

RECIRCULACIÓN DE LÍQUIDOS RESIDUALES EN LA CONVERSIÓN DE ALGINATO DE CALCIO EN ÁCIDO ALGÍNICO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE ALGINATOS

Y. Elizabeth Rodríguez-Montesinos*, Gustavo Hernández-Carmona & Dora Luz Arvizu-Higuera

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. Apartado Postal 592, La Paz, B.C.S., C.P. 23000, México.
E-mail: *yermcat@hotmail.com

RESUMEN. Se estudió el efecto de recircular la solución ácida residual en la etapa de conversión de alginato de calcio en ácido algínico, utilizando el alga *Macrocystis pyrifera*. Los líquidos residuales fueron reciclados en un sistema en contracorriente, con lo cual se logró procesar tres cargas de alginato de sodio con el mismo volumen de agua, permitiendo una conversión efectiva en ácido algínico, con una reducción del 56% en el consumo de agua dulce. Se experimentó un sistema de recirculación en línea (sin reemplazo de agua), este sistema no es recomendable, debido a que la acumulación de calcio en el alginato después de la segunda recirculación, produce una viscosidad aparente muy alta, con un porcentaje de reducción superior al 50%. Se determinó el efecto del número de lavados ácidos del ácido algínico sobre la calidad y rendimiento del alginato obtenido. El tratamiento ácido se llevó a cabo con tres, dos y un lavado. Se concluye que se requieren tres lavados de las fibras de alginato de calcio para lograr una conversión efectiva en ácido algínico, pero el primero y segundo lavado se pueden hacer con ácido reciclado. Este sistema representa un ahorro del 66% en el consumo de agua en esta etapa.

Palabras clave: *Macrocystis pyrifera*, Recirculación, Lavados ácidos, Intercambio de calcio.

Recycling of residual liquids from the conversion of calcium alginate to alginic acid during alginate production process.

ABSTRACT. The effect of recycling the residual acid solution from the conversion of calcium alginate to alginic acid from the alga *Macrocystis pyrifera* was studied. The residual liquid was recycled using a countercurrent system; it was possible to treat three batches of calcium alginate with the same amount of water, with an effective conversion into alginic acid, saving 56% of fresh water. An in line recycling system was experimented (without water replacement). This system is not recommended, because the large increase of calcium in the alginate after the second recycling, produces a very high apparent viscosity. Using this system the viscosity was reduced in more than 50%. We experimented the effect of the number of acid washings of the alginic acid, on the yield and quality of the final alginate. The acid treatment was carried out with three, two and one washing. It was concluded that three acid washings of the calcium alginate fibers are necessary to obtain an effective conversion of calcium alginate to alginic acid, but the first and second washings can be carried out with recycled acid. This system represents a water saving up to 66% in this step.

Key words: *Macrocystis pyrifera*, Recycling, Acid washings, Calcium exchange.

Rodríguez-Montesinos, Y.E., G. Hernández-Carmona & D.L. Arvizu Higuera. 2005. Recirculación de líquidos residuales en la conversión de alginato de calcio en ácido algínico durante el proceso de producción de alginatos. *CICIMAR Océánides*, 20(1,2):1-7.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las grandes algas marinas pardas, son fuente potencial de alginatos (Clare, 1993). En México la especie más importante es *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh, debido a su alto contenido de alginatos (Casas-Valdéz, 1985; Hernández-Carmona, 1985) y por su gran abundancia en la Península de Baja California (Hernández-Carmona *et al.*, 1989a; 1989b; 1991). Las algas pardas contie-

nen de 18% a 40% de ácido algínico en base al peso seco de la planta (Clare, 1993). El ácido algínico presenta un intercambio iónico en equilibrio con el agua de mar y funciona como un elemento estructural (Rivera-Carro, 1984; Lobban & Harrison, 1994).

Una característica importante del proceso de producción de alginatos es que se emplean grandes volúmenes de agua potable (1000 m³ - 1500 m³ por tonelada de alginato)

(McHugh, 1987). Por lo tanto, se ha tratado de reducir su consumo, empleando agua de mar en las etapas de hidratación y de preextracción. También se ha tratado de combinar agua de mar y agua destilada en diferentes proporciones para las etapas de preextracción y extracción alcalina (Casas-Valdéz, 1982; Ortega-Ceseña & Zaragoza-García, 1983); sin embargo, no se ha tenido éxito. Se ha encontrado que el uso de agua de mar durante la preextracción impide que ocurra el intercambio iónico de Ca^{++} por H^+ (Hernández-Carmona & Aguirre-Vilchis, 1987). Hernández-Carmona *et al.* (1992) encontraron que es posible reciclar hasta tres veces el ácido residual en la etapa de preextracción en un sistema de flujo continuo y después en la etapa de precipitación con ácido, sin embargo, en todos los experimentos anteriores el consumo de agua, continúa siendo elevado. Si se logra reducir el consumo de agua en el proceso de producción, la factibilidad de instalar una planta procesadora de alginatos en Baja California Sur, será mayor.

El objetivo de este trabajo fue: a) evaluar la reutilización de líquidos residuales en la producción de alginato de sodio, reciclando el ácido residual de la etapa de conversión de alginato de calcio en ácido algínico; b) determinar el efecto del contenido de calcio que permanece en el alginato al reducir el número de lavados ácidos, sobre la variación del rendimiento y calidad del alginato obtenido en cada uno de los tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La obtención de alginatos se hizo de acuerdo al proceso general descrito por Arvizu-Higuera *et al.* (1996, 1997). Como materia prima se empleó *Macrocystis pyrifera* seca y molida (0.39 mm), recolectada en Bahía Tortugas, Baja California Sur. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

En todos los casos se calculó el rendimiento en base al peso inicial de la muestra seca. Al alginato de sodio obtenido en cada tratamiento se le midió la viscosidad en solución al 1% a 22 °C, empleando un viscosímetro Brookfield LVT, antes y después de agre-

gar hexametáfosfato de sodio (HMFS), con el fin de secuestrar el calcio residual y determinar el efecto de cada tratamiento sobre el cambio de viscosidad. También se midió el pH con un potenciómetro marca Orion, el color y la turbidez fueron medidos por comparación visual con estándares de color y turbidez, en una escala de uno a cuatro.

Diseño experimental

1) Efecto de la recirculación de una solución ácida residual en un sistema en contracorriente. En la Figura 1 se muestra el diseño para estudiar el efecto de reciclar la solución de ácido residual (HCl) en un sistema en contracorriente. Empleando 10 g de algas, se llevó a cabo la hidratación, preextracción, extracción, filtración y precipitación como se describe en el proceso de Arvizu-Higuera *et al.* (1996, 1997). En cada caso, se llevaron a cabo dos tratamientos previos con tres lavados ácidos, para obtener una solución ácida residual con un uso (control) y con dos usos. Se empleó un sistema en contracorriente colocando las fibras de alginato de calcio en un pri-

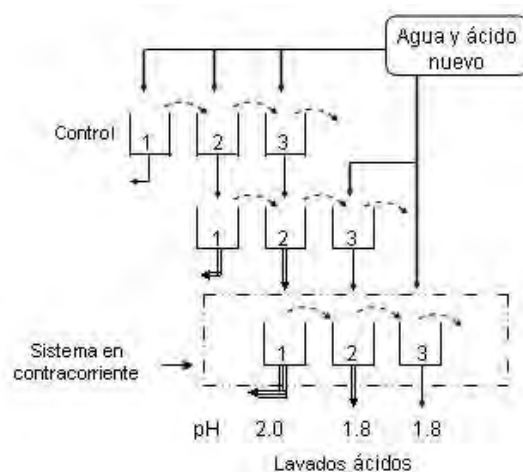


Figura 1. Recirculación de una solución ácida residual en un sistema en contracorriente: --- Fibras de alginato de calcio; - Solución de ácido residual con un uso; = Solución de ácido residual con dos usos; ° Solución de ácido residual con tres usos.

Figure 1. Recycling of residual acid solution in a counter-current system: --- Calcium alginate fibers; - Residual acid solution used once; = Residual acid solution used twice; ° Residual acid solution used three times.

mer vaso, que contenía 200 ml de una solución ácida residual previamente usada dos veces, se ajustó el pH a 2.0 con HCl 1N, se agitó por 15 minutos, se filtró y el líquido residual se desechó. El alga se transfirió a un segundo vaso, conteniendo 200 ml de una solución ácida, la cual fue usada una vez; se ajustó el pH a 1.8 con HCl 1N, la agitación y filtración se repitió y las fibras se transfirieron a un tercer vaso con 200 ml de agua destilada, ajustando nuevamente el pH a 1.8 con HCl 1N. Después de agitar y filtrar, el ácido algínico se procesó como se describe en el método de Arvizu-Higuera *et al.* (1996, 1997), para extraer y purificar el alginato de sodio.

En todos los casos se determinó la cantidad de calcio intercambiado en el líquido residual. En el sistema en contracorriente, de los líquidos residuales empleados con uno y dos usos fue necesario ajustar el volumen a 200 ml con agua destilada.

2) Efecto de cuatro recirculaciones en línea, sin reemplazo de agua. En este sistema el agua acidulada se recirculó hacia el mismo vaso, simulando una recirculación en línea (Fig. 2); esto es, la solución ácida residual recuperada del primer lavado de la primera muestra se usó en el primer lavado de una segunda muestra, y así sucesivamente hasta la cuarta muestra. El mismo proceso se hizo para el segundo y tercer lavado. Después de tratar las algas en cada lavado, la muestra se procesó hasta la obtención del alginato de sodio.

Se muestreó el ácido residual de la cuarta recirculación y se le determinó la cantidad de calcio liberado.

3) Efecto de la reducción del número de lavados ácidos. En este experimento se realizó una reducción gradual del número de lavados ácidos, en la etapa de conversión de alginato de calcio en ácido algínico: tres lavados (control) a pH de 2.0, 1.8 y 1.8, dos lavados a pH 2.0 y 1.8, y un lavado ácido a pH 2.0. El alginato de calcio se colocó en todos los casos en 200 ml de agua destilada y se ajustó el pH con una solución de HCl 1N, con agitación durante 15 minutos en cada lavado. La mues-

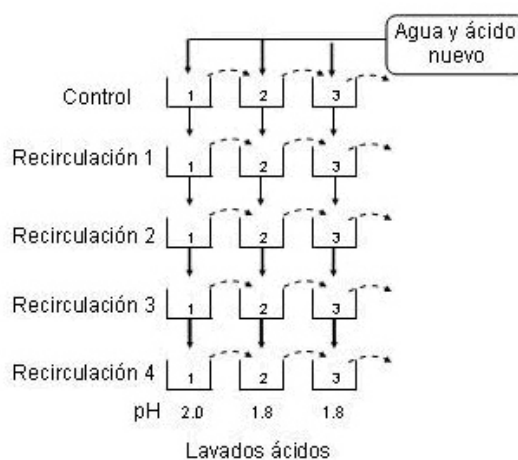


Figura 2. Sistema de recirculación en línea de una solución acidulada residual, en la etapa de conversión de alginato de calcio en ácido algínico.

Figure 2. Recycling system in-line of residual acid solution, in the conversion of calcium alginate to alginic acid step.

tra se filtró y los líquidos residuales se colectaron para realizar el análisis de la concentración de calcio liberado. Las algas se sometieron al resto del proceso de obtención de alginatos y se determinó el rendimiento y su calidad.

Al alginato obtenido en cada recirculación se le determinó el contenido de calcio por el método descrito en Hernández-Carmona *et al.* (1999).

Para comparar los promedios de rendimiento en cada uno de los tres experimentos, los resultados obtenidos se sometieron a una prueba t-Student con un nivel de confianza del 95%. Para determinar diferencias significativas en los valores de viscosidad entre los tratamientos, se empleó un análisis de varianza de una vía con un nivel de significancia del 95%. Para determinar diferencias entre tratamientos se empleó la prueba de Tukey (Zar, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Efecto de la recirculación de una solución ácida residual en un sistema en contracorriente. Se observó que el rendimiento de alginato no se ve afectado por la recircula-

ción del ácido clorhídrico, ya que el promedio obtenido en el sistema en contracorriente (21.3%) no fue significativamente diferente ($p>0.05$) al control (22.4%). La viscosidad del alginato de sodio que se obtuvo con el sistema en contracorriente, presentó un valor promedio de 580 mPa s. Mientras que en el tratamiento control fue de 661 mPa s (Tabla 1), sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre muestras ($p>0.05$). Tampoco hubo un efecto significativo sobre la reducción de viscosidad después de agregar el secuestrante de calcio, el cual no superó el 15% cuando se realizó la recirculación del agua acidulada. Esto indica que el tratamiento fue lo suficientemente efectivo para lograr la eliminación del calcio y para convertir el alginato de calcio en ácido algínico. McHugh (1987) menciona que en esta etapa, a través del tratamiento ácido se puede obtener un ácido algínico libre de io-

nes calcio, pero si lo que se desea es un incremento en la viscosidad del alginato, entonces se pueden variar las condiciones de la conversión limitando la cantidad de iones intercambiados.

La Figura 3 muestra el calcio liberado en cada uno de los lavados ácidos en cada tratamiento, observándose la misma tendencia en todos los casos. La mayor liberación de calcio se llevó a cabo en el primer lavado ácido. También se presenta un incremento en la acumulación de calcio en el líquido residual por recirculación: 829.13 mg (control), y 1136.13 mg (sistema en contracorriente), sin embargo, esta última concentración de calcio no afecta la tasa de intercambio iónico, ya que se mantiene el gradiente de concentración de iones hidrógeno, mediante la adición de ácido clorhídrico, para llevar a cabo cada uno de los

Tabla 1. Promedio de tres réplicas (desviación estándar) de los análisis de rendimiento y control de calidad de alginato obtenido en cada experimento.

Table 1. Average of three replicates (\pm standard deviation) of the yield and quality control of the alginate obtained in each experiment.

	Rendimiento %	pH	Viscosidad Sin HMFS (mPa s)		Con HMFS (mPa s)	Reducción de viscosidad %			Color	Turbidez	Calcio %		
Experimento 1. Recirculación de líquidos residuales en la etapa de conversión en ácido algínico													
Control	22.4	0.71	6.0	740	38	661	22	11	2	2	2		
Sistema en contracorriente	21.3	0.37	6.0	669	76	580	62	13	2	2	2		
Experimento 2. Recirculación en-línea, sin reemplazo de agua (4 recirculaciones)													
Control	21.7	0.33	6.5	618	78	580	74	6	1	2	2		
T1	20.8	1.40	7.0	543	28	528	30	3	1	2	2		
T2	21.0	0.08	6.5	1066	132	599	52	44	4	2	1		
T3	20.4	0.61	6.5	1078	161	537	69	50	1	2	2		
T4	21.0	0.23	6.5	1276	41	542	29	57	4	2	2		
Experimento 3. Reducción en el número de lavados													
3 lavados ácidos	24.45	0.42	6.5	1019	50	984	19	3	2.48	>4	1	0.43	0.02
2 lavados ácidos	25.36	1.09	6.5	2300	148	894	7	61	2.28	>4	1	0.95	0.14
1 lavado ácido	24.24	0.74	7.0	6277	248	686	16	89	0.50	>4	1	2.09	0.08

T = Tratamiento

lavados ácidos. Se concluye que el agua acidulada empleada en esta etapa se puede reciclar en un sistema en contracorriente, sin afectar el rendimiento o la calidad del alginato obtenido. En cuanto al color y la turbidez del producto final fue de dos en todos los casos (Tabla 1), por lo que estos parámetros no se vieron afectados por el sistema en contracorriente.

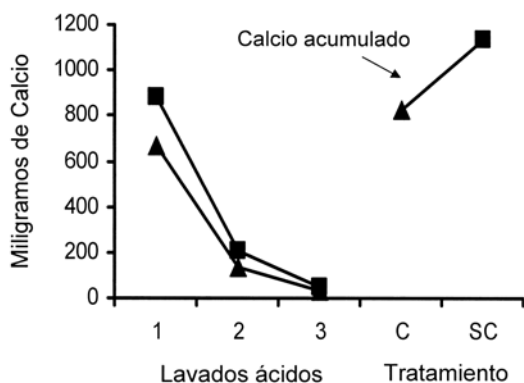


Figura 3. Concentración de iones calcio en los líquidos residuales reciclados en contracorriente, por lavado ácido y acumulación de calcio por recirculación: ▲ Control, ● Reciclado 1, ■ SC Sistema en Contracorriente.

Figure 3. Calcium ions concentration in the residual liquids in a countercurrent system, by acid washing and accumulation of calcium by recycling: ▲ Control, ● Recycle 1, ■ SC Countercurrent System.

El consumo de agua en la muestra control fue de 60 ml g^{-1} de alga, lo que fue significativamente mayor ($p < 0.05$), comparado con el volumen empleado en el sistema con recirculación de líquidos residuales en contracorriente, donde el consumo de agua fue de 26.4 ml g^{-1} de alga, lo que implica un ahorro del 56%; esto representaría un ahorro significativo cuando este sistema se lleve a cabo a una escala industrial.

2) Efecto de cuatro recirculaciones en línea, sin reemplazo de agua. Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 1. Los valores de rendimiento fluctuaron de 20.4% a 21.7% y no presentaron diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$). La viscosidad de los alginatos sin secuestrante de calcio fluctuó entre 543 y 1276 mPa s en-

contrándose diferencias significativas ($p < 0.5$) entre los tratamientos. Se observó que a partir de la segunda recirculación la viscosidad fue superior a los 1000 mPa s, los cuales fueron significativamente mayores ($p < 0.5$) que el control (618 mPa s), mientras que la viscosidad con secuestrante de calcio presentó una menor variación de 528 a 599 mPa s, sin diferencia significativa respecto al control (580 mPa s) ($p > 0.05$). La reducción de viscosidad después de la segunda recirculación varió de 50% a 57%, la cual fue significativamente más alta que el control (6%) superando el límite de reducción de viscosidad (no mayor del 40%) (Schweiger, com. pers.) debido a la presencia de iones calcio en la solución (Tabla 1).

En este sistema, cuando se realizó la conversión de alginato de calcio en ácido algínico, la acumulación de calcio residual se incrementó hasta 1848 mg, el cual fue significativamente más alto ($p < 0.05$) que el control (829 mg) (Fig. 4). En este caso la acumulación de calcio residual tuvo un efecto negativo. A partir de la segunda recirculación el intercambio iónico del calcio por el hidrógeno se vio limitado y el porcentaje de calcio residual en el alginato se incrementó, produciendo una viscosidad aparente muy alta, debido a la interacción del calcio en la solución de alginato (Tabla 1). Esta viscosidad se redujo en más del 50 % al agregar el secuestrante de calcio y supera los límites de control de calidad establecidos, por lo que no es recomendable el uso de este sistema de recirculación.

3) Reducción en el número de lavados.

El rendimiento no se vio afectado significativamente ($p > 0.05$) al reducir el número de lavados ácidos (Tabla 1). Con respecto a la viscosidad del producto obtenido, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres tratamientos. El alginato de sodio resultante presentó un alto porcentaje de reducción de viscosidad al disminuir a dos lavados ácidos (61%), sobrepasando el valor permitido en los alginatos comerciales (40%). Se determinó la cantidad de calcio en el agua residual de cada lavado (Fig. 5) encontrándose que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada uno de éstos, siendo en el primer lavado donde se elimina la mayor cantidad de

calcio (659.2 mgCa), mientras que en el segundo y tercer lavado se eliminan 118.9 mgCa y 37.6 mgCa respectivamente. El contenido de calcio en el alginato de sodio, presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, obteniéndose una variación de 0.43% a 2.10 % (Tabla 1). Se observó que el contenido de calcio a partir del segundo lavado (0.95%), está muy próximo al límite máximo permitido en algunos alginatos comerciales (1.2%), ya que en otros este porcentaje no debe exceder del 0.3% (Hernández-Carmona *et al.*, 1999; The Nutra Sweet Kelco Company, 1996).

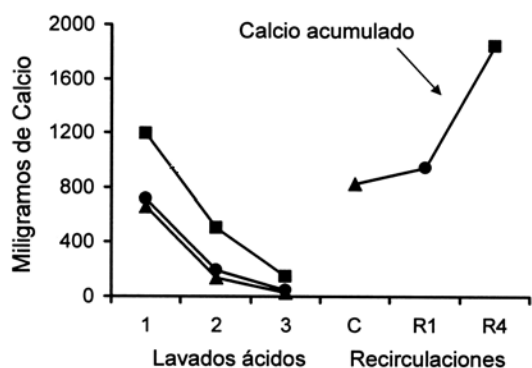


Figura 4. Concentración de iones calcio en el líquido residual reciclado hasta 4 veces en un sistema en línea, por lavado ácido y acumulación de calcio por recirculación: ▲ Control, ● Recirculación 1, ■ Recirculación 4.

Figure 4. Calcium ions concentration in the residual liquid with 4 in-line recycling system, for each acid washing and accumulation of calcium by recycling: ▲ Control, ● Recirculation 1, ■ Recirculation 4.

La presencia de bajas concentraciones de iones de calcio en una solución de alginato incrementan su viscosidad y en grandes cantidades causan la formación de gel (McHugh, 1987). Este efecto se observó claramente en el alginato con un lavado ácido, que presentó una viscosidad de 6277 mPa s con una consistencia gelatinosa y al agregar un secuestrante de calcio la viscosidad se redujo a 686 mPa s.

Se concluye que la etapa de conversión en ácido algínico requiere de tres lavados ácidos, para obtener al final del proceso de producción un alginato de sodio libre o casi libre de iones calcio. Esta etapa del proceso se

puede llevar a cabo mediante este innovador sistema de recirculación en contracorriente de los líquidos residuales sin afectar el rendimiento o la calidad del alginato de sodio.

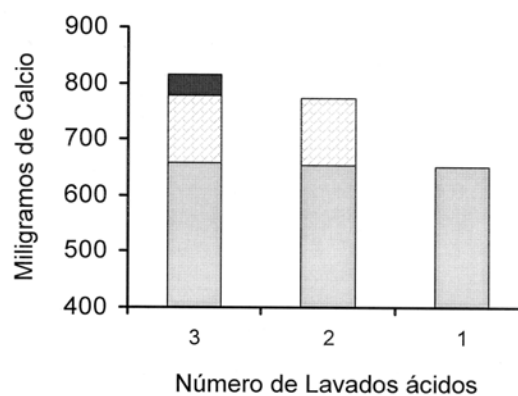


Figura 5. Acumulación de iones calcio en los lavados ácidos en la etapa de conversión de alginato de calcio en ácido algínico. Un lavado (barra gris), dos lavados (barra blanca) y tres lavados (barra negra).

Figure 5. Calcium ions accumulation in acid washings in the conversion step of calcium alginate in alginate acid. One washing (grey bar), two washings (white bar) and three washings (black bar).

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas y al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica por su apoyo económico para el desarrollo de esta investigación. También queremos agradecer a la Comisión para el Fomento de Actividades Académicas del Instituto Politécnico Nacional (COFAA-IPN) y al programa de Estímulo al Desempeño de la Investigación (EDI-IPN) por las becas otorgadas a los autores.

REFERENCIAS

- Arvizu-Higuera, D.L., G. Hernández-Carmona & Y.E. Rodríguez-Montesinos. 1996. Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción en el proceso de obtención de alginato de sodio a partir de *Macrocystis pyrifera*. *Cienc. Mar.*, 22(4):511-521.
- Arvizu-Higuera, D.L., G. Hernández-Carmona, & Y.E. Rodríguez-Montesinos. 1997. Efecto del tipo de precipitación en el pro-

- ceso de obtención de alginato de sodio: método de alginato de calcio y método de ácido alginico. *Cienc. Mar.*, 23(2):195-207.
- Casas-Valdéz, M.M. 1982. Avance para la industrialización de los alginatos en México. *Serie Téc. CICIMAR*, 1:20 p.
- Casas-Valdéz, M.M. 1985. Cuantificación y caracterización parcial de alginatos procedentes de algunas especies de algas feofitas de las costa de México. *Inv. Mar. CICIMAR*, 2(1):46-58.
- Clare, K. 1993. Algin, 105-143. *En: Whistler, R.L. & J.N. BeMiller (Eds.) Industrial gums. Polysaccharides and their derivatives.* Academic Press, Inc. 236 p.
- Hernández-Carmona, G. 1985. Variación estacional del contenido de alginatos en tres especies de feofitas de Baja California Sur, México. *Inv. Mar. CICIMAR*, 2(1):29-45.
- Hernández-Carmona, G. & M. Aguirre-Vilchis. 1987. Propiedades de intercambio iónico de *Macrocystis pyrifera* durante la pre-extracción ácida, para la extracción de alginatos. *Inv. Mar. CICIMAR*, 3(2):53-64.
- Hernández-Carmona, G., Y.E. Rodríguez-Montesinos, J.R. Torres-Villegas, I. Sánchez-Rodríguez & M.A. Vilchis. 1989a. Evaluación de los mantos de *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta, Laminariales) en Baja California, México, I. Invierno 1985-1986. *Cienc. Mar.*, 15(2):1-27.
- Hernández-Carmona, G., Y.E. Rodríguez-Montesinos, J.R. Torres-Villegas, I. Sánchez-Rodríguez, M.A. Vilchis & O. García-De la Rosa. 1989b. Evaluación de los mantos de *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta, Laminariales) en Baja California, México. II Primavera 1986. *Cienc. Mar.*, 15(4):117-140.
- Hernández-Carmona, G., Y.E. Rodríguez-Montesinos, M.M. Casas-Valdéz, I. Sánchez-Rodríguez & M. Aguirre-Vilchis. 1991. Evaluación de los mantos de *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta, Laminariales) en Baja California, México. III. verano de 1986 y variación estacional. *Cienc. Mar.*, 17(4):121-145.
- Hernández-Carmona, G., Aguirre-Vilchis, M. & Rodríguez-Montesinos, Y.E. 1992. Recirculación del ácido residual de la etapa de pre-extracción en el proceso de obtención de alginato de sodio en la misma etapa. *Cienc. Mar.*, 18(1):125-137.
- Hernández-Carmona, G., D.J. McHugh, D.L. Arvizu-Higuera, & Y. E. Rodríguez-Montesinos. 1999. Pilot plant scale extraction of alginate from *Macrocystis pyrifera*. 1. Effect of pre-extraction treatments on yield and quality of alginate. *J. Appl. Phycol.*, 10:507-513.
- Lobban, C.S. & P.J. Harrison. 1994. *Seaweed ecology and physiology.* Cambridge University Press. 366 p.
- McHugh, D.J. 1987. Production, properties and uses of alginates, 58-115. *En* McHugh, D.J. (Ed.) *Production and utilization of products from commercial seaweeds.* FAO Fish. Tech. Pap. 288:189 p.
- Ortega-Ceseña, G. & A. Zaragoza-García. 1983. *Determinación de los parámetros de extracción de ácido alginico del alga café Macrocystis pyrifera.* Tesis de Licenciatura. UABC, Ensenada, México. 103 p.
- Rivera-Carro, H. 1984. *Block structure and uronic acid sequence in alginates.* Norw. Inst. of Mar. Bioch. PhD Thesis. 144 p.
- The Nutra Sweet Kelco Company (NKC). 1996. *Alginates.* San Diego, California. Monsanto Company. 32 p.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis.* Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 718 p.