

ESTUDO ELETROQUÍMICO COMPARATIVO DO AÇO ISO 5832-9 EM DIFERENTES MEIOS DE INTERESSE BIOLÓGICO

Ruth Flavia Vera Villamil Jaimes
*Instituto de Química da Universidade de São Paulo - Universidade do Grande ABC-
Universidade Presbiteriana Mackenzie E-mail: rvillam@iq.usp.br*
Mônica Luisa Chaves de Andrade Afonso
Instituto Tecnológico e Nuclear, ITN, Lisboa, Portugal. E-mail: mochaves@sapo.pt
Sizue Ota Rogero
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. E-mail: sorogero@ipen.br
Celso Antonio Barbosa
Villares Metals S.A. E-mail: celso.barbosa@villaresmetals.com.br
Alexandre Sokolowski
Villares Metals S.A. E-mail: alexandre.sokolowski@villaresmetals.com.br
Silvia Maria Leite Agostinho
Instituto de Química da Universidade de São Paulo. E-mail: smlagost@iq.usp.br

RESUMO

Foi estudado o comportamento eletroquímico a 37 °C do aço inoxidável ISO 5832-9, em meios de NaCl 0,9 %, de Ringer Lactato e meio mínimo de Eagle (MEM), por voltametria linear e análises da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por espectroscopia por dispersão de energia (EDS). Foram feitos ensaios mecânicos e testes de toxicidade.

O aço ISO 5832-9 se encontra passivado no potencial de corrosão e não apresenta corrosão por pite nos três meios estudados em toda a faixa de potencial investigada, desde o potencial de corrosão até 50 mV acima do potencial de transpassivação. Em meio de MEM, no entanto, as análises por MEV e EDS mostraram que o referido aço, neste valor mais elevado de potencial, apresentou um comportamento diferente, com perda das inclusões de óxido de manganês.

Os potenciais de corrosão, E_{corr} (potencial de circuito aberto estacionário) bem como os valores de densidade de corrente de passivação variaram na seguinte ordem:

$$E_{corr, RL} < E_{corr, NaCl} < E_{corr, MEM}$$

$$j_{MEM} \ll j_{RL} \cong j_{NaCl}$$

No ensaio de citotoxicidade o aço foi caracterizado como não tóxico.

Palavras chave: aço inoxidável ISO 5832-9, implantes ortopédicos, corrosão, meio biológico.

ABSTRACT

The electrochemical behaviour of ISO 5832-9 stainless steel at 37°C in 0.9% NaCl, Ringer Lactate and minimum essential medium (MEM) has been studied, using linear voltammetry, and surface analysis by SEM and EDS. Mechanical and toxicity tests were made. ISO 5832-9 is passivated at corrosion potential (E_{corr}) and it does not presents pitting corrosion on the media studied from E_{corr} to 50 mV above the transpassivation potential (E_i). SEM and EDS analysis have shown that the sample previously immersed in MEM presents a different behaviour at 50 mV above E_i : the manganese oxide inclusions are absent in the surface. E_{corr} values and passivation current density values j_{pass} changed according to the following.

$$E_{corr, RL} < E_{corr, NaCl} < E_{corr, MEM} \text{ and}$$

$$j_{MEM} \ll j_{RL} \cong j_{NaCl}$$

The stainless steel was characterized as no toxic in the cytotoxicity assay.

Keywords: ISO 5832-9 stainless steel, orthopedic implant, corrosion, physiological medium.

INTRODUÇÃO

É de conhecimento amplo que o titânio e suas ligas são materiais mais resistentes à corrosão em meio biológico do que os aços inoxidáveis e, por esta razão é um dos materiais escolhidos para implantes ortopédicos em convênios de iniciativa privada. Entretanto, a maior parte dos casos de fraturas ósseas é coberta pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e os implantes tendem a ser de aço inoxidável devido a seu baixo custo. Estes materiais apresentam também boa resistência mecânica e são indicados em implantes temporários, por não apresentarem as características de osseointegração do titânio. Por estas razões, os estudos destes materiais em meios que simulem o fluido do corpo humano são ainda de extrema importância.

Pesquisas mais recentes [1-9] mostram que o aço ISO 5832-9 apresenta um melhor desempenho em implantes ortopédicos (implantes temporários ou permanentes) quando comparado ao aço inoxidável austenítico ISO 5832-1 (ASTM F 138), utilizado atualmente no Brasil para este fim. A melhora no desempenho se deve basicamente a utilização de nitrogênio em sua composição química que aumenta a resistência mecânica e a resistência à corrosão por pite. Estudos realizados com os dois aços, no Laboratório de Caracterização de Interfaces Eletroquímica (LACIE) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, em cooperação com a empresa Villares Metals S.A. têm mostrado a grande diferença no comportamento eletroquímico destes materiais.

O aço ISO 5832-9 já é utilizado em larga escala na Europa e nos Estados Unidos, substituindo em parte as ligas de titânio e cobalto-cromo-molibdênio. Nos Estados Unidos este aço é utilizado na versão ASTM F 1586, a qual é similar a ISO 5832-9. No Brasil, Villamil Jaimes et al [1,4,7,10-11] têm verificado a sua alta resistência eletroquímica (testes de corrosão) e biocompatibilidade (através de testes de citotoxicidade) assim como Giordani et al [9] têm constatado a sua alta resistência mecânica. Este aço tem se mostrado muito mais resistente do que os aços convencionais, tanto pelo valor do potencial de pite (Ep) quanto pela ordem de

grandeza da sua corrente passiva em meios de NaCl 0,11 mol L⁻¹ a T = 36,5 °C e em meio de NaCl 0,15 mol L⁻¹, pH igual a 4,0 e temperatura de 40°C[4]. O aço ISO 5832-9 não apresenta corrosão por pite e os valores da densidade de corrente passiva em meios de NaCl 0,11 mol L⁻¹ a 37°C e de NaCl 0,15 mol L⁻¹ a pH = 4 e 40°C são menores do que os observados para o aço ISO 5832-1. Villamil et al [10-11] estudaram o efeito do Nb sobre o comportamento eletroquímico do aço 5832-9 em NaCl 0,11 mol L⁻¹ a 36,5°C. Os autores variaram a concentração de Nb entre 0% e 0,40% e verificaram que o melhor desempenho corresponde ao aço contendo 0,28% de Nb a 37°C.

Este trabalho tem como objetivo comparar o comportamento eletroquímico do aço inoxidável ISO 5832-9, em soluções de NaCl 0,9 %, de Ringer Lactato e de MEM (meio mínimo de Eagle), empregando a voltametria linear análises da superfície por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) antes e após os ensaios eletroquímicos e apresentar testes mecânicos e de toxicidade do material.

A literatura [12-14] mostra que a solução Ringer Lactato é freqüentemente usada, por exemplo, na reposição de líquidos no caso de pré-eclâmpsia grave, na desidratação, quando acompanhada de quadros de hemorragia, na reposição de perdas plasmáticas, na prevenção do edema pulmonar, em traumatismos cranioencefálicos. A vantagem de se utilizar o Ringer Lactato é que o fígado metaboliza lactato em bicarbonato, importante no combate à acidose metabólica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A composição química do aço inoxidável ISO 5832-9 em porcentagem em massa, encontra-se na Tabela 1. A amostra usada neste estudo foi obtida de um lote comercial industrial.

As Tabelas 2 e 3 apresentam a composição da solução de Ringer Lactato e do meio essencial mínimo de Eagle (MEM).

As propriedades mecânicas foram determinadas através de ensaios de tração, conduzidos segundo norma ISO 6892 [15-16].

Tabela 1. Composição química do aço ISO 5832-9 em % em massa.

C	Si	Mn	Cr	Ni	Mo	N	P	S	Nb	PRE *
0,015	0,33	4,09	20,70	9,94	2,50	0,320	0,014	0,005	0,28	29,0

* Valor orientativo, ele não é especificado em norma.

Tabela 2: Composição da solução de Ringer Lactato.

Composition	Concentração /(g/ 100 mL)
Lactato de sódio	0,3
Cloreto de sódio	0,6
Cloreto de potássio	0,03
Cloreto de Cálcio	0,02

Tabela 3: Composição do meio mínimo de Eagle (MEM).

Componente	Concentração / mol L ⁻¹
NaCl	1,16 x 10 ⁻¹
KCl	5,36 x 10 ⁻³
CaCl ₂	1,80 x 10 ⁻³
Na ₂ HPO ₄	8,98 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	8,11 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄	2,38-2,62 x 10 ⁻²
Aminoácidos	5,5 x 10 ⁻³

Tabela 4. Resistência mecânica à tração do aço inoxidável ISO 5832-9.

	*L.E.(MPa)	*L.R. (MPa)	*Along (%)
Dados experimentais	501	820	42
Limites mínimos Pela Norma ISO 5832-9	430	740	35

*L.E.:limite de escoamento, L.R.: limite de resistência à tração e Along.: Alongamento.

Os eletrodos de trabalho consistiram em discos de aço de área geométrica igual a 0,363 cm² embutidos em teflon (PTFE), fixos a uma haste de latão, os quais foram previamente lixados com lixa comum de carbetto de silício (SiC), de granulometrias 300, 400 e 600 e lavados com água destilada e álcool etílico.

Nos ensaios de MEV/EDS o tratamento superficial se estendeu até um polimento com pasta de diamante (1µm), seguido de lavagem da superfície e limpeza com ultra-som. As amostras foram submetidas a um potencial situado 50 mV acima do potencial de elevação da corrente (Ei), para comparar as superfícies corroídas, durante 15 minutos nos meios estudados.

Os ensaios eletroquímicos foram realizados utilizando um esquema clássico de três eletrodos, um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como referência e um eletrodo de platina com grande área como contra-eletrodo, além do aço como eletrodo de trabalho. A temperatura de trabalho

foi de 37 °C. Nestes ensaios foi utilizado um potenciostato Autolab tipo III/FRA2 acoplado a um microcomputador e ao analisador de impedância.

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados de acordo com normas internacionais [17] e procedimento descrito em trabalhos anteriores [18-19]. Os extratos obtidos pela imersão das ligas metálicas em MEM foram diluídos em série e colocados em contato com células cultivadas em microplaca de 96 poços. A toxicidade foi verificada pelo método de incorporação do corante vital vermelho neutro, medindo-se a densidade óptica no final do ensaio, em espectrofotômetro leitor de ELISA em 540nm. Na mesma placa foram utilizados um controle positivo (solução de fenol 0,02%), um controle negativo (placas de Ti) e um controle de células (correspondente 100% de viabilidade). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada em relação ao controle de células.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4 são apresentados os resultados obtidos dos ensaios de resistência mecânica. Nota-se que a amostra de aço estudada se encontra acima dos limites mínimos de resistência estabelecidos pela norma ISO 5832-9. Estes resultados estão em concordância com os dados apresentados na literatura [9].

Medidas de potencial de circuito aberto em função do tempo foram realizadas com o objetivo de determinar o potencial de corrosão, E_{corr} , isto é, o potencial de circuito aberto “quase estacionário”. Os resultados são mostrados na Tabela 5. Verifica-se que os valores de E_{corr} dependem significativamente dos meios estudados, indicando uma composição química diferente das interfaces estudadas e um filme menos protetor em meio de Ringer Lactato.

Na Figura 1 são apresentadas as curvas de polarização potenciodinâmica, a uma velocidade de varredura de 1 mV s^{-1} para o aço ISO 5832-9, nos três meios. Observa-se que o aço estudado se encontra passivado numa ampla

faixa de potenciais e que em meio de Ringer Lactato a elevação da corrente se dá num potencial menos positivo, em concordância com as medidas de E_{corr} . Estes resultados mostram que o aço se encontra menos protegido neste meio. As medidas em meio de NaCl e em solução MEM indicam que a boa qualidade do filme protetor decresce na ordem MEM > NaCl > RL.

Na Tabela 5 se encontram os valores de E_i , potencial de elevação da corrente e de j_{pass} , densidade de corrente de passivação, para o aço ISO 5832-9, nos três meios. Observa-se, novamente, que o filme em meios MEM é o mais passivante, com valores de densidade de corrente de ordem de nA cm^{-2} .

Na Figura 2 é apresentada a microestrutura após ataque metalográfico do aço ISO 5832-9 com ácido oxálico a 10 % em massa. Observam-se os grãos autênticos alguns com maclas de recozimento. O ataque revelou também a presença dos carbonetos de nióbio (NbC) e dos carbonitretos de nióbio Nb(C,N), alinhados na direção da laminação.

Tabela 5. Valores de potencial de corrosão (E_{corr}), da elevação da corrente (E_i) e da densidade de corrente (j_{pass}) para o aço ISO 5832-9, nos três meios estudados.

Meio	E_{corr} vs SCE / mV	E_i vs SCE / mV	$j_{pass}/\mu\text{A cm}^{-2}$ (100 mV)
NaCl 0,9 %	-70 ± 12 (5)	1190 ± 11 (5)	$0,62 \pm 0,87$ (5)
Ringer Lactato	-180 ± 23 (5)	1020 ± 50 (5)	$0,25 \pm 0,34$ (5)
MEM	-20 ± 15 (12)	1340 ± 12 (12)	$0,002 \pm 0,006$ (12)

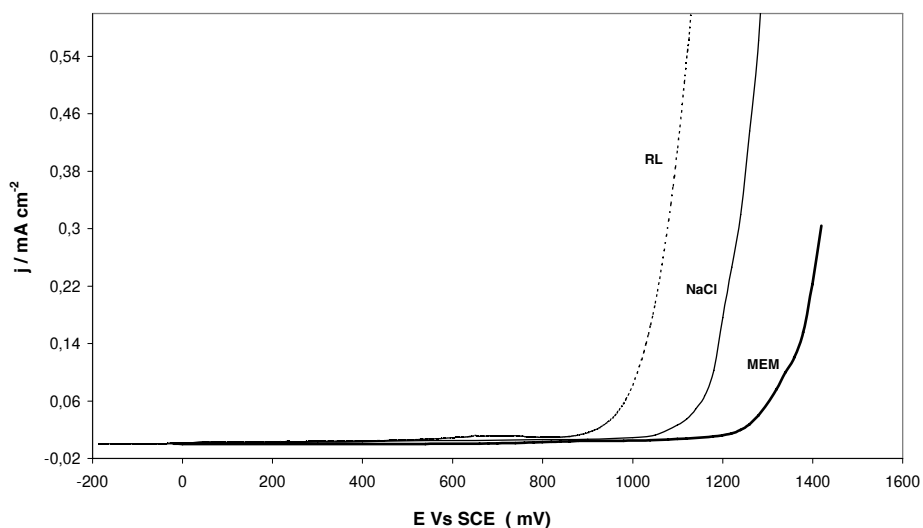


Figura 1. Curvas de polarização anódica potenciodinâmica do aço inoxidável ISO 5832-9 nos três meios estudados a 37°C e $v = 1 \text{ mV s}^{-1}$.

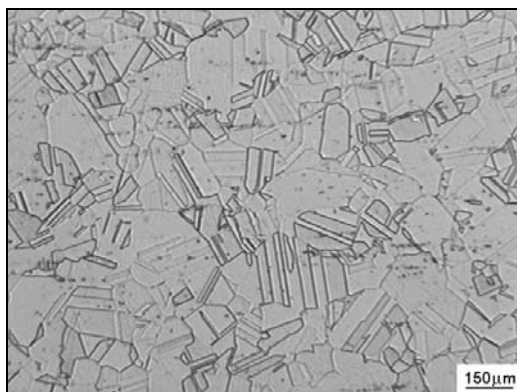


Figura 2. Microestrutura após ataque metalográfico do aço ISO 5832-9 com ácido oxálico a 10 %.

A Figura 3 corresponde aos ensaios por MEV da amostra do ISO 5832-9, nos três meios, após ataque por 15 min num potencial de 50 mV acima do potencial de elevação da corrente. A análise por EDS é apresentada na Tabela 6, para melhor interpretação. Verifica-se que as micrografias após o ataque em meios de NaCl e RL mostram as superfícies em sua maior parte, com a composição média semelhante à do aço original, após polimento, indicando uma dissolução generalizada. As regiões assinaladas com 1, tanto para a superfície polida, quanto para as imersas em NaCl e RL, correspondem a inclusões de óxidos de manganês, ainda presentes após o ataque, como comprovam os altos teores de *Mn* e de *O*. No caso da amostra imersa em MEM o resultado é bem diferente: a região 1 rica em óxido de manganês, não é observada, o teor de *Mn* e de *O* são baixos em todas as regiões analisadas e a composição média da superfície e das regiões assinaladas são comparáveis. A região na forma de cratera deve corresponder à saída de uma inclusão onde se notam íons cloreto (*Cl*), indicando a presença de um sal, produto da oxidação do material metálico. Observa-se ainda que o teor de íons *Cl* é significativo em qualquer ponto da superfície confirmando o ataque generalizado, visualizado também pela mudança de cor da solução. O teor observado de *Mg* se deve ao sal presente no eletrólito. É importante salientar que o E_i para o meio MEM foi o mais positivo, favorecendo o ataque da superfície e a “saída” da inclusão (neste meio o óxido de manganês não é solúvel). Os cálculos termodinâmicos também indicam uma proximidade do potencial aplicado com o potencial padrão do par MnO_4^- / MnO_2 [20]. Em outras palavras, pode haver, no caso do meio MEM, oxidação das inclusões de óxido de manganês a íons permanganato. A oxidação da superfície é bem vista a olho nu, porque a solução se torna alaranjada, indicando a oxidação do cromo (III) a cromo (VI).

Na Tabela 7 e na Figura 4 são apresentados os resultados do teste de

citotoxicidade. O aço ISO 5832-9 apresentou comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não mostrou citotoxicidade em nenhuma das concentrações do extrato e as curvas de viabilidade celular estão acima da linha do índice de citotoxicidade ($IC_{50\%}$). O $IC_{50\%}$ significa a concentração do extrato que causa morte de 50% da população celular utilizada no ensaio. Este índice é obtido no gráfico, na intersecção da curva de viabilidade celular com a linha do $IC_{50\%}$. Todo material que apresenta a curva de viabilidade celular abaixo da linha do $IC_{50\%}$ é considerado tóxico. O material que apresenta a curva acima da linha do $IC_{50\%}$ é considerado não tóxico. Somente o controle positivo mostrou citotoxicidade com $IC_{50\%}$ de 39. Portanto, neste ensaio, o aço ISO 5832-9 foi caracterizado como não tóxico.

4 - CONCLUSÕES

O aço ISO 5832-9 estudado em diferentes meios apresenta o seguinte comportamento.

- Mostra-se passivado nos três meios estudados, com uma faixa de potencial igual ou superior a 800 mV. A ordem crescente de estabilidade nos três meios é: $E_{RL} < E_{NaCl} 0,9\% < E_{MEM}$.
- As densidades de corrente de passivação, inferiores a $0,25 \mu Acm^{-2}$, medidas a 100 mV mais positivos do que E_{corr} seguem a ordem $j_{MEM} \ll j_{NaCl} < j_{RL}$.
- O ataque eletroquímico a 50 mV acima do potencial de elevação da corrente mostra que os materiais não apresentam corrosão localizada. Em solução MEM, onde o ataque foi feito a potencial mais elevado, verifica-se a perda das inclusões de óxido de manganês, sugerindo destacamento mecânico em virtude da maior oxidação generalizada da superfície metálica ou mesmo oxidação

do manganês em virtude do valor de potencial aplicado.

- O referido aço não apresenta toxicidade de acordo com os testes realizados.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas e auxílios concedidos.

Tabela 6. Análise semi-quantitativa (EDS) da superfície do aço inoxidável ISO 5832-9 da superfície polida e previamente submetido a um potencial situado 50 mV acima do potencial de elevação da corrente durante 15 minutos nos três meios estudados.

	Após polimento			NaCl			RL			MEM		
	M	1	2	M	1	2	M	1	2	M	1	2
Cr	22.94	20.53	38.95	22.63	24.80	17.55	21.14	19.55	20.86	20.11	21.00	20.12
Mn	4.47	12.27	2.26	4.56	13.54	3.88	4.00	13.23	4.04	4.01	4.11	3.39
Ni	9.26	0.17	1.93	9.32	0.90	7.00	9.34	5.86	9.02	10.08	10.71	9.99
Nb	0.07*	0.02*	35.63	-	-	-	-	-	-	0.42	-	3.13
Si	0.55	-	0.25*	0.81	0.20	0.50	-	-	-	0.34	0.28	0.14
S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.25	-
Mo	1.70	-	-	1.5	0.81	1.10	2.59	2.11	3.04	2.24	1.37	2.34
O	-	61.72	-	-	48.55	22.18	2.31	2.15	1.79	3.05	1.83	4.88
Al	-	3.04	-	-	-	-	-	-	-	0.12	0.15	0.08
Ti	-	1.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	-	-	0.65	-	0.44	-	-	-	-	-	-	0.10
Cl	-	-	-	-	0.16	0.01*	0.03*	0.03*	0.06*	0.16	0.22	0.10
Mg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.22	-	0.06
Ca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.02	0.02	0.07
P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-
Fe	61.02	0.99	20.34	61.18	8.24	47.78	60.35	46.74	60.72	59.18	60.06	55.60

M: matriz; 1 e 2 regiões indicadas na Figura 3.

Tabela 7. Resultados da porcentagem da viabilidade celular da amostra do aço inoxidável ISO 5832-9 no ensaio de citotoxicidade.

Concentração do extrato (%)	% Viabilidade celular \pm desvio padrão		
	Controle negativo	Controle positivo	ISO 5832-9
100	97 \pm 16	0 \pm 0	135 \pm 4
50	127 \pm 15	30 \pm 9	110 \pm 5
25	116 \pm 10	71 \pm 10	94 \pm 16
12,5	111 \pm 4	99 \pm 9	85 \pm 3
3,25	108 \pm 12	94 \pm 3	81 \pm 2

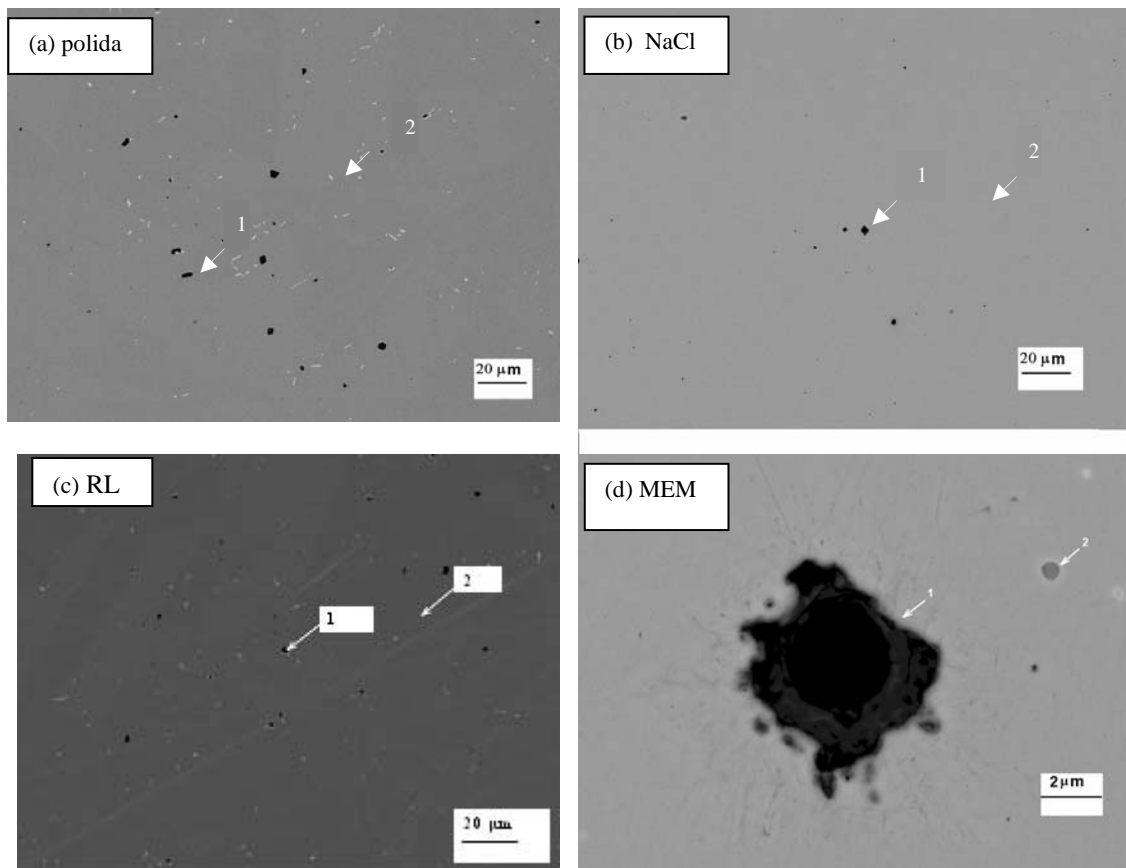


Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por dispersão de energia (EDS) do aço inoxidável ISO 5832-9. Superfície polida (Figuras 3(a) e após ataque eletroquímico por 15 min num potencial de 50 mV acima do potencial de elevação da corrente: Figuras 3(b) em meio de NaCl, Figura 3(c) em meio de RL e Figura 3(d) em MEM.

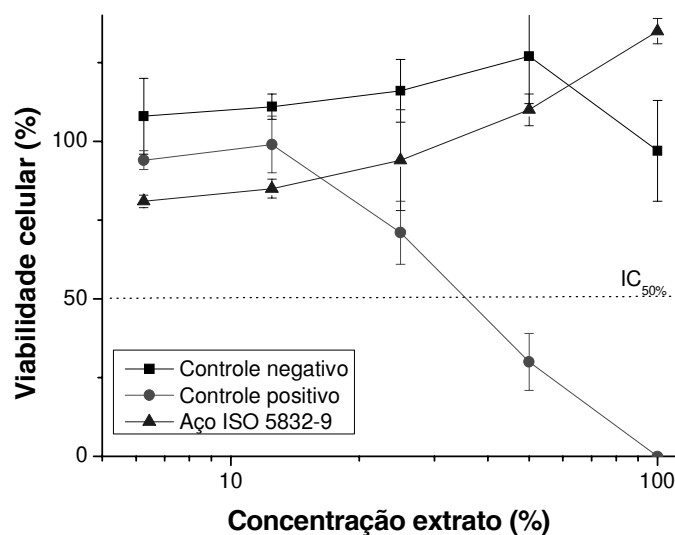


Figure 4. Curvas de viabilidade celular do aço inoxidável ISO 5832-9 no ensaio de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro.

Referências

1. Villamil, R.F.V., Aranha, H., Afonso, M.L.C.A., Mercadante, M.T. and Agostinho S.M.L. **Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia**. v.37 p. 471-476, 2002.
2. Sobral, A. V. C., Ristow, Jr. W., D. S. Azambuja, I. Costa, C. V. Franco, **Corrosion Science**. v.43 p.1019, 2001.
3. Reclaru, L., Lerrf, R. Eschler, P.-Y. Meyer, J.-M. **Biomaterials**. v.22, p. 269, 2001.
4. Villamil, R.F.V., Andrade, A.H.P., Barbosa, C.A, Sokolowski, A and Agostinho, S.M.L. US Patent: ASTM STP 1438, G.L. Winters and M.J. Nutt, Eds., **American Society for Testing and Materials**, West Conshohocken, PA., 2002.
5. Rondelli, G., Torricelli, P., Fini, M., Giardino R. **Biomaterials**, v.26, p.739-744, 2005.
6. Fini, M., Nicoli Aldini, N., Giavaresi, P., Borsari, V., Lenger, H., Bernauer, J., Giardino, R., Chiesa, R. Cigada. A. **Biomaterials**, v.24, p.4929-4939, 2003.
7. Jaimes, R. F. V. V., Afonso, M. L. C. A., Agostinho S. M. L. and Barbosa, C. A. **REM: Revista Escola de Minas**, v. 60, 1, p.63-68, 2007.
8. Basridas, J. M., Polo, J. L., Torres, C. L., Cano, E. **Corrosion Science**. v.43, p. 269, 2001.
9. Giordani, E.J., Ferreira, J., Balancin, O. **REM: Revista Escola de Minas**. v. 60, 1, p.55-62, 2007.
10. Jaimes, R.V.V., Andrade Afonso, M.L.C., Sokolowski, A., Rogero, S.O., Agostinho, S. M. L. and Barbosa, C.A. **INTERCORR 2008**.CD-ROM.
11. Jaimes, R.V.V., Andrade Afonso, M.L.C., Agostinho, S. M. L. and Barbosa, C. A. 62^o Congresso Annual da **ABM**, 2007.CD- ROM.
12. Villamil, R.F.V., Barbosa, C. A., Sokolowski, A. Agostinho S.M.L. **XXI CONBRASCORR**-Congresso Brasileiro de Corrosão. Anais do Congresso, 2001.
13. Trissel, L. A. Handbook on injectable drugs. (ed. Bethesda: **American Society of Hospital Pharmacists**, 1996
14. Drug Facts and Comparisons. 52 ed. Louis: **Facts and Comparisons**., 2008. <http://www.factsandcomparisons.com/Products/Product.aspx?id=116>
15. International Standard ISO 6892:1998. Metallic Materials —Tensile testing an ambient temperature.
16. International Standard ISO 5832-9, **Implants for Surgery-Metallic Materials**- part 9: Wrought high nitrogen stainless steel, 2001.
17. ISO document 10993-5.Biological evaluation of medical devices, part 5. **Test for cytotoxicity**: In vitro methods, 1992.
18. Rogero, S. O., Higa, O. Z., Saiki, M., Correa, O. V. and Costa, I. **Toxicology in vitro**. v.4, p. 497, 2000.
19. Rogero, S.O., Lugão, A.B., Iketa, T.I., Cruz, A.S. **Materials Research**, v.6, 3, p.317-320, 2003.
20. Masterton, L. W. and Hurley. **Chemistry Principles and Reactions**. Second Edition. Harcourt Brace College Publishers.1993. 468p.