

VERIFICAÇÃO E ADEQUAÇÃO DAS METODOLOGIAS DE ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE CLOROFILA A EM AMOSTRAS DE ÁGUA.

SCHWARZBOLD, A.; PEDROZO, C. DA S.; MIRANDA, A. L. B.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Ecologia.

Albano@ecologia.ufrgs.br

RESUMO: Verificação e adequação das metodologias de análise espectrofotométrica para a identificação de clorofila a em amostras de água.

Um convênio da Prefeitura Municipal de Porto Alegre (DMAE - Departamento Municipal de Águas e Esgotos) com o Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul foi firmado no sentido de adequar os métodos para a análise de clorofila a. Neste trabalho foram testados seis procedimentos, todos utilizando no mínimo 5 réplicas: 1. Concentração da amostra: foram usados 3 tipos diferentes de filtros: GF/C (1,20 μm) e GF/F (0,65 μm); Whatman (fibra de vidro) e Sartorius (0,45 μm) (acetato de celulose). 2. Relação entre volume filtrado e tempo de filtração: foram testados dois volumes (300 ml e 500 ml). 3. Tempo de estocagem do extrato: 6 e 24 horas. 4. Duração e rotação de centrifugação: 5, 10 e 15 minutos / 3000 rpm e 5000 rpm. 5. Alcalinização da acetona 90% com NH_4OH . 6. Normalidade do HCL e tempo de acidificação para concentração da feofitina. Os resultados obtidos mostraram que o melhor filtro utilizado foi o de acetato de celulose (Sartorius), onde se observou o menor coeficiente de variação (5%) entre as cinco réplicas testadas. O filtro GF/F apesar de apresentar um coeficiente de variação alto (26%), mostrou-se mais rápido no tempo de filtração, tendo sido então utilizado nas etapas posteriores. Em relação ao volume filtrado, 300 ml de amostra mostrou-se o mais adequado. Para o tempo de estocagem do extrato, obteve-se que tanto 6 horas como 24 horas podem ser utilizados. Para garantir baixa turbidez da amostra, deve-se utilizar uma rotação de centrifuga de 5000 rpm durante 10 minutos. A alcalinização da acetona com NH_4OH mostrou-se um procedimento dispensável, já que não foi encontrada diferença significativa entre sua utilização ou não. A normalidade do ácido pode variar entre 0,5 e 4 N, desde que o tempo de degradação da clorofila se complete.

Palavras-Chave: Clorofila, metodologias analíticas, fitoplâncton

ABSTRACT: Adjust of the methodologies of spectrophotometric analysis of chlorophylla in water samples. A cooperation project was made

with Prefeitura Municipal de Porto Alegre (DMAE - Departamento Municipal de Águas e Esgotos) and the Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul to adequate analyses of Chlorophyll by standard methods. In this work six assays were tested: 1. Sample concentration: three different kinds of filter were used; GF/C (1,20 μm) and GF/F (0,65 μm) Whatman (glass fibre) and Sartorius (0,45 μm) (celulose acetate). 2. Relation with filtrate volume and filtration time: two volumes were tested (300 ml and 500 ml). 3. Time of extract store: 6 and 24 hours. 4. Time and centrifuge rotation: 5, 10 and 15 minutes/3000 and 5000 rpm. 5. Acetone 90% with addition of NH_4OH . 6. HCL normality and time of acidification to obtain phaeophytin. The results showed that the best filter was the cellulose acetate (Sartorius), which presented less variation coefficient (5%) between the five tested replies. The GF/F filter, despite a great variation coefficient (26%), show a fast filtration time and for this reason was used in the posterior stages. A sample volume of 300 ml showed as more adequated. About the time of extract stored, both 6 and 24 horas could be used. To obtain a small sample turbidity it should be used a 5000 rpm rotation during 10 minutes. The results with the addition of NH_4OH to acetone showed no significative results and this practice could be dispensable. The acid normality could variate between 0,5 and 4 N.

Key-Words: Chlorophyll, Analitical methodologies, fhytoplankton.

INTRODUÇÃO

A extração e medida da clorofila é um procedimento com muitas etapas, que pode ser realizado de diferentes maneiras. Torna-se mais complicada pela presença de muitos tipos de clorofila (a, b, c, d) e feopigmentos com similares picos de absorção em análise espectrofotométrica. Existe uma variedade de problemas na metodologia utilizada para estimar a concentração de pigmentos do fitoplâncton em ambientes aquáticos tanto de água doce quanto de água do mar. Rai (1980) cita alguns problemas na determinação da clorofila como a quebra da célula durante a extração com solventes, o conteúdo de água ligado a possibilidade de oxidação enzimática ou hidrólise, a acidificação, entre outros.

Os métodos e o material a serem utilizados são amplamente discutidos. Alguns autores ressaltam a eficiência de diferentes solventes como a acetona 90%, o metanol e o etanol na extração de pigmentos de certas algas, particularmente membros de clorofíceas e cianofíceas. Algumas técnicas de maceração têm sido utilizadas para a obtenção da completa extração, segundo Marker (1972).

Nusch & Palme (1975) compararam acetona, metanol e etanol observando a maior eficiência de etanol e metanol e menor de acetona 90%. Embora o metanol seja considerado um agente extrator mais potente, ainda não tem sido usado em larga escala como a acetona 90%, a despeito de que algumas algas como *Cladophora* e *Vaucheria* só podem ser extraídas em metanol.

No sentido de adequar a metodologia já padronizada para a análise de clorofila *a* e feofitina àquela usada pela Divisão de Pesquisa do DMAE foi firmado o convênio entre Prefeitura Municipal de Porto Alegre e o Centro de Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Este convênio buscou avaliar os procedimentos de análise de clorofila *a* atualmente em uso na Divisão de Pesquisa desse órgão, verificar alternativas que garantissem a reprodutibilidade e precisão nas análises e propor uma metodologia adequada às características das amostras analisadas e às condições técnicas do laboratório.

METODOLOGIA

As coletas de água para todas as etapas do projeto foram feitas no Reservatório da Lomba do Sabão, DMAE, no município de Porto Alegre, com galão de PVC. Estas amostras foram processadas inicialmente seguindo-se o método da absorção espectrofotométrica de Richards & Thompson (1952). O solvente utilizado em todas as etapas dos testes foi acetona 90%.

O cálculo da concentração da clorofila *a* baseou-se em Golterman et al. (1978).

A análise estatística dos dados foi feita através da utilização dos testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, teste *t* e Anova apresentados em Zar (1974).

O exame da metodologia de análise seguiu as etapas a seguir descritas:

Teste da Concentração da amostra (Filtração)

Foram testados 3 tipos diferentes de filtros em 5 réplicas para minimizar o efeito da turbidez nas leituras do espectrofotômetro, eliminar problemas de heterogeneidade amostral, minimizar erros de manipulação e verificar a uniformidade da porosidade dos filtros:

1.1a. Filtro de fibra de vidro com porosidade aproximada de 1,20 μm , tipo GF/C - Whatman;

1.1b. Filtro de fibra de vidro com porosidade 0,65 μm , tipo GF/F -Whatman;

1.1c. Filtro de acetato de celulose com porosidade 0,45 μm , marca Sartorius.

As amostras foram filtradas logo que chegaram ao laboratório, num volume de 300 ml cada uma, no escuro. O filtro foi mantido em acetona 90% em tubos de ensaio no refrigerador a 4 °C por vinte e quatro horas. Após, os filtros foram macerados e devolvidos aos tubos de ensaio para centrifugação durante 10 minutos com uma rotação de 3.000 rpm em temperatura ambiente.

Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante de cada tubo de ensaio; completando-se o seu volume em balões volumétricos de 10 ml para posterior leitura em espectrofotômetro marca ZEISS modelo PM2K.

Teste da Relação do volume filtrado da amostra e tempo de duração da filtração.

Nesta etapa, optou-se pela utilização de filtros de fibra de vidro de baixa porosidade, tipo GF/F e de acetato de celulose marca Sartorius ambos com 50 mm de diâmetro.

Para o filtro de fibra de vidro (GF/F) foram filtrados 300 ml, 500 ml e 1000 ml de água com 5 réplicas para cada volume e para o filtro Sartorius foram filtrados 300 ml e 500 ml. O método de análise seguiu a etapa anterior.

Teste do Tempo de Estocagem do Extrato

Optou-se pela utilização de filtros de fibra de vidro tipo GF/F de diâmetro de 50 mm. O experimento mediu a possível influência do tempo de estocagem sobre a degradação da clorofila no extrato. Este permaneceu na geladeira, no escuro, a 4 °C durante 6 e 24 horas com 8 e 7 réplicas para cada tempo, respectivamente.

Teste da Duração, Rotação e Temperatura da Centrifugação

Foi realizado em duas rotações diferentes sendo elas 3000 rpm e 5000 rpm em três tempos: 5, 10 e 15 minutos na rotação de 5000 e 10 minutos na rotação de 3000. Para testar a temperatura foi utilizada uma centrífuga refrigerada a 4 °C onde o tempo de centrifugação foi de 15 minutos a 5000 rpm; 5 réplicas para cada tempo foram utilizadas.

Teste da Alcalinização da Acetona 90% com a utilização de NH₄OH

Foram testadas em 5 réplicas a utilização da acetona 90% com adição de NH₄OH cujo pH foi de 8,0 e em outras réplicas, acetona 90% sem a adição de NH₄OH cujo pH foi de 6,0.

Teste da Normalidade do HCl e Tempo de Acidificação para a obtenção da feofitina

Para o teste da acidificação do extrato utilizou-se o volume de 0,2 ml de HCl nas concentrações de 0,5N, 1N, 2N e 4N em cubetas de 1 cm de passo óptico. Também foram utilizadas 5 réplicas para cada normalidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste 1- Concentração da Amostra (Filtração)

Os resultados desta primeira etapa são apresentados nas tabelas I e II. Nós observamos que o filtro GF/C apresentou o maior coeficiente de variação (28%) e uma menor média (1,97 µg/L) para os valores de clorofila *a*. Estes resultados podem indicar que o filtro GF/C não retém eficientemente as algas contidas na amostra, além de apresentar baixa uniformidade de porosidade. Os filtros GF/F e Sartorius apresentaram maiores médias de concentração (3,46 e 3,32 mg/L, respectivamente) indicando uma maior eficiência na retenção das algas da mostra. A análise estatística dos dados mostrou que houve diferença significativa entre os resultados do filtro GF/C e os demais filtros. GF/F e Sartorius não apresentaram diferença entre si. A partir destes resultados podemos inferir, para esta primeira

etapa, que o melhor filtro a ser utilizado em análises de clorofila é o de acetato de celulose marca Sartorius ou similar, com 0,45 μm de porosidade porque, embora não se tenha obtido a maior média de concentração de clorofila, obteve-se maior precisão dos dados. A única restrição ao seu uso é o fato de entupir rapidamente quando a amostra é turva, limitando o volume filtrado. Estes resultados mostram que se o pesquisador decidir trabalhar como filtro GF/F (26% de coeficiente de variação) em detrimento do Sartorius (5%), este trabalho deve ter mais de uma réplica para que a média dos valores de clorofila seja representativa.

Edler (1979) e Wetzel (1990) recomendam que se use o filtro GF/F porque retém partículas maiores do que 0,7 μm .

Tabela I. Resultados de clorofila *a* para as amostras de água coletadas no reservatório da Lomba do Sabão. Teste da concentração da amostra.

Tipo de Filtro	N	Clorofila ($\mu\text{g/L}$)		C.V (%)
		(mín.-máx.)	média	
GF/C	5	(1,15-2,67)	1,97	28
GF/F	5	(2,26-4,52)	3,46	26
Sartorius	5	(3,01-3,39)	3,32	5

Tabela II. Resultados da análise da concentração de clorofila *a* nos filtros GF/C, GF/F, Sartorius (Teste de Tukey).

Grupo	Identificação	Clorofila ($\mu\text{g/L}$) Média	Grupo	
			1	3 2
1	Filtro GF/C	1,97	\	
2	Filtro GF/F	3,46	* \	
3	Filtro Sartorius	3,32	* . \	

* = Diferença significativa ($p = 0,05$).
Valor Tukey (3,12) = 3.77

. = Sem diferença significativa
 $s = 0,385$

Teste 2 - Relação do volume filtrado da amostra e o tempo de duração da filtração

Para o filtro GF/F, os resultados da tabela III mostraram que, aumentando-se o volume da amostra e em consequência o tempo de filtração, os valores das médias de clorofila *a* diminuíram. Desta forma, embora a análise estatística não mostrasse diferença significativa entre os 3 diferentes volumes e seus distintos tempos de filtração, pode-se decidir pela utilização do menor volume, já que os coeficientes de variação de cada volume foram bastante próximos. A questão que poderá limitar a filtração de menores volumes é quando as águas em estudo apresentam baixas concentrações de algas, levando a leituras espectrofotométricas nos limites inferiores de detecção da absorbância. Neste caso, serão as características do espectrofotômetro e da amostra a analisar que irão definir o volume a filtrar. Nusch (1983) comenta que em caso de águas oligotróficas é necessário usar cinco litros em determinações espectrofotométricas. E, águas eutróficas um litro ou menos é suficiente para obter-se uma absorbância razoável. Ainda, se o volume a ser filtrado tem muitos sólidos suspensos, pode-se usar um filtro de 5 a 10 cm de diâmetro.

Para o filtro Sartorius, observou-se uma diminuição bastante grande do valores de concentração de clorofila *a* quando os volumes e seus consequentes tempos de filtragem aumentaram. A análise estatística mostrou diferença significativa entre os dois diferentes volumes, ou seja, 300 ml e 500 ml. Este resultado é explicado pelo grande coeficiente de variação obtido para aquelas amostras cujo volume foi de 500 ml e que levaram bastante tempo para serem filtradas. Neste tempo, certamente a clorofila *a* foi degradada, diminuindo suas concentrações.

Embora este teste e o anterior tenham demonstrado que o filtro do tipo acetato de celulose Sartorius foi o melhor indicado em decorrência de apresentar menores coeficientes de variação se comparado ao filtro GF/F, sabe-se que o grande número e o tipo de amostras analisadas pela Divisão de Pesquisa do DMAE necessitam de uma maior rapidez e praticidade de filtragem. Neste caso o filtro Sartorius apresenta o inconveniente de entupir rapidamente e o filtro GF/F não apresenta este problema. Desta forma, nos testes seguintes foi utilizado o filtro do tipo GF/F e o volume filtrado das amostras foi de 300 ml na tentativa de obter-se ainda menores coeficientes de variação para os resultados de clorofila *a* quando usado este filtro.

Tabela III: Resultados de clorofila *a* para as amostras de água coletadas no reservatório da Lomba do Sabão. Teste da relação do volume filtrado e o tempo de duração da filtragem.

Tipo de Filtro	N	Volume filtrado (ml)	Tempo de filtração (minutos)	Clorofila ($\mu\text{g/L}$) (min.-máx.)	C.V.(%)	
					média	
GF/F	5	300	2	(2,26-5,27)	3,76	29
	5	500	5	(1,80-4,29)	3,35	28
	5	1000	2h20	(1,58-3,16)	2,64	25
Sartorius	4	300	1h10	(5,27-8,28)	6,77	18
	5	500	3h45	(1,35-6,33)	4,11	46

Teste 3 - Tempo de Estocagem do Extrato

Edler (1979) afirma que o tempo de estocagem dos filtros não pode ultrapassar mais do que oito horas e Nusch (1980) diz que a estocagem de filtros em acetona e etanol pode ser possível por quatro dias, a 4 °C no escuro, sem substancial perda de pigmento.

Nesta etapa do estudo a análise estatística dos dois diferentes tempos de armazenagem do extrato não mostrou diferença significativa sendo que se pode optar por proceder na leitura das amostras em 6 ou 24 horas sem prejuízo dos resultados finais. A tabela IV mostra médias próximas e iguais coeficientes de variação.

Tabela IV: Resultados de clorofila *a* para as amostras de água coletadas no reservatório da Lomba do Sabão. Teste do tempo de estocagem utilizando-se o filtro GF/F.

Número de réplicas	Tempo	Clorofila ($\mu\text{g/L}$) (min.-máx.)	C.V.(%)	
			média	
8	6hs	(10,54-16,19)	12,70	15
7	24hs	(8,28-14,69)	12,96	15

Teste 4 - Duração, Rotação e Temperatura da Centrifugação

A utilização de centrífuga refrigerada provocou o congelamento do precipitado sendo que, no momento da transferência do sobrenadante para o balão volumétrico, o precipitado soltou-se provocando o aumento da turbidez no extrato final. Este fato causou erros de leitura e conseqüentemente maus resultados evidenciados pelo alto coeficiente de variação que foi de 52% (tabela V).

Já os resultados apresentados pela centrifugação em temperatura ambiente (25 °C) de 3000 e 5000 rpm e em diferentes tempos mostraram baixos coeficientes de variação e médias muito próximas. A análise estatística dos dados demonstrou que não existiram diferenças significativas entre estas variáveis medidas. Neste caso, para que os resultados de turbidez sejam baixos, 10 minutos e 5000 rpm são ideais.

Tabela V: Resultados de clorofila *a* para as amostras de água coletadas no reservatório da Lomba do Sabão. Foram utilizadas 5 réplicas (N). Teste do tempo de duração, temperatura e rotação da centrifugação do extrato.

N	Tempo (min.)	Rotação rpm	Clorofila (µg/L)		C.V (%)	Temp. (°C)
			(min.-máx.)	média		
5	10	3000	(13,18-14,69)	13,93	4	25
5	5	5000	(13,93-15,82)	5,06	5	25
5	10	5000	(12,43-16,95)	14,24	13	25
5	15	5000	(12,05-14,69)	12,95	12	25
5	15	5000	(9,79- 28,25)	14,83	52	4

Teste 5 - Alcalinização da acetona 90% com a utilização de NH₄OH

Esta etapa testou o efeito da adição do NH₄OH à acetona 90% para se evitar a degradação rápida da clorofila. Cinco réplicas receberam acetona 90% alcalinizada cujo pH foi de 8,0 e outras cinco réplicas receberam acetona 90% com pH de 6,0 inalterado.

A análise estatística dos dados demonstrou que não houve diferença significativa entre as réplicas com pH 6,0 e pH 8,0 o que pode ser observado na tabela VI.

Desta forma, embora a tentativa de evitar ou diminuir a degradação rápida da clorofila aumentando-se o pH da acetona não tenha demonstrado ser necessária, a escolha do melhor pH pode ficar condicionado também ao menor coeficiente de variação obtido, ou seja, 9%.

Tabela VI: Resultados de clorofila *a* para as amostras de água coletadas no reservatório da Lomba do Sabão. Teste da alcalinização da acetona 90% com NH₄OH.

Número	pH	Clorofila (µg/L)		CV (%)
		(min.-máx.)	média	
5	6,0	(13,33-19,66)	16,90	17
5	8,0	(14,69-18,30)	16,36	9

Teste 6 - Normalidade do ácido e tempo de acidificação para a obtenção da feofitina

A acidificação do extrato de clorofila converte a clorofila em feopigmentos. A feofitinação pode ser feita diretamente na cubeta, antes de levá-la ao espectrofotômetro. Os produtos da degradação da clorofila como a feofitina ou outros pigmentos, interferem com medidas espectrofotométricas. Estes produtos da degradação podem interferir na leitura da absorbância. Em águas naturais, segundo Nusch (1980), a concentração da feofitina pode ser maior do que a concentração da clorofila.

Neste estudo a utilização de diferentes normalidades do HCl e o tempo de acidificação não apresentou diferença significativa estatisticamente (tabela VII). Portanto desde que o pH final seja ácido para obtenção da feofitina qualquer normalidade deste pode ser utilizada.

Tabela VII: Resultados de clorofila *a* para as amostras de água coletadas no reservatório da Lomba do Sabão. Teste da Normalidade do HCl e Tempo de Acidificação para a obtenção da feofitina.

N	Normalidade HCl (N)	Tempo de leitura	Clorofila ($\mu\text{g/L}$)		C.V (%)
			(min.máx.)	média	
4	0,5	imediate	(9,04-10,54)	9,69	8
4	0,5	+ 1 min	(8,66-10,54)	9,60	9
4	0,5	+ 3 min	(8,28-13,18)	10,07	22
5	1	imediate	(7,91-10,54)	9,50	8
5	1	+ 1 min	(8,28-11,30)	10,09	11
5	1	+ 3 min	(8,66-11,30)	10,01	9
5	2	imediate	(9,41-11,67)	10,63	9
4	2	+ 1 min	(10,17-10,54)	10,35	2
4	2	+ 3 min	(9,04-10,54)	9,79	7
2	4	imediate	(9,41-10,54)	9,97	8
2	4	+ 1 min	(10,17-11,67)	10,92	9
2	4	+ 3 min	(9,41-10,54)	9,97	8

CONCLUSÕES

O filtro de acetato de celulose marca Sartorius mostrou-se ideal para a análise da clorofila *a*, porém quando amostras que possuem sólidos em suspensão em excesso forem analisadas pode-se utilizar o filtro GF/F desde que, para isto, sejam utilizadas réplicas. O volume filtrado de 300 ml foi suficiente neste estudo por tratar-se de ambiente eutrófico. O tempo de estocagem em geladeira do extrato tanto de 6 horas como de 24 horas foi adequado, podendo-se aceitar a utilização de intervalos entre os dois tempos testados.

Para garantir uma baixa turbidez o tempo e a velocidade de centrifugação foram de 10 minutos e 5000 rpm. A adição de NH_4OH mostrou-se desnecessária e a normalidade do ácido clorídrico para a obtenção da feofitina pode variar entre 0,5 N e 4 N. A leitura após a acidificação deve ser feita após 1 minuto já que neste intervalo de tempo houve um aumento nos valores de concentração de clorofila *a*.

Cuidados especiais na rotina de análise de clorofila e feofitina em laboratório:

1. A filtragem da amostra coletada deve ser feita com filtro GF/F ou Acetato de Celulose Sartorius, no escuro. O filtro retirado deve ser colocado em um tubo de ensaio com um volume de 8 ml de acetona 90% e mantido a 4 °C por 6 a 24 horas. Para cada amostra é aconselhável a utilização de pelo menos 1 ou mais réplicas.

2. A maceração da amostra deve ser feita em gral de porcelana com auxílio de pistilo e todo macerado deve retornar para o tubo de ensaio lavando-se o gral com acetona 90% para evitar o desperdício de material, tomando-se o cuidado de completar o volume da acetona no tubo de ensaio até 10 ml.

3. O volume do sobrenadante deve ser completado para exatos 10 ml com acetona 90%, utilizando-se balão volumétrico de mesmo volume. No momento da transferência do sobrenadante do tubo de ensaio para o balão volumétrico deve-se verter o conteúdo vagarosamente até o precipitado evitando-se assim, a mistura deste para minimizar a turbidez. Se o volume ultrapassar 10 ml retira-se o excedente e utiliza-se esta notação no cálculo do resultado final.

4. As leituras devem ser feitas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 665 nm e 750 nm (turbidez), utilizando-se 2 cubetas previamente calibradas, zeradas com acetona 90%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Edler, L. (ed.). 1979 Recommendations for Marine Biological Studies in the Baltic Sea: Phytoplankton and Chlorophyll. Baltic Marine Biologists. National Swedish Environmental Protection Board, Solna. 38 p.
- Golterman, H. L., Clymo, R. S. & Ohnstad, M. A. M. 1978. Methods for physical and chemical analysis of freshwater. Oxford Blackwell Scientific Publications, Oxford. 213p. (IBP handbook n.8).
- Marker, A. F. H. 1972. The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biol.*, 2:361-385.
- Nusch, E. 1980. Comparison of Different Methods for chlorophyll and Phaepigment Detemination. *Arch. Hydrobiol.*, 14:14-36.
- Richards, F. A. & Thompson, G. 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.*, 11:156-172.
- Wetzel, Robert G. 1990. *Limnological analysis*. 2nd. Springer-Verlag, Michigan. 391 p.
- Zar, J. H. 1974. *Bioestatistical analysis*. 3ª ed. Prentice-Hall , Englewood-Cliffs. 620 p.