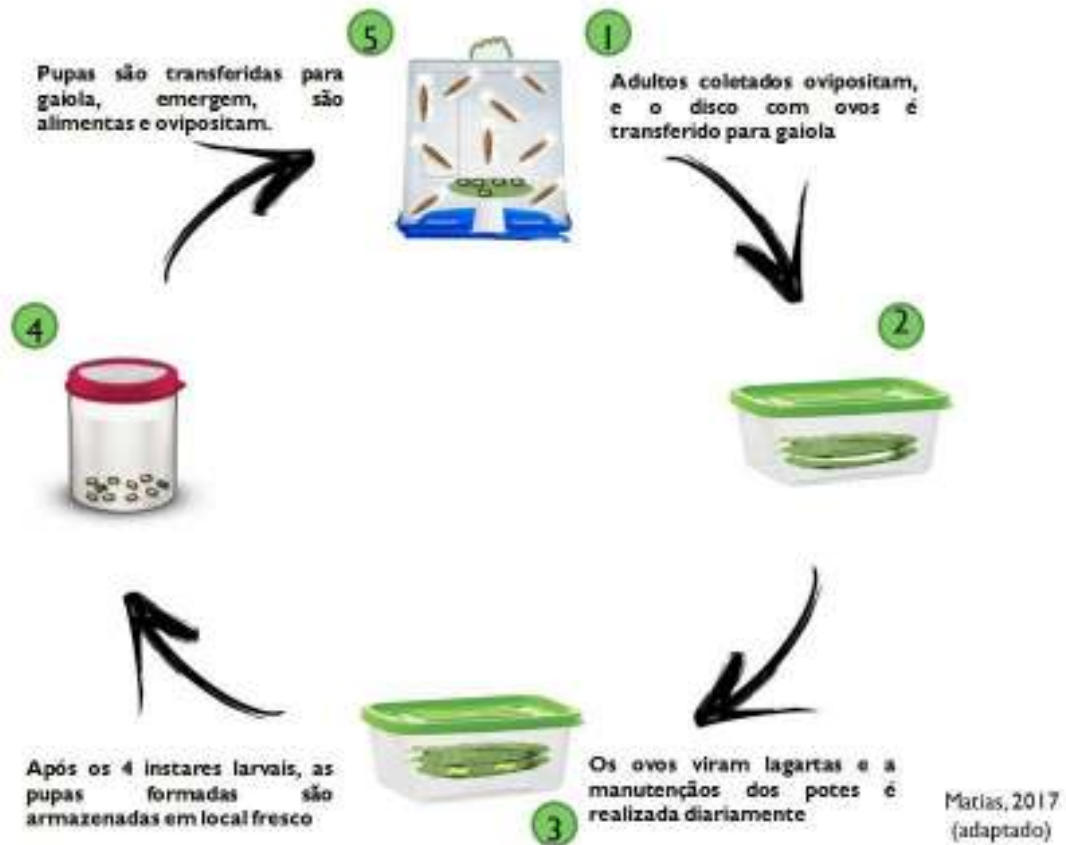


FIGURA 1. Esquema de criação de *Plutella xylostella*.

Obtenção Do Composto

Para a avaliação da bioatividade do composto, os extratos foram preparados por meio de uma diluição entre composto/água destilada (1mL de composto/99 mL de água). Os compostos testados foram: (Figura 2)

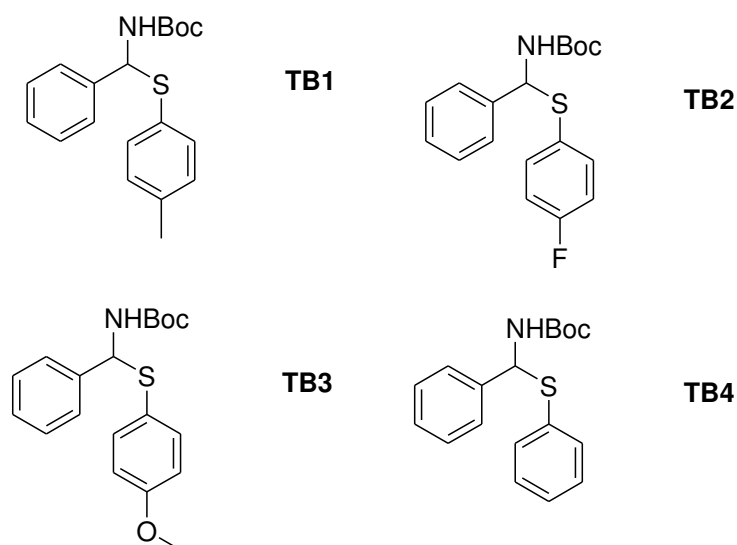


FIGURA 2. Fórmula estrutural dos compostos analisados N,S-acetais com grupamento metil (TB1), N,S-acetais com grupamento fluor (TB2), N,S-acetais com grupamento metoxi (TB3) e N,S-acetais com grupamento hidro (TB4).

A síntese dos compostos foi realizada por Albuquerque et al. (2018) conforme segue-se: Em um tubo de reação foi adicionado tiol (0,2 mmol), amidosulfonas (0,1 mmol), K_2CO_3 (0,5 mmol) e a enzima Lipase de Pâncreas de Porco (LPP) (0,01 g) em DME (4 mL) à temperatura ambiente. A reação foi agitada e monitorada por TLC (eluente: hexano / EtOAc, 90:10). Quando do consumo dos reagentes de partida, a enzima foi filtrada e a mistura foi extraída com DCM (3x10 mL). As fases orgânicas foram combinadas, secas com Na_2SO_4 anidro; filtradas e concentrada sob pressão reduzida. Os produtos foram purificados por cromatografia em coluna sobre sílica gel (eluente: hexano / EtOAc, 90:10).

Posteriormente, as folhas de couve com 4 cm de diâmetro foram imersas nos extratos aquosos por 5 minutos. O controle constituiu de discos imersos apenas em água destilada. Após imersão, os discos foram colocados sobre o papel filtro à temperatura ambiente para a retirada do excesso de umidade (Figura 3).

Os parâmetros biológicos avaliados foram: duração e viabilidade larval, duração, viabilidade e biomassa pupal, oviposição, viabilidade dos ovos e longevidade dos adultos.

Bioatividade Do Composto Sobre *P. xylostella*



Analise Estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamento e cinco repetições de cinco subamostras, totalizando 25 placas testes. Quando os dados não apresentaram normalidade, estes foram transformados: sobrevivência larval e pupal transformados para arcoseno da $\sqrt{x}/100$ e duração larval e pupal, longevidade de machos e fêmeas e o de fecundidade para $\sqrt{x} + 0,5$. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

As larvas que se alimentaram do composto TB3 apresentaram aproximadamente 5 dias de duração e diferiram estatisticamente do controle (7,26 dias), enquanto o tratamento TB4 apresentou maior duração larval (7,82 dias), mas não se diferiu do controle. Em relação a sobrevivência larval e duração pupal observa-se redução em todos os tratamentos com TB. A sobrevivência pupal reduziu em TB1 e TB3. Não observou-se diferença para biomassa pupal entre os tratamentos (Tabela 1).

Na fase adulta a longevidade de machos foi maior para o controle (macho $23,2 \pm 1,71$) e fêmeas em TB4 ($24,7 \pm 1,11$), os demais tratamentos não diferiram entre si.

Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos para o número de ovos produzidos, mas observou-se redução marcante na viabilidade em TB3 e TB4, que diferiram do controle.

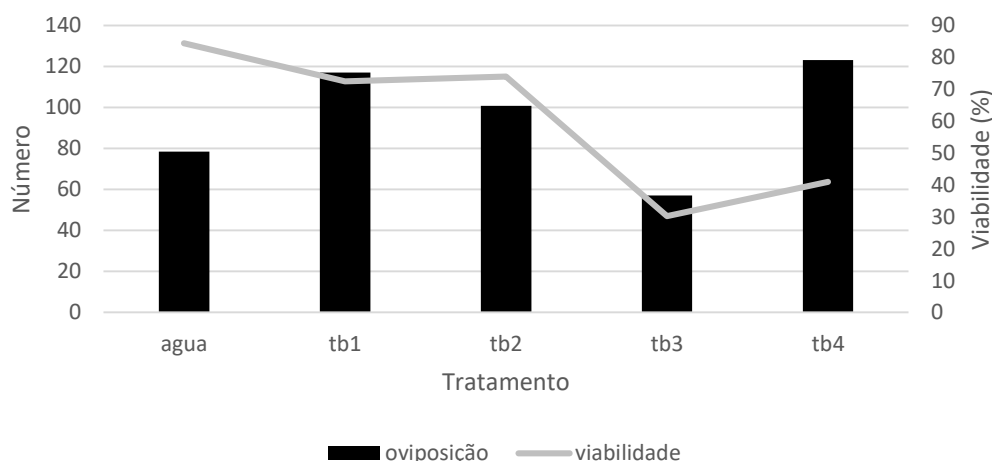


FIGURA 2. Número de ovos e viabilidade dos ovos de *Plutella xylostella* tratados com diferentes compostos.



A redução da fase larval é uma característica positiva para os compostos alternativos pois reduzem o tempo de vida do inseto no campo, como observado em TB3, levando em consideração que a fase larval é a única responsável pelo prejuízo. Por outro lado, o prolongamento na fase larval permite que o inseto fique em contato por mais tempo com o composto e dessa forma espera-se redução nas fases subsequentes como observado em TB4. O prolongamento da fase larval pode ser atribuído a um crescimento mais lento das larvas, devido à presença de inibidores de crescimento, deterrentes de alimentação ou substâncias tóxicas existentes nesses extratos, no qual, acarreta na redução da eficiência de conversão do alimento ingerido (TORRES et al. 2006; TANZUBIL e MC CAFFERY 1990). Todos os compostos analisados (TB1, TB2, TB3 e TB4) reduziram a sobrevivência larval e a duração pupal e percebe-se que de forma direta os compostos agiram impedindo que o inseto transformasse em pupa. De forma direta a sobrevivência pupal foi mais afetada por TB3.



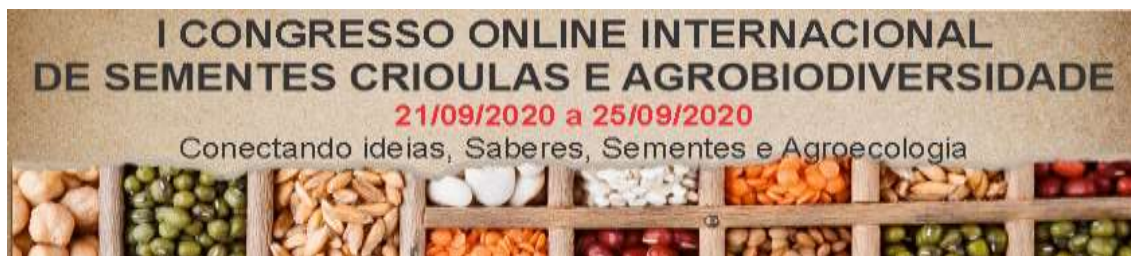
TABELA 1. Duração (dias) e sobrevivência (%) de larvas e pupas, biomassa pupal (mg) de *Plutella xylostella* L. tratadas com composto N,S-acetais ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; 86 ± 10 umidade relativa; 12h fotoperíodo).

	Duração larval (Dias)	Sobrevivência larval (%)	Duração pupal (Dias)	Sobrevivência pupal (%)	Biomassa pupal (mg)
Controle	$7,26 \pm 0,06$ a n= 25	$90,00 \pm 0,00$ a n= 25	$5,64 \pm 0,13$ a n= 25	$61,14 \pm 37,83$ a n= 22	$5,30 \pm 2,17$ a n= 22
TB1	$6,49 \pm 0,47$ ab n= 25	$56,53 \pm 14,73$ b n= 16	$3,07 \pm 0,43$ b n= 16	$41,31 \pm 7,50$ b n= 11	$1,80 \pm 0,45$ a n= 11
TB2	$5,90 \pm 0,52$ ab n= 25	$53,99 \pm 14,18$ b n= 16	$2,20 \pm 0,26$ b n= 16	$43,84 \pm 4,91$ ab n= 12	$2,4 \pm 0,38$ a n= 12
TB3	$4,97 \pm 0,74$ b n= 25	$39,00 \pm 6,34$ b n= 16	$2,20 \pm 0,35$ b n= 16	$34,16 \pm 4,91$ b n= 12	$1,2 \pm 0,19$ a n= 12



	n= 25	n= 10	n= 10	n= 8	n=8
<i>TB4</i>	7,82 ± 0,60 a	43,84 ± 10,22 b	3,40 ± 0,41 b	60,00 ± 0,00 ab	2,7 ± 0,57 a
	n= 25	n= 12	n= 12	n= 7	n= 7
C.V (%)	18,39	30,16	28,58	21,18	22,00

*Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si ao nível de significância a 5% de probabilidade quando comparadas pelo teste de Tukey. n=número de indivíduos.



A redução da sobrevivência pupal, ocorreu, provavelmente, devido a atuação de compostos inseticidas sobre tecidos e órgãos endócrinos, assim, uma vez introduzidos no corpo por meio do aparelho bucal, tais compostos provocam má formação no estágio pupal e não emergência de adultos (SUN et al. 2013; GUO et al. 2014). Outra explicação para os resultados encontrados pode ser devido ao forte efeito antialimentar dos compostos, mas a literatura consultada não traz nada a respeito. Com exposição prolongada, os insetos foram propelidos a comer mais pela fome, o que levou ao aumento da dose dos compostos, resultando no aumento da taxa de mortalidade no estágio posterior (FENG et al. 2008).

Os casais provenientes do tratamento TB3 apresentaram um menor número de ovos e a viabilidade desses foi reduzida. De forma geral espera-se dos compostos químicos a redução no número de indivíduos, o que foi observado para TB3 e TB4. O número de ovos inférteis, pode ser explicado pela quantidade e a qualidade dos nutrientes absorvidos durante a fase larval, pois podem influenciar o número de ovários por ovário e consequentemente reduzir a produção de ovos (COSTA et al. 2004).

Dessa forma, novos estudos devem ser conduzidos visando avaliar a toxicidade e a relação da estrutura/ atividade destes compostos ao longo do tempo considerando os resultados aqui encontrados.

Conclusão

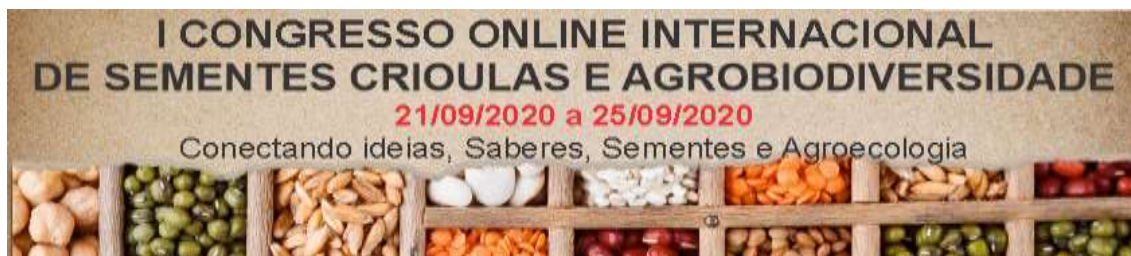
O fato de ocorrer a redução do número de ovos e consequentemente a diminuição do número de indivíduos nas próximas gerações é muito importante em campo, pois, com menor quantidade de larvas eclodindo, diminui os danos e prejuízos causados as culturas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento da Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo recurso fornecido pelo processo nº 71 / 711.130 / 2018.

Referências

ALBUQUERQUE, T. B.; DA SILVA, C. D. G.; DE OLIVEIRA, A. R.; DOS SANTOS, B. F.; DA SILVA, B. A. L.; KATLA, R.; DOMINGUES, N. L. C. Lipase catalyzed 1,2-



addition of thiols to imines under mild conditions. *New Journal of Chemistry*, v.42, n. 3, p.1642-1645, 2018.

BRANDÃO FILHO, J. U. T.; SANTOS, H. S.; MARAUS, P. F.; SANTOS, H. S. Controle químico da traça das crucíferas (*Plutella xylostella*) na cultura do repolho. *Horticultura Brasileira*, 28: 795-800.

CASTELO BRANCO, M.; MELO, C. A. 2002. Resistência a abamectin e cartap em populações de traça-das-crucíferas. *Horticultura Brasileira*, v.20, n.4, p. 541-543, 2010.

CHENG, E. Y. Problems of control of insecticide-resistant *Plutella xylostella*. *Pesticide Science*, v. 23, n.2, p.177-188, 1988.

COSTA, E. L. N.; SILVA, R. F. P.; FIUZA, L. M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. *Acta Biológica Leopoldensia*, v.26:, p.173-185, 2004.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, v.56: p.5- 51, 2001.

FENG, G.; ZHANG, J.; LI, X. W.; FENG, J. T.; ZHANG, X. Insecticidal activity of alkaloids from *Macleaya microcarpa* against several species of insect pests. *Journal of Zhejiang University Science B*, v.34, p.187–192, 2008.

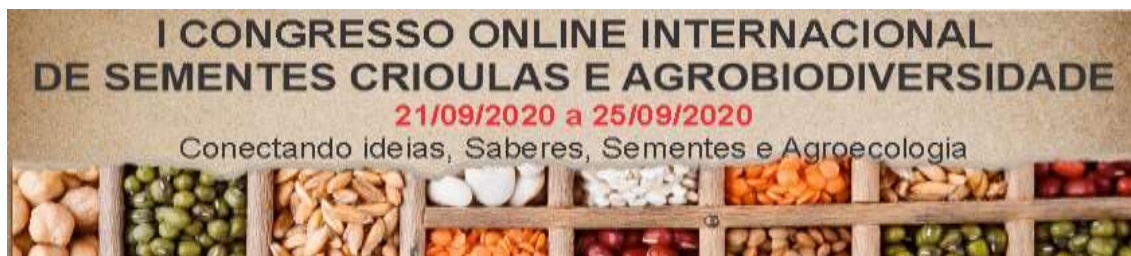
GRONDAL, C.; JEANTY, M.; ENDERS, D. Organocatalytic cascade reactions as a new tool in total synthesis. *Nature Chemistry*, v.2, p.167–178, 2010.

GUO, L.; LIANG, P.; ZHOU, X.; GAO, X. Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). *Scientific Reports*, v.4, p. 6924, 2014.

HAMILTON, A. J.; ENDERSBY, N. M.; RIDLAND, P. M.; ZHANG, J.; NEAL, M. Effects of cultivar on oviposition preference, larval feeding and development time of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), on some Brassica oleracea vegetables in Victoria. *Australian Journal of Entomology*, v.44, n;. 3, p. 284-287, 2005.

HASEEB, M.; LIU, T. X.; JONES, W. A. Effects of selected insecticides on *Cotesia plutellae*, endoparasitoid of *Plutella xylostella*. *BioControl*, v.49, n.1, p. 33-46, 2004.

IDRIS, A. B.; GRAFIUS, E. Effects of Wild and Cultivated Host Plants on Oviposition, Survival, and Development of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) and Its Parasitoid *Diadegma insulare* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Environmental Entomology*, v.25, n.4, p. 825-833, 1996.



LI, Q.; EIGENBRODE, S. D.; STRINGAM, G. R.; THIAGARAJAH, M. R. Feeding and growth of *Plutella xylostella* and *Spodoptera eridania* on *Brassica juncea* with varying glucosinolate concentrations and myrosinase activities. *Journal of Chemical Ecology*, v.26, p. 2401–2419, 2000.

MIYATA, T.; KAWAI, H.; SAITO, T. Insecticide resistance in the Diamondback Moth *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Applied Entomology and Zoology*, v. 17, p. 539-542, 1982

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIENER, A.; WUBBOLTS, M.; WITHOLT, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, v. 409, p. 258-268, 2001.

SHELTON, A. M. Management of the diamondback moth: déjà vu all over again. In: The management of diamondback moth and other crucifer pests. *Proceedings of the 4th International Workshop*, Nov. 2001, Melbourne, Australia, 3-8. 2004.

SUN, D.; LIU, Y.; QIN, L.; XU, J.; LI, F.; LIU, S. Competitive displacement between two invasive whiteflies: Insecticide application and host plant effects. *Bulletin of Entomological Research*, v. 103, n. 3, p. 344-353, 2013.

TALEKAR, N. S.; SHELTON, A. M. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*, v. 38, p. 275-301, 1993.

TANZUBIL, P. B.; McCAFFERRY, A. R. Effects of azadirachtin and aqueous neem seed extracts on survival, growth and development of the african armyworm, *Spodoptera exempta*. *Crop Protection*, v.9, p. 383-386, 1990.

TORRES, A. L.; BOIÇA JUNIOR, A. L.; MEDEIROS, C. A. M.; BARROS, R. Efeito de extratos aquosos de *Azadirachta indica*, *Melia azedarach* e *Aspidosperma pryrifolium* no desenvolvimento e oviposição de *Plutella xylostella*. *Bragantia*, v. 65, n.3, p. 447-457, 2006.

VICKERS, R. A.; FURLONG, M. J.; WHITE, A.; PELL, J. K. Initiation of fungal epizootics in diamondback moth populations within a large field cage: proof of concept of auto-dissemination. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, v.111, p. 7–17, 2004.

WARWICK, S. I.; FRANCIS, A.; MULLIGAN, G. A. *Brassicaceae of Canada. Agriculture and Agri-Food Canada*, Electronic publication. [http://www.cbif.gc.ca/spp_pages/brass/index_e.php]. 2003.

WITTSTOCK, U.; HALKIER, B. A. Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends in Plant Science*, v.7, n.6, p. 263–270, 2002.