Clarificação do extrato aquoso de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni utilizando o cacto, *Cereus peruvianus*

Larissa Maria Fernandes*, Nehemias Curvelo Pereira, Elisabete Scolin Mendes, Oswaldo Curty da Motta Lima e Sílvio Cláudio da Costa

*Departamento de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: nehemias@deq.uem.br*

RESUMO. A tendência das indústrias que se preocupam em promover a saúde e prevenir doenças está em investir no desenvolvimento de tecnologias para produção de alimentos com baixas calorias e reduzido teor de gordura, mantendo suas qualidades nutricionais. Um dos estudos mais freqüentes é a substituição do açúcar por edulcorantes não calóricos, com a preocupação que estes substitutos sejam semelhantes em função organoléptica. Nas folhas da planta conhecida como *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Asteraceae), ou simplesmente estévia, se encontram glicosídeos adoçantes (edulcorantes), como o esteviosídeo, rebaudiosídeos A, B, C, D, E e dulcosídeos A e B. Seu extrato aquoso apresenta-se em estado natural na cor marrom, o que o torna inconveniente para o consumidor usual. Neste trabalho, utilizou-se o cacto *Cereus peruvianus* como alternativa natural para a clarificação deste extrato. O cacto comportou-se como uma resina fortemente ácida e eliminou cerca de 95%, em média, a cor e turbidez do extrato de estévia.

Palavras-chave: estévia, clarificação, resina de troca iônica natural.

ABSTRACT. *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni extract clarification by cactus *Cereus peruvianus*. Industries worldwide involved in health promotion and disease prevention are investing in developing technologies for the production of light calorie and low fat food, while preserving its nutritional quality. One of the most frequent studies deals with the substitution of no-calorie sweetener for sugar, without losing its organoleptic properties. The leaves of a native plant known as *Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae), or simply stevia, contain sweeteners glycosides, as stevioside, rebaudiosides A, B, C, D, E and dulcosides A and B. Its aqueous extract has, in its natural form, a brown color, shunned by the customer. Research deals with the cactus *Cereus peruvianus* as an alternative natural resin to clarify the original stevia extract. This cactus behaves as a strong acid resin and eliminates about 95% of stevia extract color and turbidity.

Key words: stevia, clarification, natural ion exchange, resin.

Estévia

Na sociedade atual, saúde e bem-estar são exigências da maior parte da população mundial. Devido a problemas estéticos ou de saúde, o açúcar comum está sendo substituído por adoçantes, naturais e artificiais, com sabor parecido ao da sacarose e com baixo ou nenhum valor calórico Angelucci (1989).

Cândido e Campos (1996) citam uma pesquisa feita em 1995 pelo grupo *Food Science* onde foram avaliados, junto a pessoas de todas as classes, os hábitos e idéias associados a produtos dietéticos. Para o grupo pesquisado, produtos dietéticos são tidos, na sua maioria, como alimentos livres de açúcar, para quem pretende perder peso. Alimentos *light*, com baixo teor de gordura, foram associados ao combate ao colesterol. E a preferência foi sempre por produtos *light* aos *diet*, devido ao sabor residual desta última categoria.

Devido à legislação vigente no Brasil, o termo *light* se distingue do termo *diet*. Alimentos *diet* são todos aqueles que possuem alguma restrição de componente, como açúcar, gordura e/ou sal. Já alimentos *light* possuem como característica a redução calórica de até 25%, se comparado com o produto original.

O interesse por produtos *diet* é crescente, predominantemente pela isenção de açúcares, sendo as preferências da América do Sul semelhantes às da Europa. Pesquisa realizada nos Estados Unidos da América mostra que o consumo de edulcorantes artificiais movimenta cerca de 920 milhões de dólares.

A tendência das indústrias, que se preocupam em promoção de saúde e prevenção de doenças, está em investir no desenvolvimento de tecnologias para produção de alimentos com baixas calorias e redução de gordura, mantendo as qualidades nutricionais. Um dos estudos mais freqüentes visa à substituição do açúcar por edulcorantes não calóricos, sendo que uma das grandes preocupações com os substitutos adicionados é que sejam semelhantes em função organoléptica.

Nas folhas da planta conhecida como *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni (Asteraceae) ou simplesmente estévia, encontram-se glicosídeos adoçantes, como o esteviosídeo, rebaudiosídeos A, B, C, D, E e dulcosídeos A e B. Estes têm como vantagens a não-caloricidade, não são metabolizáveis ou fermentescíveis, são anticariogênicos e antiplacas, sendo estáveis em ampla faixa de pH e temperatura (Cândido e Campos, 1996).

Segundo Costa (1999), como resultado do Projeto Stevia realizado na Universidade Estadual de Maringá (UEM), Estado do Paraná, foi selecionada a planta *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni (Stevia UEM-320), com alto teor de rebaudiosídeo A (maior potencial como edulcorante), quando comparada a outras espécies de estévia. Isto pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparativo dos teores de edulcorantes entre a estévia comum e a Stevia UEM-320

Edulcorante	Stevia UEM-320	Estévia Comum
esteviosídeo	6,5	9,1
rebaudiosídeo C	1,3	1,2
rebaudiosídeo A	9,8	4,5
adoçantes Totais	17,6	14,8
razão rebaudiosídeo A / esteviosídeo	1,51	0,50

Apesar de o consumo de alimentos depender principalmente de valores nutricionais e da qualidade, fatores como cor, aroma e textura também são determinantes na escolha pelo consumidor. Portanto, a eliminação da coloração do extrato de estévia, normalmente de cor marrom, despertaria uma maior atenção do consumidor de adoçante, seja ele líquido ou em pó.

Dessa forma, além de matéria-prima de qualidade, folhas obtidas a partir de plantas selecionadas, com características diferenciadas em termos qualitativos e quantitativos, é necessário também o desenvolvimento de tecnologias que preservem a característica natural dos produtos obtidos. Portanto, para se conseguir um adoçante de qualidade a partir de estévia, é de fundamental importância, além da folha de qualidade superior, métodos de extração e purificação, objetivando-se qualidade e rendimento no produto final.

Segundo Alvarez (1984), a purificação de edulcorantes de estévia pode ser feita com solventes orgânicos, sais inorgânicos, íons metálicos, eletrólise, troca iônica, polieletrólitos e outros processos.

Solventes orgânicos, como álcool isobutílico, foram inicialmente aplicados, resultando em alta pureza e bom rendimento. Há, porém, resistências de sua aplicação devido a questões ligadas à saúde. Os sais orgânicos e íons metálicos podem deixar traços de resíduos no produto final e, no caso de metais pesados, a legislação vigente limita sua concentração a valores baixíssimos. Quanto à eletrólise, ainda há pouco estudo nesta área. Entretanto, o uso de polieletrólitos e/ou resinas de troca iônica constitui-se em uma alternativa crescente, devido ao grande número de produtos comerciais com estas funções lançados nos últimos anos.

Resinas de troca iônica

O processo de troca iônica envolve contato de uma fase fluida móvel (líquida ou gasosa) com uma fase imóvel (sólida) (Moraes, 2000). A troca iônica é governada por diversos fatores, tais como vazão, tempo de retenção, regeneração e limpeza.

Segundo Raitt (1970), a troca iônica é uma reação química em que os íons que estão livres em um sólido são trocados por diferentes íons de carga similar na solução. As resinas podem ser de natureza orgânica ou inorgânica, naturais ou sintéticas.

As resinas comerciais (sintéticas) têm uma característica importante: sua formação estrutural é tida como tridimensional, enquanto as naturais são consideradas planas, já que têm sua estrutura baseada em redes. Assim, resinas comerciais teriam uma área de contato superior às naturais.

No caso de resinas comerciais (sintéticas), elas podem ser de formação gelular, que apresentam uma fase contínua e pequena porosidade, sendo mais frágeis e, portanto, mais suscetíveis a processos oxidativos, já que têm menor resistência mecânica. Podem ser ainda macroreticular, com uma fase descontínua, área superficial maior e grande diâmetro de poros. Portanto, sua estabilidade física é superior quando comparada às de formação gelular, com maior resistência ao atrito. São normalmente usadas em indústrias farmacêuticas, de bebidas e, especialmente, para alimentação de caldeiras de alta pressão.

As resinas naturais são materiais que podem ter a mesma capacidade de troca iônica que as comerciais, dando resultados satisfatórios. Segundo estudos de Costa (1997), o cacto, *Cereus peruvianus,* do qual a

cutícula é retirada, tem uma grande resistência às condições de calor e falta de água (podendo se desenvolver em desertos), é rica em material péctico e sua cutícula tem capacidade de agir como um polieletrólito na clarificação de soluções impuras.

Segundo Cunha (1996), existem quatro tipos de resinas de troca iônica utilizadas: as catiônicas fortemente ácidas e fracamente ácidas e as aniônicas fortemente básicas e fracamente básicas.

Resinas catiônicas fortemente ácidas possuem, normalmente, grupos funcionais radicais como a do ácido sulfônico, tanto as de formação gelular como macroreticular. As resinas aniônicas fortemente básicas podem ser divididas em duas categorias: as que possuem uma basicidade mais forte, portanto, menor fuga de ânions, como a sílica, e a outra categoria, que é igualmente base forte, removendo ânions semelhantemente, mas, por serem uma base menos forte, requerem um menor nível de regenerante durante sua reativação.

Autores como Kubomura e Kasai (1976), Kirkuchi e Sawagushi (1977), Sawagushi e Kikuchi (1977), Okane (1977), Miwa (1979), Seito (1980), Fuji Foods (1980), Tama Seigaku (1982) Chang *et al* (1985), e Giovanetto (1989) utilizaram resinas de troca iônica, catiônica e aniônica, obtendo vários graus de clarificação e purificação do extrato. Entre as resinas utilizadas temos as adsorventes, como a HP-20 (copolímero divinilbenzeno-estireno) ou a HP-10 e a amberlite IRA-93; as porosas, aniônicas fracas, levemente básicas e as resinas macroreticulares apolares, como a XAD-7.

Payzant *et al.* (1998) observaram, através de testes com diferentes resinas, que algumas delas absorviam os componentes do extrato de estévia chamados de não-açúcares e permitiam que os edulcorantes permanecessem na solução.

Objetivando-se a utilização do cacto, *Cereus peruvianus* (Cactaceae), como uma resina de troca iônica fortemente ácida, verificou-se o comportamento em termos de percentagem de despigmentação no extrato aquoso de estévia.

Material e métodos

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi a planta *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni desenvolvida pela Universidade Estadual de Maringá (UEM) (Stevia UEM-320), e o cacto, *Cereus peruvianus,* foi obtido na região do município de Maringá, no Estado do Paraná.

Preparo do extrato de estévia

O extrato de estévia foi obtido através de infusão aquosa a 50 °C e teve seu pH corrigido com uso de sal inorgânico, até pA cutícula do cacto, *Cereus peruvianus,* foi obtida a partir de planta da região de Maringá, de onde apenas a cutícula foi retirada para o teste.

Metodologia

Foram realizados testes de clarificação com a cutícula em regime de batelada e contínuo, em escala de bancada e temperatura ambiente de 25°C, em duplicata.

Para a medida de pH foi utilizado um potenciômetro, o teor de sólidos solúveis (° Brix) foi avaliado em refratômetro, a cor e turbidez foram medidas em espectro Hack DR/2010 e as absorbâncias (Abs) em espectrofotômetro Micronal, calibrado automaticamente com água destilada. A percentagem de despigmentação (%D) foi calculada segundo a relação de Fuh e Chiang (1990), os quais afirmam que a leitura em 420 nm estaria próximo a parâmetro de cor, e 670 nm seria compatível com parâmetro de turbidez:

$$\%D = \left[1 - \left(\frac{\left(Abs_{420} ou Abs_{670}\right)_{depoispurificação}}{\left(Abs_{420} ou Abs_{670}\right)_{antespurificação}}\right)\right] x100 \quad (1)$$

Procedimento para etapa em batelada. Para o teste em batelada, o extrato foi colocado em um equipamento de "Jar-Test" (Figura 1), com diversas concentrações de resina: C (%m/V)= 2, 4, 8 e 10 e rotação fixa em 100 rpm. O comportamento de troca foi avaliado acompanhando-se a variação do pH ao longo de 30 min, com leituras a cada 5 minutos. Os frascos de 250 mL foram submetidos à agitação magnética e operados a temperatura ambiente.

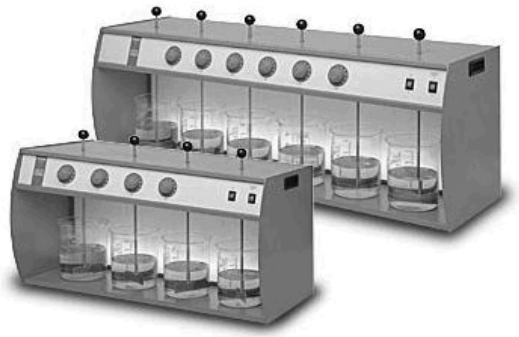

Figura 1. Aparelho de "Jar-Test"

Procedimentos para etapa contínua. Os testes em etapa contínua foram realizados em coluna de

vidro (50 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro) com volume de leito (VL) de 150 mL (altura de leito de resina de 27,5 cm) com vazão 2 mL/min. A cada 0,5 VL, era colhida amostra em frasco adequado para leitura de sólidos solúveis (ºBrix).

Tratamento estatístico

Os resultados obtidos no regime em batelada foram tratados no *software SAS* (*Statistical Analysis Software*), que fornece parâmetros estatísticos na adequação do modelo proposto pelo programa e do modelo obtido pelo procedimento experimental, para avaliação do comportamento da percentagem de despigmentação em 420 (cor) e 670 (turbidez) nm, em função dos parâmetros operacionais pH, concentração da cutícula e temperatura, optando-se por um modelo linear, para uma comparação mais simples.

Resultados e discussão

Etapa em batelada

Os resultados abaixo, apresentados nas Tabelas 2 e 3, demonstram, respectivamente, a capacidade do cacto na troca iônica e o seu potencial na eliminação de cor e turbidez do extrato.

Tabela 2. Comportamento do pH do extrato aquoso de estévia com cutícula do Cacto *Cereus peruvianus*

	pH						
	0	5	10	15	20	25	30
2 %	9,50	3,48	3,48	3,47	3,48	3,47	3,54
4 %	9,50	3,51	3,56	3,56	3,59	3,59	3,64
8 %	9,50	3,50	3,71	3,71	3,73	3,75	3,79
10 %	9,50	3,54	3,77	3,77	3,79	3,80	3,85

Observa-se pela Tabela 2 que o pH inicial do extrato em todos os frascos era de 9,5 e que, após 5 min de tratamento, este foi reduzido para valores em torno de 3,5. Isto demonstra que a resina natural comporta-se como resina do tipo fortemente ácida.

Os dados da Tabela 3 demonstram o comportamento do chá de estévia em termos de cor, turbidez e absorbâncias, comprovando sua clarificação quando comparado com o chá antes do processamento com a cutícula do cacto.

O modelo de comportamento proposto pelo *SAS* e que melhor se adequou às variáveis $\%D_{420}$, $\%D_{670}$, cor e turbidez foi descrito como uma função do pH, concentração e temperatura (f [pH, conc, T]). Nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 são mostrados os parâmetros determinados pelo SAS

As Tabelas, 4, 5, 6 e 7 demonstram os modelos ajustado linearmente, juntamente com o valor de R^2, p valores dos parâmetros e p valor do modelo proposto.

Nas Figuras 2 a 5, são mostrados os gráficos de resíduos do processo de estimação dos parâmetros dos modelos propostos nas Tabelas 4 a 7.

Tabela 3. Comportamento das absorbâncias, cor e turbidez do extrato aquoso de estévia com cutícula do Cacto, *Cereus peruvianus*

	Abs (420 nm)	Abs (670 nm)	Cor (PtCo-APHA) 455 nm	Turbidez (FAU) 860 nm
Inicial (2%)	0,520	0,095	6560	160
Após 30 min (2%)	0,460	0,084	254	60
Inicial (4%)	0,597	0,107	5280	140
Após 30 min (4%)	0,598	0,098	249	100
Inicial (8%)	0,578	0,115	5800	140
Após 30 min (8%)	0,631	0,075	265	140
Inicial (10%)	0,630	0,117	6880	160
Após 30 min (10%)	0,645	0,109	533	380

Tabela 4. Modelo proposto avaliado pelo SAS para $\%D_{420}$

Modelo	A_{420}= 1,107 Conc -0,536 pH + 0,070 T
Pvalor - modelo	0,0001
Pvalor - pH	0,0348
Pvalor - T	0,0701
Pvalor - Conc	0,0001

R^2= 0,9829

Tabela 5. Modelo proposto avaliado pelo SAS para $\%D_{670}$

Modelo	A_{670}= 8,2662 pH + 9,20 T
Pvalor - modelo	0,0007
Pvalor - pH	0,0066
Pvalor - T	0,0088

R^2= 0,9459

Tabela 6. Modelo proposto avaliado pelo SAS para cor

Modelo	Cor=-7,3136 Conc - 96,058 T
Pvalor - modelo	0,0070
Pvalor - T	0,0021
Pvalor - Conc	0,0033

R^2= 0,9237

Tabela 7. Modelo proposto avaliado pelo SAS para turbidez

Modelo	Turb= -0,034 Conc + 28,75 pH - 5,755 T
Pvalor - modelo	0,0114
Pvalor - pH	0,0995
Pvalor - T	0,0290
Pvalor - Conc	0,0152

R^2=0,9612

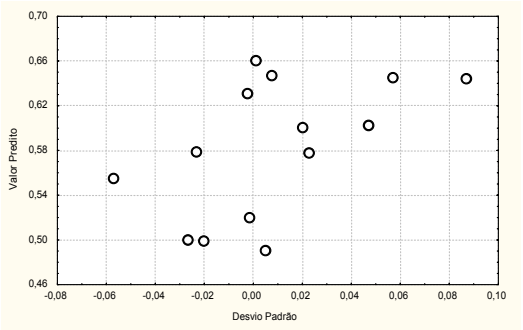

Figura 2. Gráfico de resíduos para a curva com a percentagem de despigmentação a 420 nm

Os resultados da análise estatística, apresentados nas Tabelas 5 a 8 e Figuras 2 a 5, mostram que a escolha dos modelos lineares foi adequada e que as correlações obtidas podem ser utilizadas na predição do comportamento destas variáveis, no âmbito da região estudada.

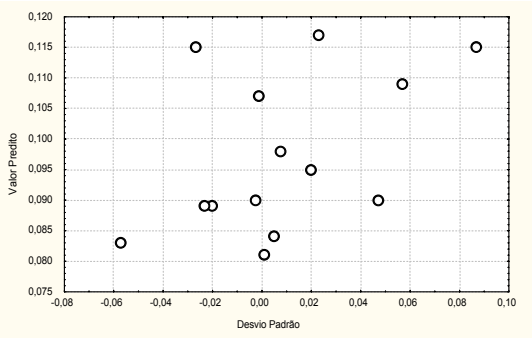

Figura 3. Gráfico de resíduos para a curva com a percentagem de despigmentação a 670 nm

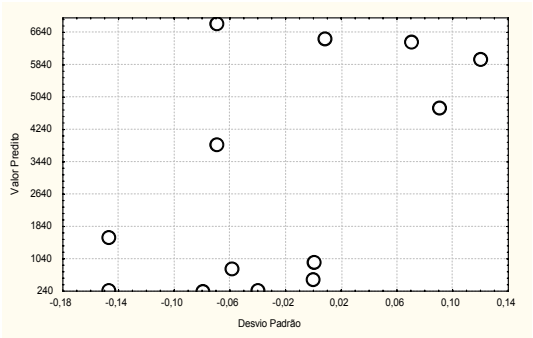

Figura 4. Gráfico de resíduos para a curva com a cor

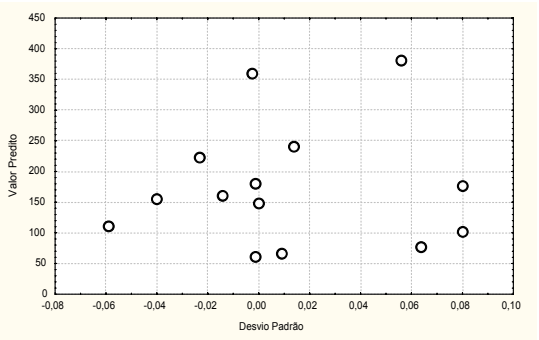

Figura 5. Gráfico de resíduos para a curva com a turbidez

Na Tabela 8, são apresentados os dados de % de despigmentação do teste, demonstrando-se a perda de de pigmento provocado pela ação do cacto *Cereus peruvianus*.

Tabela 8. Percentagem de despigmentação

Teste	% D (420nm)	% D(670nm)
2%	88,0	88,4
4%	100,0	91,5
8%	100,0	65,2
10%	100,0	93,0

Etapa contínua

Através dos resultados apresentados na Figura 6 para o teste continuo, verifica-se que a resina catiônica é capaz de tratar acima de 14 VL, sem a necessidade de regeneração, com o pH se mantendo sempre abaixo de 3,0 e com ótima recuperação de sólidos solúveis, entre 2,0 e 2,7 ºBrix..

Após os testes, a regeneração da resina foi efetuada com adição de HCl 7% e posterior correção do pH com água até 1,5, seguindo-se sempre as condições de uma resina comercial catiônica.

Os eluatos da troca catiônica foram submetidos a tratamento em resina aniônica, resultando em eluatos completamente despigmentados, que após passarem por uma etapa de secagem, deram origem a um extrato de estévia em pó de cor branca.

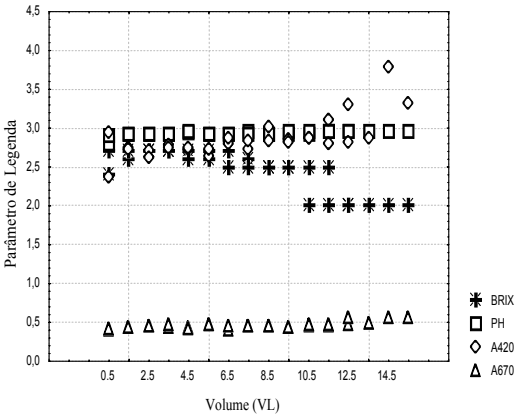

Figura 6. Comportamento de troca iônica utilizando-se a cutícula de cacto *Cereus peruvianus* com extrato de estévia

Conclusão

O uso da cutícula de cacto, *Cereus peruvianus,* mostrou ser uma boa alternativa às resinas de troca iônica, utilizando-se colunas na clarificação do extrato de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, pois:

- teve comportamento de resina do tipo fortemente ácida;

- seu uso reduziu significativamente a cor (455 nm) e a turbidez (860 nm), após tratamento de 30 minutos;
- os resultados matemáticos confirmam a confiabilidade dos dados, já que em todas as curvas obteve-se uma aleatoriedade de dados, observando pelos gráficos de resíduos de todas as curvas, razoável coeficiente de determinação, e p vlores adequados aos parâmetros. Mostram que os parâmetros concentração de cutícula e pH do chá de estévia têm influência na despigmentação em ambos comprimentos de onda, na cor, inclusive na turbidez. com tempo de processamento;
- com os modelos que tiveram valor de R^2 menor que 0,96 demonstram a possibilidade de uma variável sem controle nesse teste, possivelmente a temperatura;
- é capaz de tratar acima de 14 VL sem necessidade de regeneração;
- com seu uso, o pH manteve-se sempre abaixo de 3,0 e os sólidos solúveis entre 2,0 e 2,7 °Brix.

Nomenclatura

Abs - Absorbância
Vl - Volume de leito
R^2 - Coeficiente de determinação
T - Tempo (minutos)
Conc - Concentração (% m/v) de cutícula de cacto
Abs - Absorbância
$\%D_{670}$ - Percentagem de despigmentação (670 nm)
$\%D_{420}$ - Percentagem de despigmentação (420 nm)
Cor - Cor do chá de estévia (Pt-Co APHA)
Turb - Turbidez do chá de estévia (FAU)

Referências

ALVAREZ, M. *Stevia rebaudiana* Bert. (Bertoni) - Estado anual do conhecimento. Maringá: Universidade Estadual de Maringá/CCB-DBQ-NEPRON, 1984.

CÂNDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A. M. *Alimentos para fins especiais - Dietéticos*. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela Ltda., 1996.

ANGELUCCI, E., *O esteviosídeo de plantas brasileiras de Stevia rebaudiana Bertoni e a potencialidade de seu emprego em alimentos. Ensaio em formulações hídricas e cabonatadas.* 1979. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

CHANG, T.F. *et al*. A Study on the purification of steviosides with use of ion-exchange resins. *J. Chin. Agri. Chem. Soc.*, v. 23, p. 178-179, 1985.

COSTA, S.C. *Cacto Cereus peruvianus: características estruturais reológicas e aplicações dos polissacarídeos.* 1997. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

COSTA, S.C. Estudo biotecnológico em *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni, Relatório do Projeto Stevia, Maringá: Universidade Estadual de Maringá/CCB-DBQ-NEPRON, 1999.

CUNHA, O.A.A. *Resinas de troca iônica*. Catálogo da Rohm & Haas e Grace Aquatec, 1996.

FUH, W. S.; CHIANG, B. H. Purification of steviosides by membrane and ion exchange processes, *J. Food Sci,* Chicago, v 55, n 5, p 1454-1457, 1990

FUJI FOODS K. K. Stevioside (Tokkyo Koho). *Japan Kokai*, Tokyo, v. 46, n 82, p. 998-1025, 1980.

GIOVANETTO R. Extration of stevioside from Stevia rebaudiana. Eur. Pat. Appl. EP 302,948 (ClCO7H15/256), p.3, 1989.

KIRKUCHI, H.; SAWAGUSHI, K. Stevioside (Sanyo Kakusaku Pulp. Co.). *Japan Kokai*, Tokyo, v. 57, n. 77, p. 199-200, 1977.

KUBOMURA H.; KASAI, R. A. New sweet diterpen glucoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 15, p. 981-983, 1976.

MIWA K., Extration of Stevioside or Phyllodulcin(Toyo Ink. Mgf. Co. Ltd.). *Japan Kokai*, Tokyo, v. 90, n. 79, p. 199-201, 1979.

MORAES, E.P. *Clarificação do extrato aquoso de Stevia rebaudiana Bertoni através de adsorção em zeólitas modificadas.* 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2000.

OKANE, K. *et al*. Separation of sweeteners from stevia (Toyo Sugar Refining Co. Ltd.). *Japan Kokai*, Tokyo, v. 120, n. 77, p. 170-175, 1977.

PAYZANT J.D. *et al*. Method of extracting selected sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. patente nº 5.962.678, 5/10/99, 1988.

RAITT, J.G. *Chemistry* - Ion Exchange - a special study. London: Nuffield Advanced Science, 1970.

SAWAGUSHI, Y.; KIKUCHI, H. Purification of stevia sweeteners by precipitation (Tokkyo Koho). *Japan Kokai*, Tokyo, v. 212, n. 83, p. 759-761, 1977.

SEITO, K. K. Stevioside extration of *stevia rebaudiana*. *Japan Kokai*, Tokyo, v. 41, n. 77, p 275-314, 1980.

TAMA SEIGAKU, K. K. Stevioside purification (Tokkyo Koho). *Japan Kokai*, Tokyo, v. 75, n. 82, p. 992-998, 1982.

Received on January 26, 2001.
Accepted on March 28, 2001.