

Perfil de aminoácidos en dietas formuladas para la alimentación de peces, utilizando residuos del procesamiento industrial de crustáceos

¹Mary Andara, ¹Juan Arias, ¹Jean Belandría, ²Jhanna Brieva y ¹Willy Gómez.

¹ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. Estación Local el Lago. Laboratorio Control de Productos.

² Universidad Rafael Urdaneta. Escuela de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería.

E-mail: mandara.inia.zulia@gmail.com, jarias.inia.zulia@gmail.com, jbelandria.inia.zulia@gmail.com, jhanna1980@hotmail.com, wgozmez.inia.zulia@gmail.com

Recibido: 15-12-2015

Aceptado: 07-06-2016

Resumen

En la actualidad cerca de 300 especies de peces son cultivadas en el mundo para consumo humano; la mayor parte criados con dietas artificiales formuladas para atender de la forma más precisa y eficiente sus particulares exigencias de nutrientes. El presente estudio se realizó con el objetivo de determinar el perfil de aminoácidos de tres dietas alternativas en la alimentación de peces, utilizando como fuente proteica los residuos de crustáceos. Las dietas se formularon con un porcentaje teórico de proteína bruta (PB) de 30%. Los resultados muestran que el perfil de aminoácidos establecido en las dietas formuladas es una fuente de aminoácidos esenciales, los mayores niveles observados son histidina, triptófano y metionina. Para mejorar el valor nutritivo de una dieta formulada a base de residuos de crustáceos se deben incorporar otros ingredientes proteicos para cubrir los requerimientos de aminoácidos esenciales en el crecimiento de los peces de cultivo.

Palabras clave: dietas formuladas, residuos, perfil de aminoácidos, peces.

Amino acid profile formulated diets for fish feed, using industrial waste processing crustaceans.

Abstract

In actuality about 300 species of fish are grown in the world for human consumption; most raised on artificial diets formulated to meet the more accurate and efficient nutrient requirements of their particular form. The current study was carried out with the purpose of determine the amino acid profile of three alternative diets in the feeding of fish, using waste as a protein source crustaceans. Diets were formulated with a theoretical percentage of crude protein (CP) of 30%. Research shows that the amino acids profile established in diets formulated demonstrated that it is a source of essential amino acids, higher levels achieved are histidine, triptophane y metionine. To improve the nutritional value of a diet formulated from crustaceans waste should incorporate other protein ingredients to meet the requirements of essential amino acids in the growth of farmed fish.

Keywords: diets formulated, waste, amino acid profile, fish.

Introducción

Los organismos acuáticos como peces y crustáceos tienen altos requerimientos de proteína, consecuentemente para su alimentación se utilizan alimentos ricos en ese nutriente. La harina de pescado se ha utilizado tradicionalmente como el principal recurso, sin embargo, su alto costo y el incremento en la demanda de la creciente acuicultura, así como en la alimentación de organismos terrestres cultivados, han hecho que se dediquen esfuerzos para buscar fuentes alternas de proteína animal que sustituyan a la harina de pescado parcial o totalmente en la alimentación acuícola [1].

En Venezuela, la explotación e industrialización de los crustáceos (camarones y cangrejos), provenientes de las capturas artesanales y cosechas de cultivo de camarones, producen una importante cantidad de residuos que al ser aprovechados pueden constituir una excelente materia prima para la obtención de subproductos de gran interés a nivel industrial, estos contienen componentes extraordinariamente valiosos de naturaleza orgánica y de composición química definida tales como proteínas, carbohidratos y grasas, que pueden ser utilizados en la alimentación animal [2,3].

Las grandes cantidades de estos residuos unidos a su lenta capacidad de degradación, ha estimulado una gran actividad por los investigadores centrada en la determinación de los posibles usos de estas sustancias con una doble afinidad, por un lado la búsqueda de una explotación económicamente beneficiosa y por otro lado, la reducción del impacto ambiental [2].

En este sentido, la transformación de los residuos sólidos generan subproductos como harinas de cangrejo y camarón que pueden ser empleados como materia prima para la alimentación animal, especialmente de especies acuáticas ya que están enriquecidas con un alto contenido de proteínas y minerales, las cuales son atractivas a la hora de la formulación de dietas [2,3].

En nutrición acuícola, se utilizan variados ingredientes, tales como: harina de pescado, aceite de pescado, leguminosas, afrechillo de trigo y otros para la formulación de los alimentos balanceados; el valor nutricional de estos insumos depende de su composición en carbohidratos, grasas, vitaminas, minerales y de un nutriente muy importante, la proteína [4,5].

Es bien conocido, que la calidad proteica de un alimento está determinada fundamentalmente por el tipo y cantidad de aminoácidos que la forman. Los aminoácidos se clasifican en dos grupos, los esenciales (AAE) que son aquellos que no son capaces de ser sintetizados por el organismo y que deben ser aportados por la alimentación. Y los no esenciales (AANE) los cuales pueden ser sintetizados en el organismo a partir, de una fuente de carbono adecuado y de los grupos amino proveniente de otros aminoácidos y de compuestos simples, como el citrato de amonio por lo que no necesitan ser suministrado en la dieta [6,7].

En términos generales, en la formulación de dietas para peces es necesario que se tomen en cuenta los requerimientos cuantitativos de cada uno de los aminoácidos esenciales (AAE) [7,8]. Así mismo, es fundamental que todos los aminoácidos estén disponibles en cantidades y proporciones requeridas por el animal [8,9]. Ellos no solo son importantes como unidades para la formación de proteínas, sino que contribuyen directamente al sabor de los alimentos [2] y son precursores de los componentes aromáticos y las sustancias coloreadas que se forman mediante las reacciones térmicas y/o enzimáticas que ocurren durante la obtención, preparación y almacenamiento de los productos alimenticios [2,3].

En el presente trabajo se evaluaron los perfiles de aminoácidos de tres dietas para la alimentación de peces, elaboradas utilizando como fuente proteica los residuos sólidos generados del procesamiento industrial de crustáceos. Para ello, se transformaron los residuos en harinas de cangrejo y camarón, se formularon tres dietas y se caracterizaron nutricionalmente (perfil de aminoácidos), para observar el aprovechamiento que puede tener estos subproductos en la alimentación de especies acuáticas.

Materiales y Métodos.

Obtención de la materia prima

Para la obtención de la materia prima, se utilizaron dos plantas procesadoras de crustáceos donde se recolectaron los residuos, ambas plantas se encuentran ubicadas en el Municipio San Francisco del Estado Zulia, una correspondiente a camarón y la otra de cangrejo.

Una vez concluidos los procesos, se procedió a la toma de muestra de los diferentes tipos de residuos sólidos (abdomen de cangrejo y cabeza de camarón). Los residuos fueron trasladados en bolsas plásticas y transportadas en cavas con hielo para su conservación hasta el Laboratorio Control de productos del INIA, Estación Local el Lago.

Elaboración de las harinas de crustáceos

Los residuos se pesaron y se distribuyeron uniformemente en bandejas donde se colocaron en estufas para ser sometidos al proceso de secado a una temperatura entre 60 a 70 °C por período de 24 a 72 horas dependiendo del tipo de residuo. Una vez secadas las muestras se pesaron nuevamente para medir el rendimiento y conocer la cantidad de producto obtenido. Luego, se procedió a la molienda, utilizando un molino manual hasta la obtención de harinas, posteriormente se pasaron a través de un tamiz de 0,18 µm y se almacenaron a temperaturas entre 1 a 4 °C.

Formulación de las dietas

La formulación de las dietas se realizó con el programa SOLVER utilizando la hoja de cálculo de la WUFFDA versión 1 [10].

Preparación de la dietas

Las dietas experimentales fueron preparadas utilizando residuos de cabezas de camarón (Dieta A), abdomen de cangrejo (Dieta B) y una mezcla de ambas (Dieta C), con una composición final de 30% de proteína cruda, y utilizando harina de maíz y harina de yuca. Estas dietas se constituyeron por aceite vegetal, sal, vitaminas y minerales (Tabla 1).

La elaboración de las dietas se llevo a cabo, mezclando los ingredientes, previamente humedecidas con 30% de agua en un molino de carne, con un disco de orificios de 3mm. Los pellets fueron secados en una estufa a 60°C durante 24-48 horas, hasta alcanzar una humedad de 10% en el alimento.

Análisis Proximal

Los análisis de cada dieta experimental se realizo de acuerdo a la metodologías: proteína (N x 6,25) por el método Kjeldahl (AOAC, 1990). El análisis de Fibra cruda y cenizas se realizo según Covenin. Para la determinación de lípidos (grasa cruda) se empleo la metodología propuesta por Randall, 1972 [11,12].

La energía contenida, en cada dieta experimental, fue determinada como energía digestible calculada (ED Kcal/g) según los valores reportados por Pezzato y col., 2001, para carbohidratos, lípidos y proteínas, siendo respectivamente 3 Kcal/g, 8 Kcal/g, y 4.25 Kcal/g [13].

Tabla 1. Composición de las dietas formuladas, para la alimentación de peces.

Ingrediente (%)	Dieta		
	A	B	C
Residuo de Camarón	59	---	35
Residuo de Cangrejo	--	70	35
Harina de Maíz	28	16	15
Harina de yuca	8	10	10
Aceite de Soya	1	1	1
Premixvit/min ¹	1,5	1,5	1,5
CMC ²	2,5	2,5	2,5
Composición proximal			
Proteína %	32	28,81	32,08
Grasa %	1,96	2,17	2,33
Energía ³ (Kcal/g).	3,013	3,012	2,994

1Premezcla de vitaminas y minerales. 2Carboximetil celulosa. 3Energía Calculada (Kcal/100 g)

Determinación del perfil de aminoácidos

Para el análisis del contenido de aminoácidos se utilizó un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, siglas en inglés), marca Agilent modelo 1100, equipado con un desgasificador de solvente en línea (G-1322A serial JP0324400), una bomba cuaternaria (G-1311A serial DE03010736), un auto inyector con un loop de inyección de 20 µL (G1313A serial DE03012753 marca Rheodyne, USA), un compartimiento de columna con horno incorporado (G1316A serial DE03016415) y un detector de fluorescencia (G1321A serial DE043002775), controlado a través del sistema Chemstation suministrado por Agilent Technology, para el procesamiento de los datos cromatográficos.

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Los solventes empleados para la preparación de las fases móviles son grado HPLC.

Las soluciones estándar de aminoácidos (ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), histidina (His), glicina (Gli), alanina (Ala), arginina (Arg), tirosina (Tir), valina (Val), metionina (Met), triptófano (Tript), fenilalanina (Fen), isoleucina (Isol) y lisina (Lis) se disolvieron y diluyeron en 0,1 N de ácido clorhídrico (HCl) para obtener diferentes concentraciones para la elaboración de las curvas de calibración. La cuantificación se obtuvo por el método de estándar interno utilizando norvalina a una concentración de 0,05 pmol/µL.

La aplicación del estándar interno se empleó en la misma proporción tanto a las muestras antes del proceso de hidrólisis como a las soluciones estándar. Todas las muestras y patrones se analizaron por triplicado.

Para el análisis, las muestras se hidrolizaron tomando 100 mg del alimento, adicionando 10 mL de ácido clorhídrico (HCl) 6 N por período de 22 horas en reflujo a 110 °C. Seguidamente, se ajustó el pH 2,2 con el buffer de citrato de 0,02 N. Luego, se aforó a 100 mL con el mismo buffer. Se tomó una alícuota de 10 mL donde se filtró a través de un filtro millipore de 0,45 µm. Los aminoácidos liberados con excepción de la metionina y triptófano son derivatizados y analizados por HPLC con el detector de fluorescencia con excitación a 340 nm y emisión a 450 nm y a los 14,5 min a 266 nm y 305 nm, respectivamente [2].

Con los datos de los valores del perfil de aminoácidos de las dietas analizadas por HPLC y del valor de referencia, fue calculado el score químico (SQ): $SQ=100 \times AAED/AEER$ donde se relaciona el contenido de aminoácidos esenciales de la dieta (AAED) y el contenido de aminoácidos esenciales requeridos (AEER) para juveniles de *P. mesopotamicus* utilizado como valores de referencia [14].

Resultados y Discusión

En la tabla 2 se puede observar el perfil de aminoácidos de las dietas elaboradas a base de residuos de crustáceos; Dieta A (Residuos de Camarón), Dieta B (Residuos de Cangrejo) y Dieta C (Residuos de camarón y cangrejo 50:50). Los valores se encontraron comprendidos entre 0,10 % ± 0,0006 (Triptófano) en la dieta C y 4,20 % ± 0,007 (Treonina) en la dieta A.

Otros de los aminoácidos en mayor proporción fueron la Serina (2,67 % ± 0,124 en la dieta A y 2,67 % ± 0,268, dieta C), y la Lisina (2,57 % ± 0,014) en la dieta A.

Tabla 2.- Perfil de Aminoácidos en las dietas formuladas.

Aminoácidos	Dieta A	Dieta B	Dieta C
	% en la Dieta	% en la Dieta	% en la Dieta
Ac. Aspártico	1,02 ± 0,007	1,01 ± 0,006	1,02 ± 0,0001
Ac. Glutámico	---	---	---
Serina	2,67 ± 0,124	1,57 ± 0,045	2,67 ± 0,268
Histidina	1,50 ± 0,027	1,45 ± 0,010	1,85 ± 0,020
Glicina	0,20 ± 0,005	0,18 ± 0,001	0,24 ± 0,0004
Treonina	4,20 ± 0,007	3,79 ± 0,033	4,15 ± 0,003
Alanina	0,55 ± 0,006	0,52 ± 0,001	0,64 ± 0,006
Arginina	0,92 ± 0,014	0,92 ± 0,006	1,10 ± 0,014
Tirosina	2,30 ± 0,027	1,64 ± 0,001	2,26 ± 0,020
Valina	0,56 ± 0,006	0,43 ± 0,0005	0,59 ± 0,0002
Metionina	1,31 ± 0,009	0,37 ± 0,001	1,41 ± 0,0121
Triptófano	0,11 ± 0,0005	1,39 ± 0,002	0,10 ± 0,0006
Cistina-Cisteína	---	---	---
Fenilalanina	0,98 ± 0,008	0,74 ± 0,0009	1,04 ± 0,0010
Isoleucina	0,79 ± 0,002	0,65 ± 0,004	0,87 ± 0,0006
Leucina	1,32 ± 0,0001	1,03 ± 0,003	1,33 ± 0,0062
Lisina	2,57 ± 0,014	0,68 ± 0,025	1,06 ± 0,0071

En las figuras 1 y 2, se muestra la comparación de la separación cromatográfica de los derivados de aminoácidos para la dieta C y una solución estándar de la mezcla de aminoácidos.

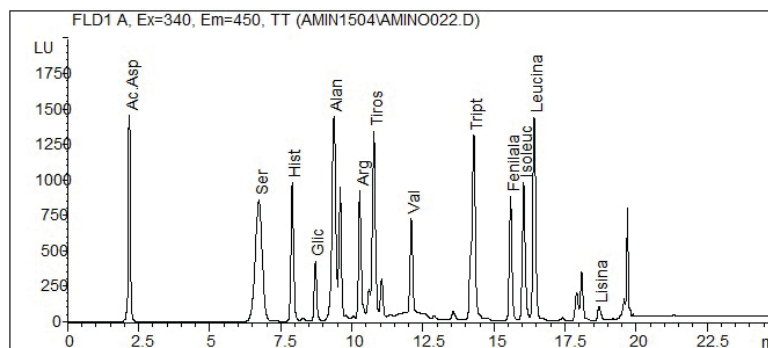


Fig. 1 Cromatograma del perfil de aminoácidos de la dieta C (a base de residuos de camarón y cangrejo 50:50).

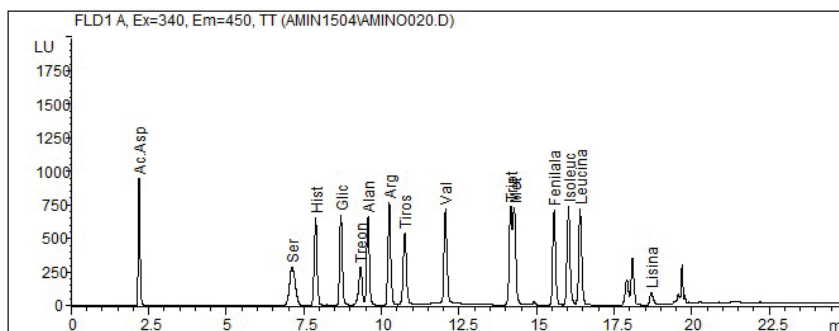


Fig. 2 Cromatograma de la mezcla de estándar de Aminoácidos 80 pmol/uL

En la tabla 3 se observa el contenido de aminoácidos esenciales, en las tres dietas formuladas, así como los respectivos score químico calculados en base a los valores de aminoácidos de referencia. La mayoría de los aminoácidos esenciales presentaron valores bajos (<100) en las tres dietas experimentales.

Tabla 3.- Contenido de Aminoácidos esenciales en las dietas y su score químico

Dieta	Arg	His	Isoleu	Leu	Lis	Tript	Val	Met	Fen
A	0,92	1,5	0,79	1,32	2,57	0,11	0,56	1,31	0,98
B	0,92	1,45	0,65	1,03	0,68	0,39	0,43	0,37	0,74
C	1,1	1,85	0,87	1,33	1,06	0,1	0,59	1,41	1,04
Referencia	1,24	0,47	0,78	1,56	1,77	0,16	0,86	0,41	0,8
SQ Dieta A	74,19	319,15	101,28	84,62	145,20	68,75	65,12	319,51	122,50
SQ Dieta B	74,19	308,51	83,33	66,03	38,42	243,75	50,00	90,24	92,50
SQ Dieta C	88,71	393,62	111,54	85,26	59,89	62,50	68,60	343,90	130,00

Score químico (SQ): $SQ=100 \times AAED/AEER$, donde: (AAED) es el contenido de aminoácidos esenciales de la dieta y (AEER) el contenido de aminoácidos esenciales requeridos.

La dieta A fue deficiente de Arginina, Leucina, Triptófano y Valina, ya que los valores arrojados fueron 74,19; 84,62; 68,75 y 65,12 respectivamente. En la dieta B se observaron deficiencia de Arginina, Isoleucina, Lisina, Valina, Metionina y Fenilalanina, donde los valores obtenidos fueron 74,19; 83,33; 66,03; 38,42; 50,00; 90,24 y 92,50 respectivamente. La dieta C fue deficiente en Arginina, Leucina, Lisina, Triptófano y Valina donde los valores obtenidos fueron 88,71; 85,26; 59,89; 62,50 y 68,60 respectivamente.

Según Peres y Oliva-Teles [15], para mejorar la utilización de proteína y reducir la excreción de amonio, las dietas formuladas deben contener un perfil óptimo de aminoácidos esenciales.

Las dietas estudiadas no cubren el perfil de aminoácidos esenciales requeridos para el crecimiento óptimo de los peces. La dieta que obtuvo mejores valores de score químico fue la A, la cual fue formulada a base de harina de cabezas de camarón mostrando deficiencia solo en 4 aminoácidos esenciales. La Dieta B presentó mayores deficiencias con 6 aminoácidos esenciales. La insuficiencia en la dieta de uno o más aminoácidos esenciales causa reducción del crecimiento y utilización deficiente de los demás nutrientes [14, 15,16].

En general entre más se aproxime el perfil de aminoácidos esenciales de la dieta a los requerimientos dietéticos de la especie estudiada, mayor será su valor nutricional [16,17]. Un valor de score químico

de 100 indica que el nivel de algún aminoácido esencial en particular presente en el alimento proteínico es idéntico al nivel de ese aminoácido requerido por la especie [16, 17,18]. En este trabajo se tomo como referencia los valores reportados para juveniles de *P. mesopotamicus* que es una especie cultivada en ambiente tropical y puede ser adaptado a las especies de nuestro país.

La deficiencia de Arginina provoca una reducción del crecimiento y la retención de nitrógeno [23]. Sin embargo el metabolismo de Glutamato puede cubrir cerca del 33% de los requerimientos de Arginina en peces [24], lo que indica que usando ingredientes moderadamente deficientes de Arginina pero con niveles adecuados de Glutamato en la dieta no se afectaría el desarrollo de los peces.

Conclusiones

Todas las dietas fueron deficientes en Arginina, Leucina y Valina. La dieta que mostró mejor contenido de aminoácidos fue la C, ya que presentó menor deficiencia de aminoácidos esenciales. Para mejorar el valor nutritivo de una dieta formulada a base de residuos de crustáceos se deben incorporar otros ingredientes proteicos para cubrir los requerimientos de aminoácidos esenciales para el crecimiento de los peces de cultivo.

Referencias Bibliográficas

1. Morillo M., Visbal T., Rial L., Ovalles F., Aguirre P., Medina A., Alimentación de alevines de *Colossoma macropomum* con dietas a base de *Erythrina edulis* y soya. *Interciencia*, Vol. 8, N° 2, (2013), 121-127.
2. Belandria, J., Perfil de Aminoácidos y contenido de pigmentos en las harinas de residuos de camarón. *Zootecnia Tropical*, Vol. 31, N° 1, (2013), 24-34.
3. Morillo N., Montiel N., Belandria J., Mujica F., Caracterización Proximal de los desechos del procesamiento de crustáceos (cangrejo y camarón), en el estado Zulia. *Veterinaria Tropical*, Vol. 31, N° 2, (2006), 71-83.
4. Delgado M., Delgado A. Estudio Bromatológico para determinar la calidad de la harina de pescado en la nutrición del camarón *Litopenaus vannamei*, en la planta procesadora de Uriza C.A, ubicada en Manta provincia de Manabi. Tesis de grado, Universidad Laica “Eloy Alfaro”, Facultad de Ciencias del Mar, Especialidad Biología Pesquera. (2011). 210 pag.
5. Noel W., Formulación y elaboración de dietas para peces y crustáceos. Tesis de grado, Universidad Nacional Jorge Basadre, Facultad de Ingeniería Pesquera, Tacna, Perú. (2003).180 pag.
6. FAO. 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Pesca y Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. 251pp. Roma.
7. Tacon, G. y De Silva, S.; 1997. Feed preparation and feed management strategies with in semi-intensive fish farming systems in the tropics. *Aquaculture* 151, 379–404.
8. Morillo M., Visbal T., Rial L., Ovalles F., Altuve D., Medina A. Valoración de dietas para alevines de *Colossoma macropomum* utilizando como fuentes proteicas harinas: de lombriz (*Eisenia foetida*), soya (*Glycine max*) y caraotas (*Phaseolus vulgaris*). *Revista Chilena de Nutrición*, Vol. 40, N° 2, (2013), 142-153.
9. Villarreal D., Determinación de la digestibilidad aparente de aminoácidos de ingredientes utilizados en alimentos comerciales para camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en Mexico. Tesis de grado, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, (2011).120 pag.
10. Wuffda. 2002. Formulación de Raciones amigables. Georgia University. Versión 0.2.

11. A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemist. 1997. Official Methods of Analysis. 16 TH ed. Pub. B y AOAC, Washington, D. C. 13, 44.
12. Randall, E. 1972. Improved method for fat and oil analysis by a new process of extraction. J. A.O.A.C., 57(5), 1165-1168.
13. Pezzato, L., Castagnolli, N y Rossi, F. Nutrición y Alimentación de peces. Manual, 2001. No. 295. Serie de Acuicultura. Centro de Producciones Técnicas. Vicoso – MG. 72 pp.
14. Abimorad, E.G., Favero, G.C., Castellani, D., Garcia, F., Carneiro, D.J. Dietary supplementation of lysine and/or methionine on performance, nitrogen retention and excretion in pacu *Piaractus mesopotamicus* reared in cages. *Aquaculture*, vol.295, (2010), 266-270.
15. Peres, H., Oliva-Teles, A. The optimum dietary essential amino acid profile for gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *Aquaculture*, vol 296, (2009), 81-86.
16. Abimorad, E.G. y D. Castellani. Exigências nutricionais de aminoácidos para o lambari-do-rabo-amarelo baseadas na composição da carcaça e do músculo. *Bol. Inst. Pesca* vol. 37(1), (2012), 31-38.
17. Abidi, S.F.; Khan, M.A. Dietary leucine requirement of fingerling Indian major carp, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquaculture Research*, v.38, (2007), 478-486.
18. Gurere, R.; Atkinson, J.; Moccia, R.D. Amino acid composition of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) and the prediction of dietary requirements for essential amino acids. *Aquaculture Nutrition*, v.13, (2007), 266-272.
19. Peres, H., Oliva-Teles, A. Effect of the dietary essential to non essential amino acid ratio on growth, feed utilization and nitrogen metabolism of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, v.256, (2006), 395-402.
20. Conceição, L.E.C., C. Aragão, J. Dias, B. Costas, G. Terova, C. Martins & L. Tort. Dietary nitrogen and fish welfare. *Fish Physiol. Biochem.*, vol 38 (1), (2012), 119-141.
21. Peres, H. y A. Oliva-Teles. Lysine requirement and efficiency of lysine utilization in turbot (*Scophthalmus maximus*) juveniles. *Aquaculture*, vol. 257, (2008) 283-290.
22. Bicudo, A.J.A. y J.E.P. Cyrino. Estimating amino acid requirement of Brazilian freshwater fish from muscle amino acid profile. *J. World Aquacult. Soc.*, 40(6): (2009) 818-823.
23. Ruchimat, T.; Masumoto, T.; Yoshiaki, I.; Shimeno, S. Quantitative arginine requirement of juvenile yellow tail (*Seriola quinqueradiata*). *Fisheries Science* 64: (1998) 348-349.
24. Buentello, J.A.; Gatlin III, D.M.. The dietary arginine requirement of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) is influenced by endogenous synthesis of arginine from glutamic acid. *Aquaculture* 188: (2000) 311-321.