

REVISIÓN

Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos

Por **Javier Vioque, Alfonso Clemente, Justo Pedroche, María del Mar Yust y Francisco Millán***

Instituto de la Grasa. Avda. Padre García Tejero, 4, 41012-Sevilla. SPAIN
e-mail: frmillan@cica.es

RESUMEN

Obtención y aplicaciones de hidrolizados protéicos.

Se ha realizado una revisión de la obtención de hidrolizados protéicos de origen vegetal para su uso en alimentación humana. Se describe en primer lugar cuales son los componentes y factores que intervienen en dicha hidrólisis. A continuación se realiza una descripción de los distintos tipos de hidrolizados producidos y sus aplicaciones: hidrolizados limitados (entre el 1% y el 10% de grado de hidrólisis) que son usados para mejorar las propiedades funcionales del alimento en cuestión; hidrolizados con grado de hidrólisis variable para ser usados como flavorizantes; por último, hidrolizados extensivos (con grado de hidrólisis superior al 10%) que pueden ser usados como suplemento proteico en la dieta o con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos.

PALABRAS-CLAVE: *Aplicaciones – Hidrolizado protéico – Obtención – Revisión (artículo).*

SUMMARY

Obtention and uses of protein hydrolysates.

A review on the obtention of plant protein hydrolysates for food use has been carried out. First, the components and factors that participate in the hydrolysis are described. Then a description of the different types of hydrolysates is done: limited hydrolysates (between 1% and 10% degree of hydrolysis) that are used to improve functional properties of foods; hydrolysates with variable degree of hydrolysis that are used as flavourings; by last, extensive hydrolysates (degree of hydrolysis above 10%) that are used as protein supplement in the diet or with a defined composition for the treatment of specific illness.

KEY-WORDS: *Obtention – Protein hydrolysate – Review (paper) – Uses.*

En España y en el mundo se generan una gran cantidad de residuos agroindustriales ricos en proteínas, entre los que se encuentra la harina desengrasada procedente de la extracción del aceite de las semillas. Esta harina es usada generalmente para la alimentación del ganado, sin embargo representa uno de los reservorios de proteínas con mayor potencial para la industria alimentaria humana (Altschul, 1974). El interés en el aprovechamiento de estas proteínas ha desarrollado los procesos de

obtención y mejora de las mismas mediante la generación de concentrados y aislados protéicos. Sin embargo, estos aislados presentan dos grandes limitaciones para su aplicación en la industria alimentaria como son su baja solubilidad y potencial alergenicidad. Estas razones, junto con la demanda de nuevos alimentos ha conducido en los últimos años al desarrollo de procesos de hidrólisis enzimática de aislados protéicos vegetales.

La esencia de la hidrólisis proteica es la rotura del enlace péptido y en consecuencia la generación de péptidos de menor tamaño o incluso de amino ácidos libres. La rotura de estos enlaces puede producirse por métodos químicos (con ácidos o bases) o biológicos (con enzimas). Hoy día apenas se utiliza la hidrólisis química debido a sus efectos perjudiciales sobre la calidad nutricional del hidrolizado, ya que se destruyen L-amino ácidos y se forman compuestos tóxicos como la Lisinoalanina. Por el contrario, la hidrólisis enzimática se realiza en condiciones más suaves de pH y temperatura que van a reducir la formación de compuestos indeseables (Gottschik, 1994, Flemming, 1989).

La propiedad fundamental de un hidrolizado, que va a determinar en gran medida las restantes características del mismo, es su grado de hidrólisis, es decir, el porcentaje de enlaces peptídicos rotos en relación a la proteína original. Existen diversos métodos para medir el grado de hidrólisis, siendo el más usado la titulación con TNBS (2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid) por su reproducibilidad y sencillez (Adler-Nissen, 1979). El grado de hidrólisis final va a estar determinado por las condiciones usadas, es decir, concentración de sustrato, relación enzima/sustrato, tiempo de incubación y condiciones físico-químicas como el pH y la temperatura. Otro factor que también va a determinar el grado de hidrólisis es la naturaleza de la actividad enzimática, es decir, su actividad específica y tipo de actividad (Teichgräber *et al.*, 1993, Poutanen, 1997). Así la naturaleza del enzima usado no solo va a influir en el grado de hidrólisis sino también en el tipo de péptidos producidos. En este sentido, las proteasas pueden dividirse en dos grandes grupos según su

actividad catalítica. Así, pueden ser endopeptidasas si rompen enlaces internos de la cadena proteica o exopeptidasas si hidrolizan el enlace terminal de la cadena. Dentro de las segundas a su vez se pueden dividir en aminopeptidasas si rompen por el extremo N-terminal o carboxipeptidasas si lo hacen por el extremo carboxilo. La especificidad de la proteasa también es variable en función de la secuencia aminoacídica. Por ejemplo, algunas cortan donde haya un aminoácido concreto, mientras que otras son menos específicas y reconocen varios aminoácidos. El origen de estos enzimas puede ser animal, vegetal, de bacterias u hongos, aunque las de origen bacteriano son las más abundantes en la industria de los hidrolizados proteicos dada la manejabilidad de estos organismos y los altos rendimientos de producción.

La hidrólisis de los aislados proteicos vegetales se realiza normalmente en un sistema discontinuo en un reactor, con agitación y control de pH y temperatura. Para finalizar la hidrólisis proteica el enzima puede ser inactivado con calor, mediante una bajada de pH o con una combinación de ambos. Por último, el enzima también puede ser retirado del medio mediante filtración.

TIPOS Y APLICACIONES DE HIDROLIZADOS PROTEICOS VEGETALES

Las características del hidrolizado que se obtenga vendrán determinadas evidentemente por el uso que se le quiera dar a este. Así, el grado y tipo de hidrólisis va a determinar el resto de las propiedades del hidrolizado. En este sentido, dependiendo de estos factores el hidrolizado tendrá una aplicación u otra.

Hoy día, los hidrolizados proteicos vegetales que se producen para su uso en alimentación se pueden agrupar en tres grandes grupos:

a) *Hidrolizados con bajo grado de hidrólisis, entre el 1 y el 10%, para la mejora de las propiedades funcionales.*

La hidrólisis proteica va a producir un incremento de la solubilidad, necesaria para la mejora de otras propiedades funcionales (Tschimirov *et al.*, 1983, Ponnampalam *et al.*, 1987, Soral-Smietana *et al.*, 1998). Otro factor que también va a influir en la funcionalidad de estos hidrolizados es la exposición de residuos hidrófobos de la proteína que estaban inmersos en el interior de la proteína intacta (Panyam *et al.*, 1996). En este sentido, se ha demostrado que una hidrólisis limitada mejora propiedades funcionales de la proteína original, además de la solubilidad, como poder emulsificante, espumante o absorción de agua o aceite (Krause *et al.*, 1995, Vioque *et al.*, 2000a). Así, hidrolizados con mejor poder espumante son usados en la producción de pasteles, pan, helados y postres (Chaplin *et al.*, 1989). Hidrolizados con buen poder emulsificante son usados en la fabri-

cación de mayonesas, carne picada, salchichas o helados (Turgeon *et al.*, 1992, Kim *et al.*, 1990, Süle, *et al.*, 1998). Por último hidrolizados con una buena absorción de aceite o agua son usados en derivados cárnicos y en productos bajos en grasas (Mannheim *et al.*, 1992).

b) *Hidrolizados con grado de hidrólisis variable para ser usados como flavorizantes.*

Otro tipo de hidrolizados son aquellos con un grado de hidrólisis variable, generalmente alto, para ser usados como flavorizantes. En este sentido, los hidrolizados según el sustrato usado y las condiciones de hidrólisis, también pueden aportar sabor y olor a los alimentos que se añadan. Tradicionalmente los hidrolizados usados como flavorizantes se han obtenido mediante la hidrólisis ácida de proteínas vegetales con HCl durante 4 a 24 horas y a temperaturas entre 100° y 125° C. Así, el grado de hidrólisis va a depender del tiempo, temperatura y concentración de ácido usada, todo lo cual va a influir en los atributos sensoriales del producto (Manley *et al.*, 1981). El flavor del producto va a depender de la cantidad y tipo de péptidos o aminoácidos liberados. Por ejemplo, el ácido glutámico funciona como un potenciador del sabor, o la glicina o alanina tienen un sabor dulce. Pero quizás el factor principal a la hora de determinar un flavor sea la interacción de estos aminoácidos o pequeños péptidos con otros componentes como azúcares o lípidos. Esta interacción puede producirse mediante reacciones de Maillard, generando compuestos secundarios volátiles responsables del olor y sabor del producto (Hsieh *et al.*, 1980). Reacciones de Maillard que se ven favorecidas también por el tratamiento con calor. La neutralización del producto con hidróxido sódico o carbonato sódico va a generar una cantidad de sal que es una parte substancial del producto final. Actualmente, el uso de estos hidrolizados obtenidos mediante tratamiento con ácidos está en desuso, por los componentes antinutricionales ya comentados que pueden generarse. Así, se está potenciando el uso de proteasas para la obtención de un hidrolizado extensivo que pueda ser usado en alimentación como flavorizante (Pommer, 1995).

c) *Hidrolizados extensivos, con grado de hidrólisis superior al 10%, para su uso en alimentación especializada.*

Estos hidrolizados están destinados a una alimentación especializada, bien como suplemento proteico o en dietas médicas (Clemente *et al.*, 1999a, Vioque *et al.*, 1999, Villanueva *et al.*, 1999). En este apartado entran los hidrolizados que buscan explotar o mejorar las características nutricionales de las proteínas de origen. Estos hidrolizados podrían dividirse a su vez en dos grandes grupos. Por un lado aquellos para ser usados como suplemento proteico en la dieta (Frokjaer 1994) y por el otro, hi-

drolizados con una composición definida para el tratamiento de enfermedades o síndromes específicos. En este último grupo se alcanza el máximo de especialización en lo que respecta al diseño del alimento ya que se obtiene un producto muy específico para un objetivo muy concreto (Lahl *et al.*, 1994).

Respecto al primer grupo, dos factores favorecen el uso de los hidrolizados como suplemento proteico. Desde un punto de vista funcional su elevada solubilidad que permite su utilización en alimentos líquidos y desde un punto de vista nutricional el hecho de que la absorción gastro intestinal de los pequeños péptidos que componen el hidrolizado, principalmente di y tripeptidos, parece ser más efectiva en comparación con las proteínas intactas o amino ácidos libres (Silk *et al.*, 1985, Meredith *et al.*, 1990).

Los sectores de la población a los que van dirigidos estos alimentos son diversos aunque, por diferentes razones, con necesidades todos ellos de un sobreaporte proteico (Periago *et al.*, 1998). Por ejemplo, podemos citar su uso en la alimentación de la tercera edad. En las personas ancianas se produce una pérdida de apetito, causada por diversas razones, como factores sociales o falta de ejercicio. Esta pérdida de apetito genera una malnutrición que está correlacionada directamente con un incremento de enfermedades y mortalidad. Para estas personas, comer más cantidad no es la solución idónea dada la falta de apetito, pero la demanda de proteínas necesarias podría cubrirse con bebidas enriquecidas con hidrolizados proteicos, ya que su ingesta es más atractiva que la de alimentos sólidos (Ovensen *et al.*, 1991a). En este apartado también podemos incluir la alimentación enteral y parenteral en casos de hospitalización. Otro campo de aplicación es en la nutrición deportiva, sobre todo en ejercicios de resistencia como ciclismo o fondo o aquellos que requieren un desarrollo muscular importante como halterofilia o incluso culturismo. En este sentido, bebidas refrescantes suplementadas con péptidos pueden tomarse durante el ejercicio o tras su finalización (Layman, 1987, Meredith *et al.*, 1989, Brouns, 1997). Por último, también tienen aplicación los hidrolizados para personas que estén a dieta. De esta manera se proporcionan al cuerpo adecuadas cantidades de proteínas con un mínimo de otras fuentes de calorías, de manera que se mantiene el balance de N y se reduce peso con la pérdida de grasas.

Respecto a las aplicaciones medicinales de los hidrolizados proteicos, sin duda la más conocida e importante por su impacto en nutrición haya sido la producción de hidrolizados hipoalergénicos. La alergia alimentaria es un problema al que no se le ha prestado mucha atención, a pesar de que en los últimos años son cada vez más las personas que se ven afectadas. Las consecuencias de una reacción alérgica pueden ir desde pequeños trastornos físicos hasta incluso la muerte por shock anafiláctico. Pero

hoy día no existe ninguna medicación para prevenir las alergias alimentarias. De hecho, evitar estos alimentos de manera estricta es la única forma de impedir la reacción contra ellos. Otra posibilidad es tomar dietas constituidas por hidrolizados proteicos hipoalergénicos (Mahmoud *et al.*, 1992, Hindi-Tame-likecht *et al.*, 1997, Pahud *et al.*, 1984, Watanabe 1993, Ovensen 1991b, Siememsma *et al.*, 1993, Clemente *et al.*, 1999b).

Hidrolizados proteicos con una composición definida también se han propuesto para el tratamiento de enfermedades o situaciones muy concretas. (Schmidl *et al.*, 1994). Por ejemplo, en el caso de errores metabólicos congénitos, como la fenilcetonuria o tirosinamia se proponen hidrolizados sin los amino ácidos aromáticos que estos enfermos no pueden metabolizar (Vioque *et al.*, 1999). En estados hipermetabólicos, como los procesos de cicatrización por cirugía o quemaduras se hace necesario un sobreaporte de amino ácidos azufrados que podrían ser proporcionados en forma de hidrolizados enriquecidos en estos amino ácidos (George *et al.*, 1997). En enfermedades hepáticas, como las encefalopatías, donde son necesarios alimentos con una alta razón de Fisher (ramificados/aromáticos), hidrolizados proteicos enriquecidos en Val, Leu e Ile y pobres en aromáticos también son apropiados (Yamashita *et al.*, 1979, Okita *et al.*, 1985, Bautista *et al.*, 1996). Finalmente, dada la buena solubilidad, digestibilidad y absorción intestinal de los hidrolizados extensivos, estos también son usados en enfermos con una actividad gastrointestinal deficiente, como en los casos con reducida superficie de absorción (enfermedad de crohn) (Teahon *et al.*, 1991, Kushner, 1992) o cuando la capacidad digestiva está reducida como en la fibrosis quística o en la pancreatitis (Farrel *et al.*, 1987, Milla *et al.*, 1983, Grant, 1981).

En conclusión, la producción de hidrolizados proteicos vegetales está recibiendo un gran impulso en los últimos años debido a la demanda de alimentos específicos y para el aprovechamiento de fuentes proteicas alternativas a las actuales de origen animal. En este sentido, en los próximos años se espera una generación de nuevos alimentos para aplicaciones muy concretas a partir de hidrolizados proteicos. Entre estos podemos destacar la producción de péptidos bioactivos con efectos fisiológicos directos, como actividades inmunomoduladoras o hipotensoras (Vioque *et al.*, 2000b). Todo ello se verá ayudado por el desarrollo de la biotecnología, donde se puede destacar la búsqueda de nuevas enzimas o los estudios sobre inmovilización enzimática.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado con cargo al proyecto ALI98-0766.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 1256-1262.
- Altschul, A.M. (1974) in *New Protein Foods*, vol. IA. Academic Press, New York.
- Bautista, J., Hernández-Pinzón, I., Alaiz, M., Parrado, J., y Millán, F. (1996). Low molecular weight sunflower protein hydrolysates with low concentration in aromatic amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 967-971.
- Brouns, F. (1997). Functional foods for athletes. *Trends in Food Sci. & Technol.* **8**, 358-363.
- Chaplin, L.C., y Andrew, A.T. (1989). Functional properties of peptides derived from casein proteolysis. *J. Dairy Res.* **56**, 544-552.
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., y Millán, F. (1999^a). Protein quality of chickpea protein hydrolysates. *Food Chem.* **67**, 269-274.
- Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., y Millán, F. (1999^b). Production of extensive chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates with reduced antigenic activity. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3776-3781.
- Farrel, P.M., Mischler, E.H., Sondel, S.A., y Palta, M. (1987). Predigested formula for infants with cystic fibrosis. *J. Am. Dietetic Assoc.* **87**, 1353-1356.
- Flemming, M. C. (1989). Enzyme technology versus engineering technology in the food industry. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**, 249-265.
- Frokjaer, S. (1994). Use of hydrolysates for protein supplementation. *Food Technol.* **48**, 86-88.
- George, S., Sivasankar, B., Jayaraman, K., y Vijayalakshmi, M.A. (1997). Production and separation of the methionine rich fraction from chick pea protein hydrolysate generated by proteases of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Process Biochemistry* **32**, 401-404.
- Gottschik, W. (1994). The use of enzymes in food production. *Food Technology Europe* **2**, 158-160.
- Grant, J.P. (1981). Nutritional support in acute pancreatitis. *ASPEN Update* **3**, 1-10.
- Hindi-Tamelihecht, F., Dauphin, C., Hamon, M., Grangaud, J.P., y Pradeau, D. (1997). Analytic and immunologic characterization of chickpea protein hydrolysates obtained by bromelain and a-chymotrypsin. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4758-4762.
- Hsieh, Y.-P.C., Pearson, A.M., Morton, I.D., y Magee, W.T. (1980). Some changes in the constituents upon heating a model meat flavour system. *J. Sci. Food Agric.* **31**, 943-949.
- Kim, S.Y., Park, P.S.W., y Rhee, K.C. (1990). Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* **38**: 651-656.
- Krause, J.P., y Schwenke, K.D. (1995). Changes in interfacial properties of legumin from faba beans (*Vicia faba* L.) by tryptic hydrolysis. *Nahrung* **39**, 396-405.
- Kushner, R.F. (1992). Should enteral nutrition be considered as primary therapy in acute Crohn's disease?. *Nutr. Rev.* **50**, 166-178.
- Lahl, W.J., y Braun, S.D. (1994). Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* **48**, 68-71.
- Layman, K.D. (1987). Energy and protein metabolism during exercise. *Cereal Foods World* **32**, 178-181.
- Mahmoud, M.I., Malone, W.T., y Cordle, C.T. (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* **57**, 1223-1229.
- Manley, C.H., McCann, J.S., y Swaine, R.L.Jr. (1981). In *The Quality of Foods and Beverages*. Eds. G. Charalambous and G. Inglett. Vol. 1. Academic Press, London.
- Mannheim, A., y Cheryan, M. (1992). Enzyme-modified proteins from corn gluten meal: preparation and functional properties. *JAOCS* **69**, 1163-1169.
- Meredith, J.W., Ditesheim, J.A., Zaloga, G. (1990). Visceral protein levels in trauma patients are greater with peptide diet than with intact protein diet. *J. Trauma* **30**, 825-828.
- Meredith, C.N., Zackin, M.J., Frontera, W.R., y Evans W.J. (1989). Dietary protein requirements and body protein metabolism in endurance-trained men. *J. Appl. Physiol* **66**, 2850-2856.
- Milla, P.J., Kilby, J., Rassan, U.B., Ersser, M.L., y Harrires, J.T. (1983). Small intestine absorption of amino acids and dipeptides in pancreatic insufficiency. *Gut* **24**, 818-824.
- Okita, M., Watanabe, A., y Nagashima, H. (1985). Nutritional treatment of liver cirrhosis by branched-chain amino acids-enriched nutrient mixture. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **31**, 291-303.
- Ovansen, L. (1991a). Palatability and intake of two commercial lipid diets in patients with poor appetite. *Eur. J. Clin. Nutr.* **45**, 273-275.
- Ovansen, L. (1991b). Control of food allergies using protein hydrolysates. *Food Technol.* **48**, 72-76.
- Pahud, J.J., y Schwarz, K. (1984). Research and development of infant formula with reduced allergic properties. *Ann. Allergy* **53**, 609-614.
- Panyam, D., y Kilara, A. (1996). Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Sci. & Technol.* **7**, 120-125.
- Periago, M. J., Vidal, V. L., Ros, G., Rincón, F., Martínez, C., y López G. (1998). Influence of enzymatic treatment on the nutritional and functional properties of pea flour. *Food Chem.* **63**, 71-78.
- Pommer, K. (1995). New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. *Cereal Foods World* **40**, 745-748.
- Ponnampalam, R., Goulet, G., Amiot, J., y Brisson, G.J. (1987). Some functional and nutritional properties of oat flours as affected by proteolysis. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 279-285.
- Poutanen, K. (1997). Enzymes: an important tool in the improvement of the quality of cereal foods. *Trends in Food Sci. Technol.* **8**, 300-306.
- Schmidl, M.K., Taylor, S.L., Nordlee, J.A. (1994). Use of hydrolysate-based products in special medical diets. *Food Technol.* **48**, 77-85.
- Siememsma, A.D., Weijer, W.J., y Bak, H.J. (1993). The importance of peptide lengths in hypoallergenic infant formulae. *Trends Food Sci. Technol.* **4**, 16-21.
- Silk, D.B.A., Grimble, G.K., y Rees, R.G. (1985). Protein digestion and aminoacid and peptide absorption. *Proc. Nutr. Soc.* **44**, 63-72.
- Soral-Smietana, M., Swigon, A., Amarowicz, R., y Sijtsma, L. (1998). The solubility of trypsin pea protein hydrolysates. *Nahrung* **42**, 217-218.
- Süle, E., Tömösközi, S., y Hajós, G. (1998). Functional properties of enzymatically modified plant proteins. *Nahrung* **42**, 242-244.
- Teahon, K., Smethurst, P., Pearson, M., Levi, A.J., y Bjarnason, I. (1991). The effect of elemental diet on intestinal permeability and inflammation in Crohn's disease. *Gastroenterology* **101**, 84-89.

- Teichgräber, P., Zache, U., y Knorr, D. (1993). Enzymes from germinating seeds – potential applications in food processing. *Trends in Food Sci. Technol.* **4**, 145-149.
- Tschimirov, J.I., Schwenke, K.D., Augustat, D., y Tolstoguzov, V.D. (1983). Functional properties of plant proteins. Part V. Influence of partial enzymatic hydrolysis on selected functional properties of wheat gluten. *Nahrung* **27**, 659-668.
- Turgeon, S.L., Gauthier, S.F., y Paquin, P. (1992). Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of Ph and ionic strength. *J. Food Sci.* **57**, 601-604, 634.
- Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Bautista, J. Y Millán, F. (1999). Production of an extensive sunflower protein hydrolysate by sequential hydrolysis with endo- and exo-protease. *Grasas y Aceites* **50**, 472-476.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., y Millán, F. (1999). Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *JAACS* **76**, 819-823.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., y Millán, F. (2000^a). Partially hydrolyzed rapeseed protein isolates with improved functional properties. *JAACS* **77**, en prensa.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., y Millán, F. (2000^b). Peptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, **51**, en prensa.
- Watanabe, M. (1993). Hypoallergenic rice as a physiologically functional food. *Trends Food Sci. Technol* **4**, 125-128.
- Yamashita, M., Arai, S., y Fujimaki, M. (1979). A low phenylalanine, high tyrosine plastein as an acceptable dietetic food. *J. Food Sci.* **41**, 1029-1032.

Recibido: Febrero 2000
Aceptado: Junio 2000