



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 1 • p 104-112

Testes de evitamento com enquitraídeos (*Enchytraeus albidus*): efeitos de diferentes tempos de exposição, compostos químicos e propriedades do solo

Os enquitraídeos são oligoquetas típicas do solo que regulam indirectamente a degradação da matéria orgânica e promovem um bom arejamento do solo. Possuem órgãos sensoriais, sensíveis a substâncias químicas no ambiente – quimiorreceptores – o que os torna apropriados como organismos teste em ensaios de evitamento. Estes ensaios baseiam-se na capacidade que os organismos têm de evitar uma determinada condição de *stress*. Os ensaios de evitamento permitem assim uma primeira avaliação da toxicidade de um solo contaminado, usando como parâmetro o comportamento dos enquitraídeos – se estes preferem deslocar-se para o solo controlo ou para o solo contaminado. Este estudo teve como objectivos a optimização do tempo de duração de um teste de evitamento e a determinação dos efeitos de substâncias químicas (metais pesados e pesticidas) e de diferentes propriedades do solo (pH, conteúdo em matéria orgânica e argila) em *Enchytraeus albidus*. Os resultados mostraram que 48 horas constituem um tempo de exposição óptimo para este tipo de teste. Foram encontrados efeitos relacionados com a concentração aplicada, para a maioria dos compostos testados. As propriedades do solo, por si só, influenciaram o comportamento dos organismos pelo que o tipo de solo a utilizar deve ser tido em conta na interpretação dos resultados.

Palavras-chave

oligoqueta
comportamento
diferentes compostos químicos
propriedades do solo

Sara Novais^{1*}

Mónica J. B. Amorim¹

Jörg Römcke²

Amadeu M. V. M. Soares¹

¹CESAM e Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

²ECT, Oekotoxicologie GmbH, Flörsheim, Alemanha.

*sara.novais@ua.pt

ISSN 1647-323X



INTRODUÇÃO

O solo possui funções muito importantes como, por exemplo, servir de *habitat* a muitos organismos ou de substrato para práticas agrícolas, tendo por isso um papel fundamental no funcionamento dos ecossistemas. O solo é também um dos principais depósitos de todo o tipo de contaminantes. Para a protecção da saúde humana, manutenção da qualidade dos solos e ambiente, é fundamental que se conheçam os efeitos que as substâncias químicas terão nos organismos, de forma a possibilitar o desenvolvimento de uma estratégia de regulamentação para a protecção dos solos (Lanno et al., 2003).

Existe uma grande diversidade de solos em todo o mundo, com diferenças bastante significativas ao nível das suas características. As diferentes propriedades dos solos têm influência na toxicidade das substâncias químicas para os organismos, sendo por isso fundamental compreender de que forma estas características do solo afectam o normal desempenho dos organismos. Algumas das variáveis mais importantes no transporte dos contaminantes no solo são o pH, a quantidade de matéria orgânica e de argila.

Os invertebrados do solo estão muito sujeitos a exposições a substâncias químicas presentes no solo. Destes organismos, os oligoquetas terrestres (filo Annelida) têm um papel importante nos ecossistemas do solo ao nível da estrutura e função (Didden, 1993; Edwards e Bohlen, 1996). Em particular, os enquitraídeos, oligoquetas importantes na comunidade biológica (biocenose), estão amplamente distribuídos pela Terra e são filogeneticamente muito próximos das minhocas comuns (Erseus e Kallersjö, 2004). Estes organismos edáficos¹ contribuem para processos vitais no seu compartimento ecológico, regulando indirectamente a degradação da matéria orgânica e promovendo um bom arejamento do solo (Amorim et al., 2005). *Enchytraeus albidus* é a espécie mais bem conhecida de enquitraídeos e uma das maiores do género *Enchytraeus*, com um tamanho médio de aproximadamente 20 mm (Jansch et al., 2005). A relevância ecológica desta espécie, aliada a outras características como um ciclo de vida curto, fácil manipulação e manutenção em cultura, torna estes enquitraídeos apropriados como organismos-teste em estudos de ecotoxicologia.

Actualmente, existem vários ensaios padronizados de toxicidade com enquitraídeos, nomeadamente os que avaliam a sobrevivência dos adultos – testes agudos – ou os que avaliam o sucesso reprodutivo dos organismos, em termos do número de juvenis produzidos – testes crónicos (ISO, 2003; OECD, 2004). Apesar de estes testes serem instrumentos muito úteis na avaliação do potencial tóxico de um composto, têm a desvantagem de terem uma duração relativamente prolongada. Daí ter surgido a necessidade de desenvolver ensaios de curta duração mas de igual modo precisos e relevantes para a avaliação de risco e em termos ecológicos.

Os testes de evitamento (acto de evitar) baseiam-se no facto de os organismos-teste (*e.g.* enquitraídeos) possuírem órgãos sensoriais – quimiorreceptores – altamente sensíveis a substâncias químicas no ambiente (Edwards e Bohlen, 1996). As grandes vantagens deste tipo de teste residem no facto de serem de mais fácil e rápida execução quando comparados com ensaios agudos e crónicos (*p.e.*, reprodução) apresentando igualmente elevada sensibilidade. Assim, os ensaios de evitamento podem ser utilizados para avaliação da toxicidade de um solo contaminado, usando como parâmetro o comportamento dos organismos, ou seja, se estes se deslocam para o solo controlo ou para o solo contaminado. A relevância

¹ Organismos edáficos são organismos que dependem directamente do solo para sobreviver.

deste tipo de ensaio, além da avaliação da toxicidade, é a informação relativa à capacidade de evitar dos organismos: se capazes de evitar um determinado factor de stress, podem deslocar-se para outras zonas de forma a evitar esse mesmo factor de stress, garantindo os níveis populacionais da espécie.

Em relação a alguns compostos químicos e propriedades de solo, o evitamento já se encontra bastante estudado para as minhocas comuns (Slimak, 1997; Hund, 1998; Loureiro et al., 2005; Marques et al., 2009); já existe um protocolo padronizado para que os ensaios possam ser efectuados por diferentes operadores, seguindo as mesmas condições experimentais, e para que os resultados possam, desta forma, ser comparáveis (ISO, 2006). Pelo contrário, em relação aos enquitraídeos, só mais recentemente se começou a estudar a capacidade de evitamento de condições desfavoráveis (Amorim et al., 2005; Amorim et al., 2008a; Amorim et al., 2008b; Kobeticova et al., 2009). Uma vez que estes organismos habitam camadas de solo mais profundas do que as minhocas, os enquitraídeos apresentam cenários de exposição diferentes.

Este estudo teve como objectivos: (i) a optimização do tempo de duração de um teste de evitamento com *Enchytraeus albidus*; (ii) e a determinação dos efeitos de substâncias químicas (metais pesados e pesticidas) e de diferentes propriedades do solo (pH, conteúdo em matéria orgânica e argila) sobre o comportamento de evitamento dos enquitraídeos.

MATERIAL E MÉTODOS

Organismos teste

Os organismos teste utilizados para este estudo pertencem à espécie de enquitraídeos *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (Figura 1). Estes organismos foram mantidos em laboratório, numa cultura com 50% de solo de jardim e 50% de solo artificial OCDE (OECD, 1984), a 18°C, com um fotoperíodo de 16h de luz e 8h de escuro. Os indivíduos foram alimentados, uma vez por semana, com flocos de aveia moídos e autoclavados (Cimarron, Portugal).



FIGURA 1: (A) *Enchytraeus albidus* em cultura; (B) Ampliação de uma porção de A

Solos

Os ensaios foram realizados em solo natural LUFA 2.2, um solo de referência proveniente de Speyer, Alemanha (Løkke e van Gestel, 1998), e em solo de referência artificial OCDE (Figura2).

O solo LUFA 2.2 foi utilizado nos ensaios de toxicidade com as substâncias químicas e na optimização do tempo de exposição. O solo OCDE foi utilizado para a determinação dos efeitos das propriedades do solo no comportamento de *E. albidus* visto que, sendo um solo artificial, pode ser manipulado alterando as compo-



FIGURA 2: Solos padronizados OCDE (esquerda) e LUFA 2.2 (direita), humedecidos (em cima) e secos (em baixo) (Rombke, 2005).

sições de cada um dos seus constituintes. Para além do solo OCDE padrão (70% de areia, 20% de argila, 10% de turfa, pH ajustado a 6 ± 0.5), usado como controlo, foram testados 3 solos: com maior quantidade de argila (O_argila), com pH mais ácido (O_pH) e com menor percentagem de matéria orgânica (O_MO). As principais propriedades destes solos (pH, matéria orgânica, conteúdo em argila, silte e areia) estão representadas na tabela I.

TABELA I: Principais características dos solos utilizados (pH, MO = matéria orgânica e granulometria)

SOLO	pH (CaCl ₂)	MO (%)	Areia (%)	Argila (%)	Turfa (%)
LUFA 2.2	5,8	4,4	77	6	-
OCDE	6,3	8,0	70	20	10
O_argila	6,4	8,0	20	70	10
O_pH	4,9	8,0	70	20	10
O_MO	6,8	ap. 4,0	72,5	22,5	5

Contaminação dos solos

Foram testados os seguintes com-postos químicos: cloreto de cobre (CuCl₂), cloreto de zinco (ZnCl₂) e cloreto de cádmio (CdCl₂); os herbicidas fenmedifam e atrazina; os fungicidas benomil, carbendazim, pentaclorofenol e óxido de tributilestanho (TBTO); os insecticidas dimetoato, lindano, chlor-pirifos e ácido bórico. Estes compostos foram adicionados ao solo numa gama crescente de concentrações. Foram efectuadas 5 réplicas por concentração de cada composto; a contaminação dos solos foi efectuada misturando cada solução à totalidade de solo pré-humedecido necessário para o conjunto de réplicas. Depois de mexer o solo para que a solução ficasse distribuída de forma homogénea, introduziu-se o solo nos recipientes de teste.

Procedimento experimental

O material e procedimento experimental utilizados neste estudo foram adaptados do teste de evitamento já existente para as minhocas (ISO, 2006) Os ensaios foram efectuados em recipientes de plástico com uma divisória amovível, de forma a dividir a área em duas metades iguais. De um lado do recipiente colocaram-se 25 g de solo controlo e do outro lado a mesma quantidade do solo-teste – com diferentes propriedades ou contaminado (Figura 3, passos 1 e 2). De seguida, a divisória foi removida com cuidado e foram colocados 10 enquitraídeos adultos na linha de contacto entre os dois solos (Figura 3, passos 2 e 3). O recipiente foi coberto com uma tampa contendo pequenos orifícios, para permitir o arejamento, e o teste foi deixado a decorrer numa sala de temperatura controlada a 20 ± 1 °C, com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, durante 48 horas. No final do ensaio, a divisória foi novamente colocada na zona central e procedeu-se à contagem do número de organismos presentes em cada lado do recipiente (Figura 3, passo 4).

Tratamento de dados

Os resultados foram analisados recorrendo ao software estatístico SPSS (SPSS, 1997) para o cálculo estimativo da concentração que causa 50 % de efeito (CE₅₀).

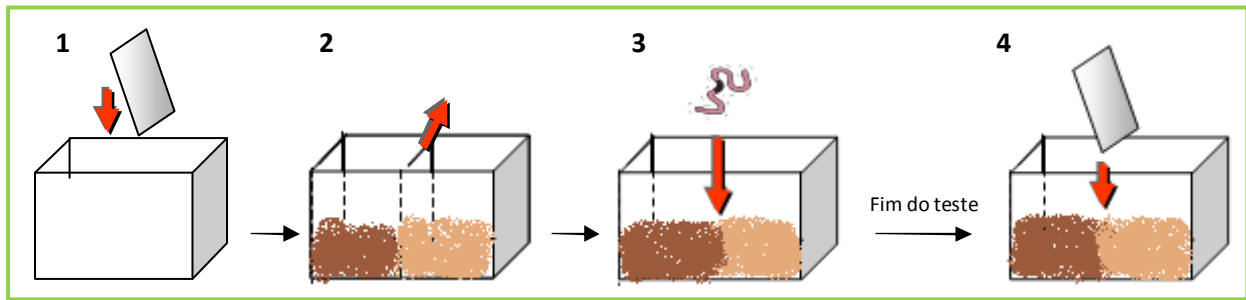


FIGURA 3: Representação esquemática do procedimento experimental de um teste de evitamento. (1) Introdução de uma divisória amovível no centro do recipiente teste; (2) introdução do solo controle num lado do recipiente e do solo teste no outro e posterior remoção da divisória amovível; (3) introdução de 10 organismos na zona de contacto dos dois solos; (4) reintrodução da divisória no meio dos dois solos e contagem dos organismos presentes em casa lado.

RESULTADOS

Diferentes tempos de exposição

Os resultados dos ensaios realizados para determinar os efeitos dos tempos de exposição no evitamento de *E. albidus* estão representados na figura 4. Não houve diferenças significativas no comportamento de *E. albidus* com o tempo, quer nos metais pesados Cu (Figura 4-A) e Cd (Figura 4-B), quer nos pesticidas fenmedifam (Figura 4-C) e dimetoato (Figura 4-D). Os organismos mostraram um elevado evitamento aos solos contaminados com os dois pesticidas, em todos os tempos de amostragem. A resposta aos metais não foi tão estável ao longo do tempo de exposição.

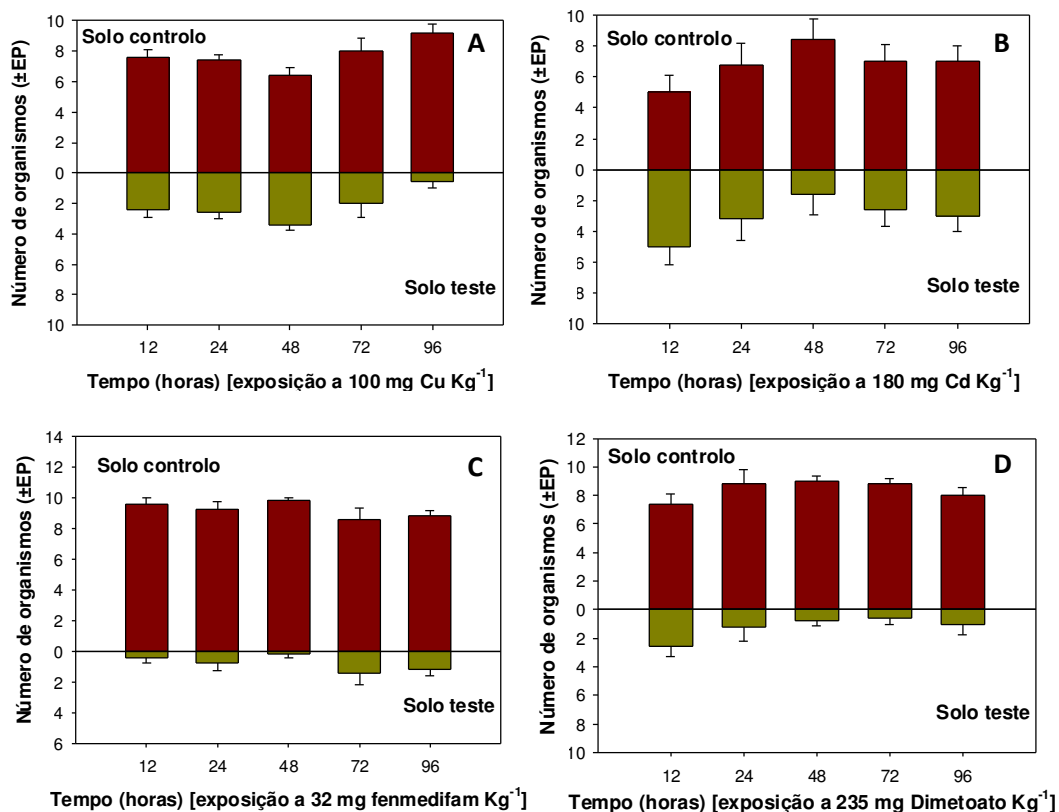


FIGURA 4: Resultados dos testes de evitamento realizados com *Enchytraeus albidus* quando expostos ao solo LUFA 2.2 (solo controle) versus solo LUFA 2.2 contaminado, com diferentes tempos de exposição a: (A) cobre (100 mg Kg⁻¹); (B) cádmio (180 mg Kg⁻¹); (C) fenmedifam (32 mg Kg⁻¹); (D) dimetoato (235 mg Kg⁻¹). Os resultados representam a média do número de organismos (no solo controle e no solo teste) nas 5 réplicas ± erro padrão (EP).

Diferentes compostos químicos

Os resultados dos ensaios de evitamento em *E. albidus* expostos a várias substâncias químicas foram expressos sob a forma de CE₅₀, ou seja, através da determinação da concentração que causou 50 % de efeito no comportamento dos organismos (tabela II). Foram testados três metais pesados, dois herbicidas, quatro fungicidas e quatro insecticidas. As CE₅₀ de cada um dos compostos testados estão mencionadas na tabela II, tendo-se seleccionado apenas um composto de cada um dos quatro grupos para apresentar graficamente (Figura 5).

TABELA II: Resultados dos testes de evitamento realizados com metais pesados e pesticidas. CE₅₀ = concentração que causa 50 % de efeito nos organismos; LC (95%) = limites de confiança a 95%.

Substância Teste	CE ₅₀ (mg Kg ⁻¹)	LC95%
Metal Pesado	Cobre	133
	Zinco	92
	Cádmio	362
Herbicida	Fenmedifam	7
	Atrazina	38
Fungicida	Benomil	47
	Carbendazim	8
	Pentaclorofenol	703
	TBTO	95
Insecticida	Dimetoato	58.3
	Lindano	172.5
	Clorpirifos	933
	Ácido Bórico	n.d.

n.d. = não determinado; a = concentração superior a 1000 mg Kg⁻¹

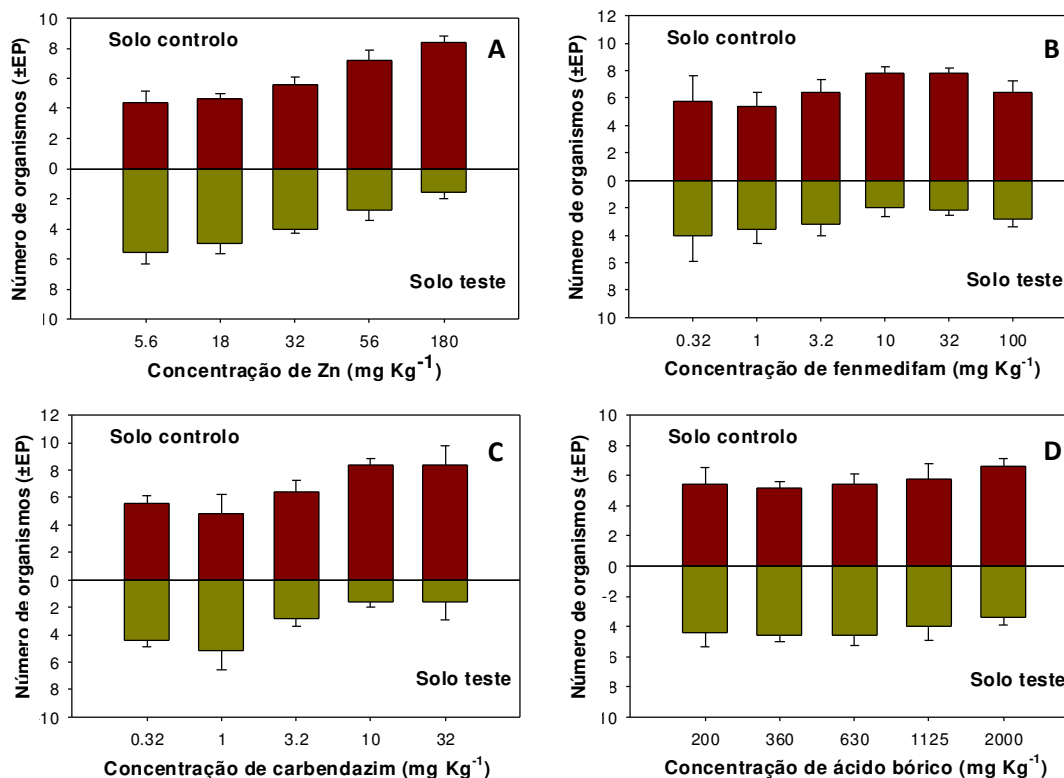


FIGURA 5: Resultados dos testes de evitamento realizados com *Enchytraeus albidus* quando expostos ao solo LUFA 2.2 (solo controlo) versus solo LUFA 2.2 contaminado com: (A) cloreto de zinco – metal pesado; (B) fenmedifam – herbicida; (C) carbendazim – fungicida; (D) ácido bórico – insecticida. Os resultados representam a média do número de organismos (no solo controlo e no solo teste) nas 5 réplicas ± erro padrão (EP).

Comparando o comportamento de *E. albidus* face aos quatro compostos representados na figura 3 pode-se constatar que a sensibilidade destes organismos varia com o composto tóxico. No teste de evitamento com cloreto de zinco (Figura 5-A), os enquitraídeos tiveram um comportamento típico de dose-resposta, ou seja, quanto mais elevada foi a concentração testada, mais organismos se encontraram no solo controlo. No caso do herbicida fenmedifam (Figura 5-B), verificou-se que os organismos evitam o solo teste até à concentração de 10 mg Kg⁻¹ e que, para concentrações superiores, a capacidade de escapar do solo contaminado parece diminuir. A resposta de *E. albidus* ao fungicida carbendazim (Figura 5-C) foi também dependente da concentração usada, tendo o evitamento sido mais evidente nas concentrações mais elevadas. Já o insecticida ácido bórico (Figura 5-D) não foi evitado por *E. albidus* em nenhuma das concentrações testadas.

Em termos de concentrações de efeito, foi possível estimar a CE₅₀ para todos os compostos, excepto para o ácido bórico (Tabela II). Os compostos com uma concentração de efeito mais baixa, ou seja, aqueles que apresentaram maior toxicidade para *E. albidus*, foram o fenmedifam (CE₅₀ = 7 mg Kg⁻¹) e o carbendazim (CE₅₀ = 8 mg Kg⁻¹), enquanto os compostos menos tóxicos foram o clorpirifos (CE₅₀ = 933 mg Kg⁻¹) e o pentaclorofenol (CE₅₀ = 703 mg Kg⁻¹).

Diferentes propriedades do solo

Os resultados do teste de evitamento mostram uma clara preferência dos enquitraídeos pelo solo OCDE padrão quando comparado com as três alterações feitas nas quantidades dos constituintes deste solo artificial (Figura 6). Os resultados mostram diferenças significativas no comportamento dos organismos em todas as combinações: solo OCDE padrão *versus* solo artificial com maior quantidade de argila (O_argila); solo OCDE padrão *versus* solo artificial com pH mais baixo (O_pH); solo OCDE padrão *versus* solo artificial com menor quantidade de matéria orgânica (O_MO). Os organismos evitaram os solos na seguinte ordem: O_pH < O_MO < O_argila.

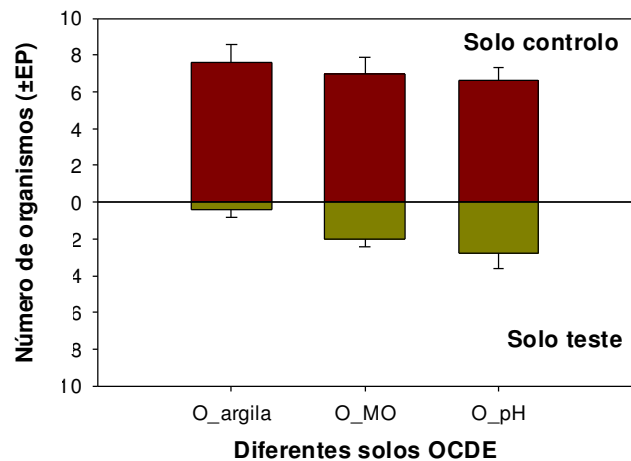


FIGURA 6: Resultados dos testes de evitamento realizados com *Enchytraeus albidus* quando expostos ao solo artificial OCDE padrão (solo controlo) versus solo OCDE com um nível diferente dos seus constituintes: O_argila, O_MO e O_pH. Os resultados estão expressos em termos de média do número de organismos (no solo controlo e no solo teste) nas 5 réplicas ± erro padrão (EP).

DISCUSSÃO

Tendo em conta os resultados obtidos para os diferentes tempos de exposição, um período de 48 horas parece ser o mais adequado a adoptar em ensaios de evitamento, pois apesar de não haver diferenças significativas entre os diferentes tempos parece ser um bom compromisso entre a obtenção de resultados estáveis e a rapidez pretendida na avaliação do solo-teste. Além disso, a opção pelas 48 h de exposição permite a comparação directa dos resultados dos testes de enquitraídeos com os testes com minhocas, para os quais o protocolo padronizado ISO também determina um tempo de exposição de 48h.

Nos testes com metais, e com a maioria dos pesticidas testados, verificaram-se padrões típicos de dose-resposta. No entanto, noutros casos, como no do fenmedifam, a partir de uma determinada concentração os organismos deixam de ser capazes de evitar o solo contaminado; no caso do ácido bórico, não se verificou evitamento, mesmo em concentrações muito elevadas. Estes casos requerem particular atenção, pois numa situação real em que tal se verifique são prováveis efeitos graves nos enquitraídeos (Greenslade e Vaughan, 2003). Quando os organismos são capazes de evitar um solo contaminado, podem escapar para zonas não contaminadas disponíveis na proximidade, evitando a situação desfavorável e mantendo os seus níveis populacionais. Pelo contrário, em casos como o do ácido bórico, o composto químico provoca possivelmente algum efeito ao nível do sistema nervoso dos indivíduos e estes deixam de ser capazes de evitar o solo contaminado. Desta forma, poderão ocorrer efeitos mais severos nessas situações, tais como efeitos ao nível da reprodução, diminuindo ou mesmo impedindo o sucesso reprodutivo, ou causar mortalidade.

Os resultados obtidos não permitem classificar claramente os vários grupos de contaminantes utilizados quanto à sua toxicidade (determinando uma ordem crescente de toxicidade), mas é possível constatar que os compostos que mais afectaram o comportamento de *E. albidus* foram o herbicida fenmedifam e o fungicida carbendazim.

Os diferentes tipos de solo mostraram também influenciar *E. albidus*, tendo sido visível a capacidade de estes organismos responderem de forma a evitar o solo que lhes era mais desfavorável. Recentemente, foram efectuados estudos semelhantes com minhocas (*Eisenia andrei*) e colêmbolos (*Folsomia candida*) (Natal-Da-Luz et al., 2008). Os resultados desses estudos mostraram que, quer a textura do solo, quer o seu conteúdo em matéria orgânica, afectam a resposta de evitamento de ambos os organismos testados. Estes organismos evitaram solos com pouca matéria orgânica e de textura mais fina (mais argila), uma resposta semelhante à encontrada neste estudo com os enquitraídeos.



APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O teste de evitamento, originalmente desenvolvido para as minhocas, pode também ser realizado com enquitraídeos (*E. albidus*). No entanto, e uma vez que o comportamento dos enquitraídeos mostrou ser sensível a solos com texturas finas e com baixo pH, recomenda-se que se tenham em atenção as propriedades do solo em que se realizam os testes, que devem ser tidas em consideração tanto na concepção dos desenhos experimentais como na interpretação dos resultados dos ensaios de evitamento com enquitraídeos.

Este tipo de ensaios pode ser de grande importância como uma primeira abordagem na avaliação do potencial tóxico de variados factores, sendo uma mais valia como ensaio preliminar a testes mais morosos e complexos. Além disso, possibilitam a análise e previsão dos níveis populacionais dos organismos a longo prazo, devido à sua capacidade de evitar, ou não evitar, determinados compostos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim M, Rombke J, Soares A (2005). Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of Benomyl, Carbendazim, phenmedipham and different soil types. *Chemosphere* 59: 501-510.
- Amorim MJB, Novais S, Römcke J, Soares AMVM (2008a). *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): A test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. *Environment International* 34: 363-371.
- Amorim MJB, Novais S, Römcke J, Soares AMVM (2008b). Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): Effects of different exposure time and soil properties. *Environmental Pollution* 155: 112-116.
- Didden WAM (1993). Ecology of terrestrial Echytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-19.
- Edwards CA, Bohlen PJ (1996). Biology and Ecology of Earthworms. Chapman & Hall, London, 426 pp pp.
- Erseus C, Kallersjo M (2004). 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zoologica Scripta* 33: 187-196.
- Greenslade P, Vaughan GT (2003). A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. *Pedobiologia* 47: 171-179.
- Hund K (1998). Earthworm avoidance test for soil assessment: Alternative for acute and reproduction test. *Contaminated Soil '98, Vols 1 and 2* 1039-1040, 1298.
- ISO (2003). Soil quality - Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Determination of effects on reproduction and survival. ISO (International Organization for Standardization). Geneve, Switzerland.
- ISO (2006). Soil quality — Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO (International Organization for Standardization). Geneve, Switzerland.
- Jansch S, Amorim MJB, Rombke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environmental Reviews* 13: 51-83.
- Kobeticova K, Hofman J, Holoubek I (2009). Avoidance response of *Enchytraeus albidus* in relation to carbendazim ageing. *Environmental Pollution* 157: 704-706.
- Lanno RP, Fairbrother A, Gaudet C, Loehr R, Saterback A, Tabak H (2003). Introduction. In: RP Lanno (ed.), Contaminated Soils: From Soil-Chemical Interactions to Ecosystem Management, Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), pp. 427.
- Løkke H, van Gestel CAM (1998). Handbook of soil invertebrate toxicity tests. Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Loureiro S, Soares AMVM, Nogueira AJA (2005). Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution* 138: 121-131.
- Marques C, Pereira R, Goncalves F (2009). Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments* 9: 137-147.
- Natal-Da-Luz T, Rombke J, Sousa JP (2008). Avoidance tests in site-specific risk assessment-influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1112-1117.
- OECD (1984). Guideline for Testing Chemicals. Earthworm, acute toxicity tests. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Paris, France.
- OECD (2004). Guidelines for the testing of chemicals. Enchytraeid Reproduction Test. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Paris, France.
- Rombke J, Moser T (2002). Validating the enchytraeid reproduction test: organisation and results of an international ringtest. *Chemosphere* 46: 1117-1140.
- Rombke J (2005). Bioaccumulation: Soil Test using Terrestrial Oligochaetes. Kick-off Workshop. Festung Rüsselsheim, Germany.
- Slimak KM (1997). Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biology & Biochemistry* 29: 713-715.
- SPSS (1997). Statistical Package for the Social Sciences. Chicago.