

Estudio de la cristalización térmicamente inducida en suero de soja liofilizado

Study of thermally induced crystallization in lyophilized soybean whey

Sobral P (1), Wagner J (2)

(1) Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA)
Facultad de Ciencias Exactas (UNLP-CONICET), 47 y 116 (B1900AJJ) La Plata, Provincia de Buenos Aires,
Argentina.

(2) Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Roque Sáenz Peña 352
(B1876BXD) Bernal, Pcia. de Buenos Aires, Argentina
jwagner@unq.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del tratamiento térmico y las condiciones de almacenamiento sobre la cristalización de azúcares en suero de soja liofilizado (SSL). El SSL se preparó por liofilización del suero de soja, que queda como sobrenadante isoeléctrico de la obtención de aislados. Los componentes mayoritarios del SSL son los carbohidratos (sacarosa y los oligosacáridos estaquiosa, rafinosa y verbascosa) seguido de los factores antitripticos de Kunitz y Bowman-Birk y de la lectina (todos con actividad biológica), con una relación carbohidratos: proteína total de 3: 1. El análisis por calorimetría diferencial de barrido (DSC) en condiciones anhidras, del SSL almacenado sin previo tratamiento térmico, presentó una endoterma correspondiente a la fusión de cristales de azúcares con una temperatura de pico (T_p) a $\approx 65^\circ\text{C}$. Se prepararon muestras de SSL tratado térmicamente en cápsulas selladas herméticamente y en condiciones anhidras, a una velocidad de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 180°C , temperatura a la cual las proteínas de suero se desnaturalizan totalmente y alcanzan la máxima glicosilación. Las cápsulas con SSL calentado (SSLC), se enfriaron 30 min. en hielo-agua y se almacenaron a temperatura ambiente, bajo dos condiciones: cápsula cerrada y cápsula abierta en ambiente deshidratado ($HR \approx 0$). Las muestras SSLC almacenadas a distintos tiempos se analizaron por DSC para evaluar el grado de cristalización de azúcares. Los termogramas de SSLC almacenado ≈ 4 hs en cápsula cerrada no evidencian transiciones; luego de 15 días de almacenamiento los termogramas presentan una transición ($T_p = 161,9^\circ\text{C}$; $\Delta H = 127,2 \text{ J/g}$) atribuible a la fusión de cristales formados durante el almacenamiento. Las muestras SSLC almacenados en cápsula abierta presentan luego de 12 días de almacenamiento, dos transiciones con $T_p = 147,4$ y $190,1^\circ\text{C}$ con $\Delta H = 3,2$ y $21,8 \text{ J/g}$, respectivamente. Estas diferencias se atribuyen a que el agua liberada dentro de la cápsula durante el calentamiento (por reacción de Maillard y/o caramelización), si queda atrapada dentro de la cápsula (cápsula cerrada), contribuye a la hidratación de los cristales formados lo cual disminuye su temperatura de fusión, respecto a los cristales anhidros formados en condiciones de no confinamiento. Si en estas condiciones se prolonga el almacenamiento hasta 22 días, se obtiene una única transición ($T_p = 200,5^\circ\text{C}$; $\Delta H = 78,1 \text{ J/g}$). Se concluye que para tiempos de almacenamiento similares (12-15 días), la posibilidad de eliminar agua conduce a una menor cristalización de azúcares (5 veces menos asumiendo que entalpía \approx masa de cristales) y a una mayor estabilidad de los cristales formados ($T_p \approx 30^\circ\text{C}$ mayor). Se postula que la presencia de agua induciría la hidrólisis de oligosacáridos, dando azúcares con mayor tendencia a cristalizar. La mayor temperatura de fusión de los azúcares formados a tiempos largos de almacenamiento se atribuye a fenómenos de recristalización.

ABSTRACT

The objective of this work was to study the effect of the thermal treatment and the storage conditions on the crystallization of sugars in lyophilized soybean whey (LSW). The LSW was prepared by lyophilization of soybean whey, which is generated as isoelectric supernatant during the preparation of soy protein isolates. The more abundant components in LSW are the carbohydrates (sucrose and the oligosaccharides stachiose, raffinose and verbascose) followed by Kunitz and Bowman-Birk trypsin inhibitors and lectin (all with biological activity), with a carbohydrates: proteins ratio of 3: 1. Differential scanning calorimetry (DSC) of LSW was performed under anhydrous conditions; in

thermogram of this sample without previous thermal treatment can be identified an endotherm which correspond to the sugar melting with a peak temperature (T_p) $\approx 65^\circ\text{C}$. LSW samples were heated in anhydrous condition inside the hermetic aluminium pans using a heating rate of $5^\circ\text{C}/\text{min}$ up to 180°C ; this temperature ensures the total protein denaturation and a maximum glycosylation. Once finished the heat treatment, the pans were cooled on ice for 30 minutes, proving the samples of heated lyophilized soybean whey (LSW-H). Half of these pans were kept closed and half opened. In both conditions, samples of LSW-H were stored at 25°C and at 0% relative humidity and then, samples were analyzed to evaluate the sugars crystallization degree by DSC. LSW-H stored for over 4 hours, no evidence any transition in thermograms; after 15 days of storage, DSC thermograms have a transition ($T_p = 161.9^\circ\text{C}$, $\Delta H = 127.2\text{ J/g}$) due to melting of sugar crystals formed during storage. LSW-H samples present, after 12 days of storage in open pans, two transitions with $T_p = 147.4$ and 190.1°C ($\Delta H = 3.2$ and 21.8 J/g), respectively. These differences are attributed to the released water into the pan during the heating (due to caramelization or Maillard reaction). If this water gets trapped inside the pans (closed pans) contributes to the hydration of the crystals formed which reduces its melting temperature, compared to anhydrous crystals formed on a non-confinement. If storage is prolonged in these conditions until 22 days, a single transition ($T_p = 200.5^\circ\text{C}$; $\Delta H = 78.1\text{ J/g}$) was observed. We concluded that at similar periods of storage (12-15 days) the possibility to eliminate water conduce to a less crystallization degree (5 times less assuming enthalpy \approx crystal mass) and to greater stability of the crystals formed (T_p 30°C bigger). We hypothesize that the presence of water would lead to hydrolysis of oligosaccharides, giving sugar to a greater tendency to crystallize. The highest melting temperature of the sugars crystal formed during a long storage time is attributed to recrystallisation phenomena.

PALABRAS CLAVE: *Suero, soja, liofilizado, cristalización, almacenamiento.*

KEYWORDS: *Whey, soybean, lyophilized, crystallization, storage.*

INTRODUCCIÓN

La producción tradicional de aislados genera un líquido residual denominado suero de soja el cual contiene cerca del 25% de las proteínas del grano, la mayoría de ellas biológicamente activas (Pearson 1983, Cheftel *et al.* 1989). Este suero, aunque es generalmente descartado, contiene proteínas, hidratos de carbono, isoflavonas, minerales, vitaminas, pudiéndose por lo tanto convertirse en un subproducto utilizable tanto por su valor nutricional como funcional.

Las proteínas mayoritarias que contiene el suero de soja son la lectina y los factores antitripticos de Kunitz y de Bowman-Birk, que fueron identificados por SDS-PAGE (Iwabuchi y Yamauchi 1987) y sus propiedades térmicas y superficiales estudiadas por Sorgentini y Wagner (1999). Sin embargo los componentes mayoritarios del suero de soja son los hidratos de carbono solubles, entre ellos el más abundante es la sacarosa, seguido de la estaquiosa (oligosacárido típico de la soja) y trazas de glucosa, xilosa y fructosa (Espinosa-Martos *et al.* 2006, Espinosa-Martos y Rúperez 2006).

Se presentan dos inconvenientes en el uso directa del suero de soja en alimentación humana, uno es la alta dilución del suero, ya que el contenido de sólidos totales no supera el 3% p/v (Sobral y Wagner 2009); el otro es que los factores antinutricionales están activos requiriendo un tratamiento térmico para su activación. Una estrategia posible es secar el suero y realizar la inactivación en estado deshidratado. El suero de soja deshidratado contiene 10,7% de proteínas, 6,9 % de NNP, 55% de hidratos de carbono y 13,4 % de minerales. Trabajos previos permitieron establecer que para lograr la desnaturalización de los inhibidores de tripsina en condiciones anhidras se tienen que alcanzar los 150°C y que con un tratamiento hasta 180°C , además de la inactivación se producen reacciones de glicosilación y caramelización debido al alto contenido de azúcares del suero (Sobral y Wagner 2007). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de un tratamiento térmico que asegure la inactivación de los factores nutricionalmente indeseables sobre la cristalización y recrystalización de los oligosacáridos presentes en función del tiempo y las condiciones de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El suero de soja (SS) fue obtenido según el procedimiento descrito por Sorgentini y Wagner (1999), siendo el sobrenadante isoeléctrico resultante de la preparación de aislado nativo. El extracto acuoso a pH 8 de una harina de soja desgrasada (Prosam R, Solae, Brasil) en relación agua: harina 10:1 se llevó a pH 4,5 con HCl 2 N y se centrifugó (10500 g, 20 min., 4°C) para separar las globulinas de reserva del SS. El SS, en alícuotas de menos 5mm de altura, fue congelado a -80°C durante 72 hs y liofilizado (HETO FD4, -35°C, 500 μ Torr.). El suero de soja liofilizado (SSL) se mantuvo en condiciones de humedad relativa igual a cero (P_2O_5) antes de su almacenamiento a -80°C. Luego de 125 días en estas condiciones se realizó sobre esta muestra un tratamiento térmico empleando cápsulas comerciales de aluminio (T.A. Instruments) selladas herméticamente empleando un calorímetro diferencial de barrido (Polymer Laboratorios, Rheometrics Scientific). Se utilizó una rampa de calentamiento de 5°C/min hasta 180°C. Finalizado el tratamiento las cápsulas fueron enfriadas (hielo, 30 min) y secadas con papel absorbente. El SSL calentado (SSLC) fue almacenado en condiciones de confinamiento (cápsulas cerradas) o de no confinamiento abriendo y recuperando el SSLC (cápsulas abiertas). Los almacenamientos fueron realizados a temperatura ambiente en atmósfera deshidratante. Finalizado el almacenamiento, el SSLC fue analizado en idénticas condiciones utilizando el mismo DSC hasta 250°C. La microestructura de las muestras fue estudiada mediante ESEM utilizando un microscopio ELECTROSCAN 2010 Environmental Scanning Electrón Microscope, el cual permite trabajar en un rango de 0-20 Torr. en presencia de vapor de agua regulando parámetros tales como presión, temperatura y humedad para la observación de muestras no conductivas, las que no requieren de preparación previa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El SSL resultó ser un producto higroscópico, lo cual puede atribuirse a alto contenido en sales ($13,4 \pm 0,30$ % p/p) y en glúcidos ($\approx 55\%$ p/p), algunos de estos son muy hidratables (rafinosa.5H₂O) (Sobral y Wagner 2007). A una humedad relativa del 75% se produce un incremento de su masa en un $9,08 \pm 1,55$; $20,78 \pm 1,40$ y $34,18 \pm 1,26$ % p/p en 30, 120 y 450 min., respectivamente. Esta alta velocidad de hidratación determinó que el SSL fuese conservado en condiciones de humedad relativa igual a cero.

El SSL anhidro tiene aspecto de polvo color arena formado por partículas sueltas. Se sabe por trabajos previos (Sobral y Wagner 2007) que el SSL almacenado a -80°C en condiciones anhidras analizado por calorimetría diferencial de barrido presenta una Tg del sistema próxima a -3.3°C y un pico endotérmico (Fa) a aproximadamente 65°C que correspondería a la fusión de micro cristales de azúcares no observables por ESEM (**Figuras 1 y 2**). Entre 100 y 180°C el termograma presenta una gran transición exotérmica correspondiente a la glicosilación de las proteínas presentes dentro de la cual la desnaturalización de las principales fracciones proteicas se presenta como sub-transiciones endotérmicas I y II (**Figura 2**). Por encima de los 180°C (máximo de glicosilación) el termograma cae bruscamente alcanzando su mínimo en 200°C lo que corresponde a reacciones de descomposición y carbonización.

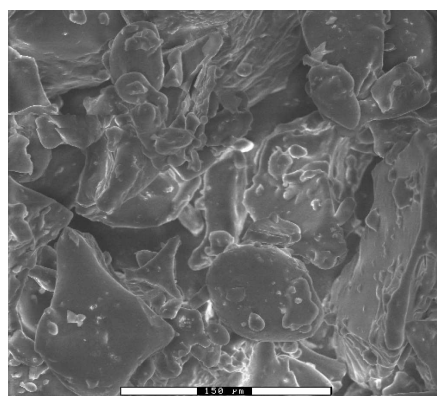


Figura 1. Microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) de muestra de suero de soja liofilizado no tratado térmicamente analizado con un aumento de 290X. El aspecto de la muestra es el de una matriz amorfa con una distribución de tamaño de gránulos causada por el proceso de molienda propiamente dicho; en la parte inferior de la micrografía se inserta una barra de referencia de tamaño de 150 μ m.

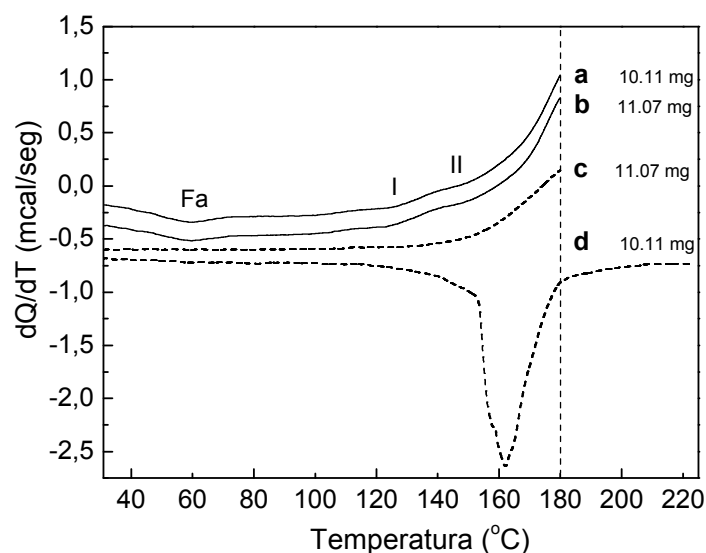


Figura 2. Los termogramas **a** y **b** (—) corresponden al tratamiento térmico en condiciones de confinamiento aplicado al SSL hasta 180°C (rampa 5°C/min.). Los termogramas **c** y **d** (---) corresponden a las cápsulas **b** y **a**, respectivamente, enfriadas y almacenadas cerradas a Tamb y vueltas a analizar por DSC en las mismas condiciones. Los tiempos de almacenamiento fueron: **c**) 2 hs y **d**) 15 días. Se indican las masas de muestra SSL empleadas.

Para analizar el efecto del almacenamiento de una muestra de SSL previamente sometida a calentamiento se eligió el tratamiento a 180°C. A esta temperatura los cristales de azúcar preexistentes fueron fundidos y se produjeron todas las reacciones esperables en el suero liofilizado. A simple vista el SSL tratado hasta 180°C (SSLC180) es un caramelo de color pardo-rojizo. Debido al alto contenido en azúcares es de suponer que en el SSLC180, enfriado y almacenado, luego de un tiempo suficiente, cristalicen dichos azúcares. Debido a las reacciones de glicosilación y caramelización la cristalización puede producirse de un modo diferente que en el suero no calentado. También es esperable que influyan las condiciones de almacenamiento. Las características térmicas de la nueva forma cristalina adoptada por la muestra almacenada serán evidenciadas en un segundo ensayo de DSC por la temperatura y área de la endoterma de fusión de los cristales formados. Los termogramas del SSLC180 almacenado en condiciones de confinamiento (cápsula cerrada), son mostrados en la **Figura 2**. Los dos termogramas ubicados en la parte superior corresponden al comportamiento térmico (primer corrida) del SSL el cual presenta la transición Fa correspondiente a la fusión de cristales de azúcares sin glicosilación (generados por recrystalización durante el almacenamiento a -80°C). En los termogramas inferiores se observa el comportamiento térmico (segunda corrida) del SSLC180 luego de diferentes tiempos de almacenamiento. Se observa que para tiempos de almacenamiento muy cortos (2 hs.) el termograma obtenido adopta una forma similar a los del primer ensayo pero sin la presencia de las transiciones Fa, I y II, por haberse fundido los cristales sin detectarse una nueva cristalización y haberse desnaturado totalmente las proteínas del suero. El tiempo de almacenamiento no es suficiente como para permitir ninguna clase de reordenamiento estructural, aun cuando a temperatura ambiente se está por encima de la Tg del sistema. Por el contrario, luego de un almacenamiento mas prolongado (15 días) se forman cristales de azúcares con una estructura bastante estable, lo que se traduce en una transición con una alta temperatura de pico ($T_p = 161,9^\circ\text{C}$); transición que presenta además una elevada entalpía de fusión ($\Delta H = 127,2 \text{ J/g}$).

Los termogramas obtenidos con el SSLC180 almacenado en condiciones deshidratantes (cápsula abierta) son mostrados en la **Figura 3**. Luego de 12 días de almacenamiento aparecen dos transiciones: una a 147,4°C ($\Delta H = 3,2 \text{ J/g}$) y otra de mayor área a 190,1°C ($\Delta H = 21,8 \text{ J/g}$). Si el almacenamiento se prolonga, vemos que luego de 22 días se observa una única transición con mayor temperatura y entalpía de fusión ($T_p = 200,5^\circ\text{C}$; $\Delta H = 78,1 \text{ J/g}$). Resulta evidente que la posibilidad de eliminar agua juega un papel importante tanto en la formación como en la temperatura de fusión de los cristales de azúcares. Considerando tiempos de almacenamiento similares (12-15 días) con la cápsula cerrada, la cristalización es seis veces superior ($\Delta H = 161,9 \text{ J/g}$) que con cápsula abierta ($\Delta H = 25 \text{ J/g}$). Para esto

asumimos que el área de pico \approx entalpía de fusión \approx masa de cristales formados. Con relación a la estabilidad de los cristales formados en condiciones de confinamiento, los mismos tienen una T_p casi 30°C menor que cuando la cápsula está abierta, considerando para este segundo caso la transición más importante.

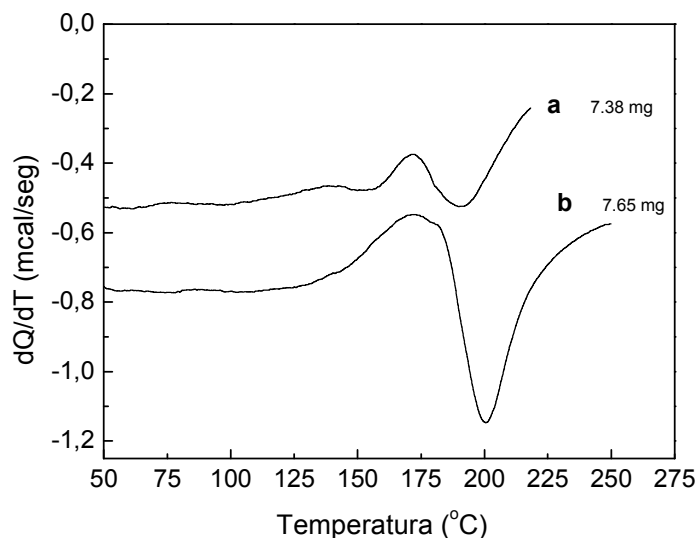


Figura 3. Termogramas DSC correspondientes a SSLC180 almacenado a temperatura ambiente fuera de la cápsula en desecante durante: **a)** 12 días; **b)** 22 días. Junto a cada termograma se indican las masas de muestra empleada.

El análisis en conjunto de los valores de entalpía y temperatura de las transiciones, indica que en condiciones de confinamiento se forma una cantidad 6 veces mayor de cristales pero menos estables debido a la retención del agua. En condiciones idénticas de almacenamiento (no-confinamiento), podemos analizar el fenómeno de recristalización. En la **Figura 3** pudo verse que luego de 12 días de almacenamiento en estado deshidratado el SSLC tiene por lo menos dos poblaciones de cristales de azúcares con diferente temperatura de fusión; luego de 22 días de almacenamiento se genera una única población de cristales con una mayor estabilidad (mayor T_p) debidos tanto a un fenómeno de recristalización como a la eliminación del agua y por lo tanto la reducción de efecto plastificante. Estos cristales debido a su gran tamaño pueden visualizarse fácilmente por ESEM (**Figura 4**). Además de los cristales (indicados como C) se puede observar en la micrografía (**Figura 4a**) un mayor grado de compactación y la aparición de estructuras tales como puentes (B) que conectan y unen porciones del liofilizado que antes del tratamiento térmico se encontraban separadas y huecos (H) que son las “huellas” dejadas en la matriz por los productos gaseosos generados durante el calentamiento. Estos productos pueden ser gases preexistentes eliminados (CO_2 , O_2) o puede haber adoptado ese estado como consecuencia del desprendimiento de vapores generados por el tratamiento térmico (H_2O , NH_3). De esta manera, durante el tratamiento térmico ocurre en forma simultánea la reacción de pardeamiento enzimático la cual genera productos gaseosos que no pueden escapar (por el sellado de la cápsula); lo que ocasiona un aumento de la presión dentro de la cápsula. Estos gases bajo presión se acumulan y forman burbujas las cuales deforman el material (hecho también facilitado por la alta temperatura que incrementa la plasticidad de la matriz) y originan las cavidades que persisten luego del enfriamiento originando los huecos vistos.

Si bien hasta el momento se dijo que 180°C es la temperatura en la que se alcanza el máximo grado de glicosilación, no hay razones para suponer que estos procesos tengan influencia sobre la tendencia a la cristalización de los azúcares, sino por el contrario, si estos toman parte de una glicosilación quedarían menos libres para cristalizar. A fin de explicar la mayor tendencia a la formación de cristales de azúcares en el SSLC 180°C se deben recurrir a otras hipótesis. En principio, sabemos que más del $\approx 55\%$ p/p del SSL es de azúcares (proteínas < 18%) y que estos son mayoritariamente oligosacáridos. En segundo lugar ya observamos que tienen muy poca tendencia a cristalizar, ya que ensayos con SSL calentados a 90°C (en los que los azúcares fueron totalmente fundidos) no cristalizan luego del enfriamiento y almacenamiento similares a los descritos en este trabajo. Se puede inferir entonces que el calentamiento a temperaturas tan altas en las que se producen reacciones de Maillard y

caramelización en las cuales hay liberación de agua, esta promueve la hidrólisis de los oligosacáridos. Esta hidrólisis aumenta la cantidad de azúcares simples con mayor tendencia a la cristalización. Cuando el almacenamiento se realiza en cápsula cerrada, el agua generada durante el tratamiento térmico permanece retenida y puede producir cristales hidratados los cuales tienen menor T_f que los correspondientes cristales anhidros. La fusión de azúcares puros ocurre a mayor temperatura en cristales anhidros: la D-glucosa anhidra (monosacárido) tiene una T_f de 146°C, temperatura que se reduce a 86°C para la α -D-glucosa. \cdot H₂O; un disacáridos como la maltosa en estado anhidro funde en un rango comprendido entre 160 a 165°C mientras que en su forma hidratada maltosa. \cdot H₂O se reduce a 102-103°C (Ross 1993). Estos valores apoyan el hecho que la presencia de pequeñas cantidades de agua durante la cristalización pueden permitir la formación de especies cristalinas hidratadas, las cuales tienen T_f sensiblemente menores a la correspondientes formas anhidras; además hay que tener presente que uno de los sacáridos típicamente presentes en soja es la rafinosa, la cual tiende a hidratarse con 5 moléculas de agua, especie que tiene una T_f de 80°C determinada por DSC (Roos 1993). De esta forma tenemos en un comienzo dentro de la cápsula de DSC un ambiente con HR=0; en la medida que la temperatura se eleva (durante el primer tratamiento térmico) se produce en una primera instancia la fusión de los cristales de azúcares que se completa a \approx 75°C y cuando supera los 100°C comienza la liberación de productos de Maillard tales como furfural, NH₃, CO₂ y H₂O, la cual en condiciones de confinamiento queda atrapada aumentando la HR del ambiente. Además, como toda transición de primer orden, la fusión de los azúcares (aun los que no se hidratan) se produce a una menor temperatura en presencia de agua (Roos 1993), lo que explica la marcada diferencia en las temperaturas de fusión de los cristales para tiempos de almacenamientos similares dependiendo de si el agua fue o no eliminada.

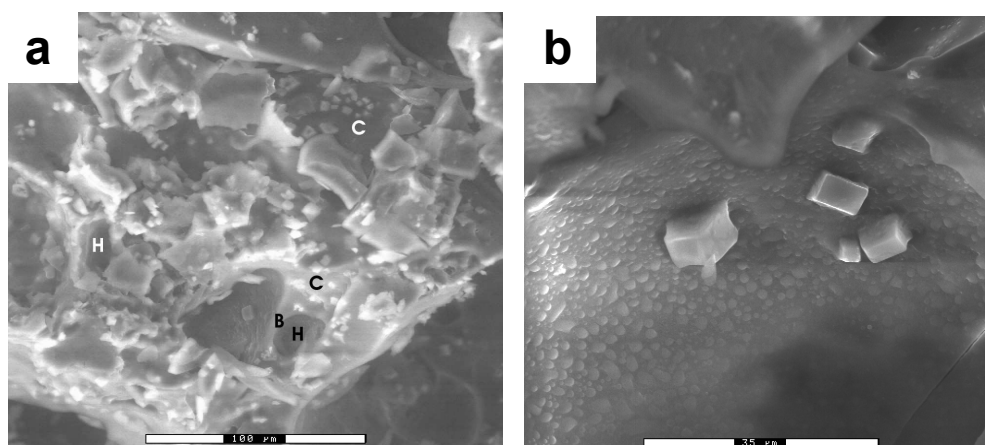


Figura 4: ESEM de muestra de suero de soja liofilizado, tratado térmicamente hasta 180°C (SSL180) con un aumento de 400X (a) y 1300X (b). Al pie de las mismas se incluyen escalas de referencia de 100 y 35 μ m.

CONCLUSIONES

El calentamiento en condiciones controladas del suero de soja liofilizado conduce a la formación de una matriz tipo caramelo como resultado de reacciones de glicosilación, agregación proteica y caramelización de oligosacáridos.

Después de enfriamiento y con un almacenamiento no muy prolongado, se induce la formación de cristales de azúcares en el caramelo enfriado. Esta cristalización desencadenada por el tratamiento térmico se atribuye a la formación de azúcares simples como resultado de la hidrólisis de los oligosacáridos típicos de soja a alta temperatura en presencia del agua liberada.

El tipo, la estabilidad y la cantidad de cristales de azúcares formados dependen en gran medida del tiempo de almacenamiento que se da para el reordenamiento cristalino así como de la posibilidad de eliminar agua.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo dado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) por los subsidios PICT 2002-09-10768 y PICTO-UNQ 2006-36473 y en forma especial, el apoyo financiero de la Universidad Nacional de La Plata y la Universidad Nacional de Quilmes (Programa I+D 53/1007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. 1989. Proteínas Alimentarias. Zaragoza. Acribia S.A. Pág. 364.

Espinosa-Martos I, Préstamo G. Composición y Propiedades del Suero de Soja, un subproducto de la elaboración del tofu. Alimentaria, marzo: 72-73.

Espinosa-Martos I, Rupérez P. 2006. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional food, Nutr. Hosp. 21: 92-96.

Iwabuchi S, Yamauchi F. 1987. Electrophoretic analysis of whey proteins present in soybean globulin fractions. J. Agric. Food Chem. 35: 205-209.

Pearson AM. 1983. Soy proteins. En: Hudson BJF, editors. Developments in Food Protein. 2^{da} edición. Londres: Applied Science. pag. 67-108.

Sobral PA, Wagner JR. 2007. Thermal properties of soybean whey and its protein. En: Lupano CE editor. Functional Properties of Food Components. 1^a ed. Kerala: Research Signpost. Pág.. 57-76.

Sorgentini DA, Wagner JR. 1999. Comparative study of structural characteristics and thermal behavior of whey and isolate soybean proteins, J. Food Biochem. 23: 489-507.

Roos YH. 1993. Food Components and Polymers En: Taylor SL editor. Phase Transitions in Foods. 2^a ed. San Diego: Academic Press. pag 109-156.