

RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y SENSORIALES EN JAMÓN DE CERDO DURANTE EL PROCESO DE COCCIÓN Y TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY RELATION OF PORK HAM TO THE COOKING AND STORAGE TEMPERATURES

María I. GONZÁLEZ H. ^{1*}, Héctor SUÁREZ M. ², Olga L. MARTÍNEZ A. ³

Recibido: Septiembre 15 de 2008 Aceptado: Junio 03 de 2009

RESUMEN

El presente estudio correlaciona el análisis fisicoquímico, sensorial y de textura de un jamón de cerdo, en función del proceso de cocción y la temperatura de almacenamiento. Se practican seis tratamientos, utilizando tres temperaturas internas de cocción (72, 75 y 78°C) y dos temperaturas de almacenamiento (4 y 8°C). Adicionalmente se efectúa un tratamiento definido como patrón absoluto, cocido hasta alcanzar una temperatura interna de 72°C, sin tiempo de retención en cocción y con una temperatura de almacenamiento de 4°C y un patrón relativo, elaborado bajo las mismas condiciones que el patrón absoluto pero almacenado a 0°C. Fue utilizado el Análisis de Componentes Principales (ACP), para evaluar la relación entre los factores y las variables de respuesta. Los resultados muestran correlación inversa entre la adhesividad y la dureza. A medida que aumenta la sinéresis en el producto, se incrementan la adhesividad y la dureza instrumental. La sinéresis presentó cambios durante el almacenamiento, excepto para el patrón absoluto. Se encuentra una relación inversa entre el tiempo de almacenamiento y la dureza instrumental, excepto para el patrón absoluto y el tratamiento a 75°C, cinco minutos de retención y 4°C de almacenamiento. Los valores de pH son estables durante el tiempo de almacenamiento.

Palabras clave: jamón, correlación, dureza, adhesividad.

ABSTRACT

The present study correlates the physical-chemical, sensorial and textural analysis of pork ham as a function with the cooking process and storage temperature. Six trial tests are performed, each one has a different internal cooking temperature (72, 75 and 78°C) and two storage temperature (4 and 8°C). Additionally, a defined treatment is performed as absolute pattern, cooked until reaching internal temperature of 72°C, without cooking retention time, which is stored at a temperature of 4°C and a relative pattern elaborated under the same conditions of the absolute pattern but stored at 0°C. A principal component analysis (PCA) is applied to evaluate the relationship between the factors and answer variables. The results show an inverse correlation between adhesiveness and hardness. As syneresis rise in the product, the adhesiveness and instrumental hardness increase as well. Syneresis presents changes during the storage time except in the absolute pattern. There is an inverse relationship between the storage time and the instrumental hardness, except in the absolute pattern, and treatment at 75°C, with five minutes of retention time and storage of 4°C. The pH values are stable during storage time.

Key words: ham, correlation, hardness, adhesiveness.

1 Centro de Investigación y Desarrollo. Industria de Alimentos Zenú. Cra 64C No. 104-3. Medellín, Colombia.

2 Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Calle 56A No.63-20. Medellín, Colombia.

3 Departamento de Alimentos. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Calle 67 No. 53-108. Medellín, Colombia.

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: mgonzalez@zenu.com.co

INTRODUCCIÓN

El jamón de cerdo es un producto cárnico procesado, de gran popularidad en el mercado colombiano. Las cifras para el año 2007 presentan una producción aproximada de 6.872 toneladas (1). Su calidad está influenciada por muchos factores, algunos de ellos son, tecnológico, condiciones de almacenamiento, tipo de corte, composición de la salmuera inyectada, masajeo, tiempo y temperatura de cocción (2). La calidad también puede ser juzgada por varias características sensoriales, como apariencia, textura, sabor etc; sin embargo, es razonable asumir que existen algunas relaciones entre constituyentes químicos (agua, proteína, grasa, sal y minerales) y atributos físicos (terneza, dureza, jugosidad, cohesividad, gomosidad, elasticidad adhesividad) (3). Las características fisicoquímicas más deseables en el jamón son la cohesividad, la firmeza y la jugosidad (4).

La textura es uno de los principales atributos sensoriales; en jamón cocido se ve afectada por constituyentes como tejido conectivo, humedad y estructura de la emulsión, que modifican los atributos sensoriales. Otros estudios reportan la excesiva blandura en jamón cocido como uno de los principales problemas de textura (5). En este sentido, el análisis de perfil de textura (TPA) es una prueba instrumental imitativa, usada para la evaluación de la textura en alimentos y frecuente en la valoración de jamón cocido (6).

De otra parte, la temperatura de cocción es un factor que determina la calidad del jamón cocido; altas temperaturas pueden acortar el tiempo de cocción y el tiempo de procesamiento, pero también pueden producir pérdida de la calidad textural (7). Diferentes temperaturas finales tienen efectos sobre la textura de estos productos. Este incremento en la temperatura final está asociado con el aumento de pérdidas por humedad, la concentración de lípidos, proteína y ciertos ácidos grasos, así como la disminución de la jugosidad, el color rosado y sabores metálicos (8).

Diversos trabajos centran la evaluación del jamón cocido solamente en condiciones específicas, pero no en la evaluación de parámetros de calidad utilizando medios instrumentales, sensoriales y fisicoquímicos combinados (9). En este sentido es posible medir varios parámetros, pero estos no siempre reflejan las condiciones reales; sin embargo, es mejor reducir el número de parámetros y

disminuir la influencia sobre la calidad del jamón cocido.

El análisis de los parámetros evaluados requiere herramientas estadísticas como el Análisis de Componentes Principales (ACP), que permite determinar la correlación entre variables, conservando la mayor variabilidad original entre los datos. De esta forma, una máxima variabilidad en los datos puede ser explicada por un reducido número de variables. El componente principal es definido en la dirección de la máxima varianza del grupo de datos, y los subsecuentes componentes son ortogonales relacionados y maximizados para las variables restantes (10).

Aunque algunos de los estudios descritos muestran el efecto de factores químicos, físicos y sensoriales sobre la calidad de jamón, sólo poca información evalúa la relación entre la calidad de los atributos y las características heterogéneas.

El objetivo del presente trabajo es evaluar la correlación entre el análisis sensorial, textural y fisicoquímico de un jamón cocido en función del proceso de cocción y temperatura de almacenamiento a través de ACP y matriz de correlación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cada ensayo se sumergieron 25 bloques, cada uno de 10.7 Kg en marmita de cocción con agua a 82°C hasta lograr una temperatura interna de 72, 75, 78°C, la cual fue sostenida durante 5 min en cada caso. Posteriormente, el producto cocido fue enfriado hasta una temperatura de 4°C para realizar choque térmico. A continuación vino el proceso de temple en cavas de almacenamiento con una temperatura entre 2 y 4°C, donde fueron conservados durante 48 h. Finalmente fue tajado y empacado al vacío en unidades de 230 g, utilizando un empaque constituido por dos películas, la superior laminada con alta barrera a los gases, permeabilidad al oxígeno a 23°C y 0% de humedad relativa de 5 cc/m²/día, permeabilidad al vapor de agua a 38°C y 90% de humedad relativa de 8 g/m²/día; la inferior con espesor de 90 μ , coextruida, alta barrera a los gases, permeabilidad al oxígeno a 23°C y 0% de humedad relativa de 3 cc/m²/día, permeabilidad al vapor de agua a 38°C y 90% de humedad relativa de 6 g/m²/día, en salas con condiciones controladas de temperatura, humedad relativa y velocidad de aire. Los tratamientos fueron identificados y las variables definidas como aparece en las tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Tratamientos utilizados según temperatura de cocción y almacenamiento para jamón de cerdo cocido.

Temperatura de cocción (°C)	Tiempo retención cocción (min.)	Temperatura de almacenamiento (°C)	Descriptor
72	5	4	A
72	5	8	B
75	5	4	C
75	5	8	D
78	5	4	E
78	5	8	F
72	0	Fresco	G
72	0	0	H

Se utilizaron dos patrones, absoluto (g) y relativo (h), con el fin de identificar cambios no esperados causados por el almacenamiento, manteniendo una comparación continua y directa con el producto recién elaborado.

Tabla 2. Variables estudiadas para jamón de cerdo cocido.

Variabes	Descriptor
Adhesividad instrumental	AI
Adhesividad sensorial	AS
Dureza instrumental	DI
Dureza sensorial	DS
Grado de acidez o alcalinidad	pH
Sinéresis	S

La materia prima utilizada para la elaboración del jamón cocido fue principalmente carne de cerdo seleccionada, sal, nitrito de sodio, eritorbato de sodio, tripolifosfato de sodio, almidón de trigo, aislado de soya, lactato de sodio, color carmín de cochinilla, carragenina y agua. En la figura 1 se representa el diagrama de flujo del proceso de elaboración del jamón.

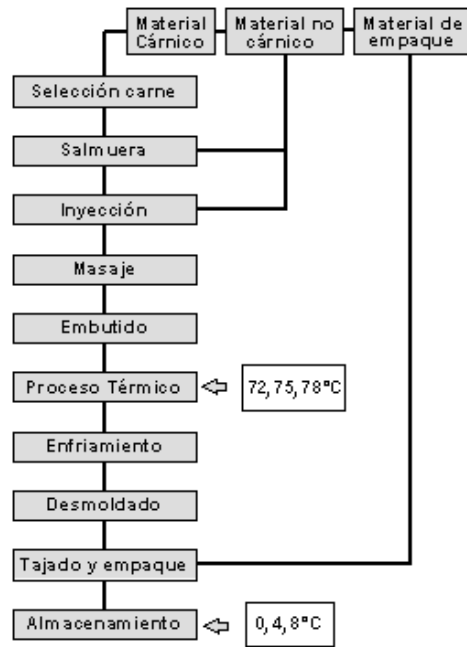


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de elaboración del jamón de cerdo cocido.

Determinación sensorial de la dureza y la adhesividad

Las pruebas sensoriales se efectuaron con 9 jueces entrenados bajo las Normas Técnicas Colombianas NTC 4129 (11) y NTC 4130 (12), pertenecientes al panel de evaluación sensorial de Industria de Alimentos Zenú. Los ensayos sensoriales se hicieron para cada sistema de cocción y cada temperatura de almacenamiento, así como para los patrones absoluto y relativo. Se aplicó un método escalar de 5 puntos, con los siguientes valores: Bajo (1), Ligeramente bajo (2), Medio (3), Ligeramente alto (4), Alto (5). Las muestras se presentaron a los jueces a una temperatura de 15°C en recipientes previamente codificados con números de tres dígitos seleccionados de tablas de números aleatorios.

Determinación instrumental de la dureza y la adhesividad

Se cortaron muestras de jamón en cilindros de 20 x 30 mm utilizando un cortador de acero inoxidable (Premac S.A®). Las mediciones se obtuvieron mediante un Análisis de Perfil de Textura (TPA) según Cheng *et al* (3), y Valková *et al* (9), usando un texturometro TA-XT2i (Stable Micro Systems®), provisto con una celda de carga de 25 Kg y una sonda de 20 mm de diámetro SMSP/20. Las condiciones de operación fueron: velocidad de preensayo

2 mm/s, velocidad de ensayo 10 mm/s, velocidad postensayo 5 mm/s y tiempo entre compresión de 1 seg. Las muestras de jamón se comprimieron uniaxialmente un 75% de la altura original en dirección perpendicular a las fibras musculares.

La dureza se determinó como el pico más alto del primer ciclo de compresión expresado en gramos (13). La adhesividad, como el área negativa después de la primera compresión según la gráfica del TPA.

Determinación del pH

Se determinó utilizando un potenciómetro Microprocessor pH meter pH-211 Hanna Instruments®, provisto de una sonda de penetración Hanna Part FC200B®, previamente calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 4.0 y 7.0. Las mediciones se llevaron a cabo introduciendo la sonda en el interior de jamón, en tres puntos equidistantes de cada unidad muestral.

Determinación de la actividad de agua

Se determinó utilizando un higrómetro Aqua Lab Mod. CX-2® a 25°C. Para la evaluación, las muestras se trituraron utilizando un procesador de alimentos Kitchen Gourmet Electric Food Processor®. Se colocaron 5 g de la muestra en la celda de lectura.

Determinación de la sinéresis

La determinación del contenido de agua desalojada se realizó por diferencia de peso, utilizando una balanza digital Metter Toledo PL 3001 – S®, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pérdida de agua(g)} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}}$$

Análisis estadístico

Para el estudio de los efectos e interacciones entre los tratamientos se aplicó un diseño balanceado multifactorial general con tres factores (14). Los datos de cada tratamiento y sus combinaciones se estudiaron usando análisis multivariado del programa SAS 8.2 (15). Los parámetros instrumentales, sensoriales y fisicoquímicos se sometieron a un análisis de correlación, a fin de determinar las posibles relaciones estadísticas entre ellos, por medio de un Análisis de Componentes Principales (ACP).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Correlación de los parámetros instrumentales, sensoriales y fisicoquímicos

Con el fin de concluir si los factores estudiados en cada prueba tuvieron efecto sobre los parámetros evaluados, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), el cual es un método de modelamiento multidimensional con base en combinaciones de cálculo lineal entre numerosas variables. En este caso, dos variables instrumentales y dos sensoriales (dureza y adhesividad); y dos fisicoquímicas (pH y sinéresis). La actividad acuosa (Aw) no se incluyó dentro del análisis final ya que no se registró variación en los resultados. El periodo de almacenamiento (día), sinéresis, dureza y adhesividad instrumental fueron las variables que mostraron tener mayor incidencia en el primer componente (CP1). Se define el segundo componente (CP2), básicamente por el pH y la sinéresis. En la tabla 3 se presenta la matriz de correlación entre las siete variables utilizadas en el estudio. Se observó que el periodo de almacenamiento en días se correlaciona con cada una de las variables estudiadas, posiblemente porque el producto presenta cambios fisicoquímicos y de textura a medida que empiezan a ocurrir reacciones entre los factores extrínsecos e intrínsecos. Se destaca que las variables instrumentales y fisicoquímicas muestran una correlación de mayor significancia ($p < 0.01$) que las sensoriales ($p < 0.05$), que se debe a la dificultad que tuvieron los jueces del panel para describir y calificar el atributo de adhesividad. El CP1 representa un 32.74% de la variabilidad y el (CP2) describe un 20.33%. En conjunto explican el 53.07% de la variación del total de los datos.

Tabla 3. Importancia de los componentes principales 1 y 2 sobre las variables fisicoquímicas y sensoriales en jamón de cerdo cocido.

Variables	CP1	CP2
Día	0.44	-0.43
Dureza (instrumental)	0.51	0.35
Adhesividad (instrumental)	0.42	-0.28
pH	-0.14	0.52
Sinéresis	0.54	0.36
Adhesividad (sensorial)	0.15	-0.33
Dureza (sensorial)	-0.17	-0.33
% Total de varianza	32.74	20.33
Varianza acumulada (%)	32.74	53.07

Análisis de dureza instrumental y sinéresis

La sinéresis esta correlacionada positivamente con la dureza instrumental ($p < 0.01$), siendo esta correlación la más alta que se observa en la matriz (76%) (Véase tabla 4). En tanto se da el proceso térmico, se generan pérdidas de humedad, por ende un incremento en la dureza. Este mismo resultado fue reportado por Cheng *et al* (3) al evaluar los efectos de la calidad de jamones influenciada por métodos de cocción y almacenamiento, en tanto que Goff (16), y Guerra *et al* (17), en estudios sobre estabilidad de almidones en los alimentos, reportaron que la sinéresis presenta un incremento debido a fluctuaciones de temperatura que se generan durante el proceso de cocción del producto por la insolubilización y precipitación espontánea de las moléculas de amilosa, ya que sus cadenas lineales se orientan paralelamente e interaccionan entre sí por puentes de hidrógeno a través de múltiples grupo hidroxilo, alterando, a su vez, las propiedades texturales del producto.

Las pruebas de textura a nivel instrumental (método imitativo TPA) y sensorial presentaron correlación significativa ($p < 0.05$), resultados que concuerdan con lo reportado por Szczesniak (18), donde se encontraron correlaciones significativas entre los atributos dureza y adhesividad, medidos por la prueba de TPA, y las características medidas a través de un panel sensorial. En términos generales, la variabilidad de las correlaciones entre las medidas sensoriales e instrumentales se puede atribuir a aspectos como el área de las fibras musculares y la dirección de estas en el trozo de jamón en el momento de la medición (19). Las variaciones dentro del mismo músculo pueden atribuirse a diversos factores como la raza, la edad, el sexo del animal, las características del colágeno, la energía y su actividad metabólica (20), así como a la distribución espacial de la red del tejido conectivo formada durante el proceso de cocción (21, 22).

Tabla 4. Matriz de correlación de jamón de cerdo cocido.

Parámetros	Día	Dureza (Inst.)	Adhesividad (Inst.)	pH	Sinéresis	Adhesividad (Sensorial)
Dureza (Inst.)	0.31**					
Adhesividad (Inst.)	0.49**	0.21*				
pH	-0.30**	0.05	-0.13*			
Sinéresis	0.29**	0.76**	0.32**	0.02		
Adhesividad (Sensorial)	0.16*	0.03	0.14*	-0.16*	0.02	
Dureza (Sensorial)	0.15*	-0.15*	-0.07	0.06	-0.28**	-0.10

Nota: Nivel de significancia ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ Inst: Instrumental.

Efecto de la adhesividad instrumental y la sinéresis

La adhesividad instrumental está correlacionada positivamente con la sinéresis ($p < 0.01$). Esto se debe posiblemente a la composición química de la masa, que se va haciendo inestable a medida que transcurre el periodo de almacenamiento del producto, mostrando mayor exudación, generando a su vez adhesividad en la superficie del producto. Los resultados concuerdan con los expuestos por Navarro *et al* (23). Según estos autores, la textura en jamones cocidos se ve afectada por el aumento de la exudación, que acarrea pérdida de calidad en el producto.

A medida que transcurre el periodo de 42 días de almacenamiento, la sinéresis, adhesividad y dureza instrumental a nivel general aumentan.

Ello se debe, posiblemente, al agua que emerge de las estructuras celulares de los trozos de carne y a la emulsión constituida por moléculas de proteína vegetal, almidón, carragenina, entre otros (Véase figura 2). Monin *et al* (24) observaron un aumento en la dureza instrumental a medida que transcurría el tiempo de almacenamiento en jamones madurados. Lawrie (25) encontró que los diferentes tratamientos de cocción también pueden causar cambios en las propiedades de los productos cárnicos.

La correlación presentada entre la adhesividad sensorial (AS) y la instrumental (AI) fue inversa. Ello significa que una variable no puede expresarse en función de la otra. Esto concuerda con lo reportado por Bourne y Destefanis (26, 27), los cuales encontraron que correlaciones bajas entre medidas

cocción de carne respecto a los atributos texturales, como dureza, cohesividad y fracturabilidad.

En comparación con el análisis clásico de correlación se observa que el ACP es un método útil para determinar las relaciones entre variables (27). El análisis por componentes principales y el análisis de correlación permitieron estudiar la vinculación entre los parámetros estudiados.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran una correlación significativa ($p < 0.01$) entre el periodo de almacenamiento y las restantes variables evaluadas (adhesividad instrumental, adhesividad sensorial, dureza sensorial, adhesividad sensorial, sinéresis y pH), siendo la correlación más alta la reportada entre la sinéresis y la dureza instrumental, con un valor de 76%; además, la sinéresis y la adhesividad instrumental están relacionadas con el periodo de almacenamiento.

Las muestras que se elaboraron a 72°C de temperatura interna de cocción, 5 minutos de tiempo de sostenimiento en cocción y 4°C de temperatura de almacenamiento, fueron las de mayor estabilidad respecto a la textura y pH del producto en el periodo de almacenamiento. Se encontró que no existe correlación con la actividad del agua (Aw).

El análisis del descriptor dureza, evaluado por los jueces entrenados, presentó correlación con la medición instrumental; en el atributo de adhesividad sensorial, el resultado obtenido fue diferente a la medición instrumental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Nielsen. Retail Measurement Services. Estudios de medición de mercados en Colombia. Diciembre-Enero 2008.
- Delahunty CM, McCord A, O'Neill E, Morrissey PA. Sensory characterization of cooked hams by untrained consumers using free-choice profiling. *Food Qual Pref.* 1997; 8 (5-6): 381-388.
- Cheng Q, Sun DW. Quality of pork ham as affected by locations within sample. *Cooking methods and storage.* *J Food Eng.* 2004; 65 (4): 551-556.
- Katsaras K, Budras KD. The relationship of the microstructure of cooked ham to its properties and quality. *Lebensm Wiss Technol.* 1993; 26 (3): 229-334.
- Guerrero I, Gelabert J, Gou P, Guardia D, Arnau J. Efecto de la disminución del contenido en sodio del jamón curado sobre sus propiedades sensoriales y reológicas. II Simposio Internacional del Jamón Curado; 2000; Barcelona.
- Ruiz-Ramírez J, Arnau J, Sierra X, Gou P. Effect of pH 24, NaCl content and texture parameters in biceps femoris and semimembranosus muscles in dry-cured ham. *Meat Sci.* 2006; 72 (2): 185-194.
- Bejerholm C, Aaslyng MD. The influence of cooking technique and core temperature on results of a sensory analysis of pork depending on the raw meat quality. *Food Qual Pref.* 2004; 15 (1): 19-30.
- Joseph JK, Awosanya B, Adeniran AT, Otagba UM. The effects of end-point internal cooking temperatures on the meat quality attribute of selected Nigerian poultry meats. *Food Qual Pref.* 1997; 8 (1): 57-61.
- Válková VA, Saláková AH, Buchtová HB, Tremlová B. Chemical, instrumental and sensory characteristics of cooked pork ham. *Meat Sci.* 2007; 77 (4): 608-615.
- Ferreira MMC, Morgano MA, Quiroz SCN, Mantovani DMB. Relationship of the minerals and fatty acid contents in processed turkey meat products. *Food Chem.* 2000; 69 (3): 259-265.
- Norma Técnica Colombiana. NTC 4129. Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de evaluadores. Parte 1. Santafé de Bogotá, Colombia: ICONTEC; 1997.
- Norma Técnica Colombiana. NTC 4130. Análisis sensorial. Guía general para la selección, entrenamiento y seguimiento de evaluadores. Parte 2. Santafé de Bogotá, Colombia: ICONTEC; 1997.
- Demonte P. Evaluación sensorial de la textura y búsqueda de correlaciones con medidas instrumentales. *Memorias de Seminario Textura y Reología de Alimentos;* 1995; Cali, Colombia.
- Montgomery DC. *Design and analysis of experiments.* 6ª ed. New York: John Wiley and Sons; 2005.
- Anon SAS/INSIGHT User's Guide, Version 8. Cary (NC), USA: SAS Institute; 1999.
- Goff HD. Modified starches and the stability of frozen foods. En: Eliasson AC (Ed.). *El almidón en la alimentación: estructura, función y aplicaciones.* Cambridge, Reino Unido: Woodhead; 2004. p. 425-440.
- Guerra M, Cepero Y. Reseña sobre el uso de almidones y gomas en productos cárnicos. Efecto de la fécula de papa y aislado de soya en salchicha. Congreso Nacional de Porcicultura. Brasil, 2004.
- Szczesniak A. Texture is a sensory property. *Food Qual Pref.* 2002; 13 (4): 215-225.
- Guerrero I, Gelabert J, Gou P, Guardia D, Arnau J. Efecto de la disminución del contenido en sodio del jamón curado sobre sus propiedades sensoriales y reológicas. II Simposio Internacional del Jamón curado; 2000; Barcelona.
- Combes S, Lepetit J, Darche B, Lebas F. Effect of cooking temperature and cooking time on Warner-Brazler tenderness measurement and collagen content in rabbit meat. *Meat Sci.* 2004; 66 (1): 91-96.
- Lepetit J, Culioli J. Mechanical properties of meat. *Meat Sci.* 1994; 36: 203-237.
- Renand GB, Picard B, Touraille C, Berge P, Lepetit J. Relationships between muscle characteristics and meat quality traits of young Charolais bulls. *Meat Sci.* 2001; 59(1): 49-60.
- Navarro AS, Martino MN, Zaritzky NE. Viscoelastic properties of frozen starch-triglycerides systems, *J Food Eng.* 1997; 34 (4): 411-427.
- Monin G, Jejenes Quijano A, Talmant A, Sélér P. Influence of breed and muscle metabolic type on muscle glycolytic potential and meat pH in pigs. *Meat Sci.* 1987; 20 (2): 149-158.
- Lawrie RA. *Meat Science.* Cambridge, Reino Unido: Woodhead; 1998.
- Bourne MC. Texture profile analysis. *Food Technol.* 1978. 32: 62-66.
- Destefanis G, Barge MT, Brugiapaglia A, Tassone S. The use of principal component analysis (PCA) to characterized beef. *Meat Sci.* 2000; 56 (3): 255-259.