



Ministério da
**Ciência, Tecnologia
e Inovação**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

**ANÁLISE FITOQUÍMICA SAZONAL E CULTURA DE TECIDOS *IN*
VITRO DE *Duroia macrophylla* Huber**

SABRINA SCHUMACKER ZANCA

MANAUS, AMAZONAS

2015

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA
COORDENAÇÃO DE TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
LABORATÓRIO DE BIOPROSPECÇÃO E BIOTECNOLOGIA

SABRINA SCHUMACKER ZANCA

**ANÁLISE FITOQUÍMICA SAZONAL E CULTURA DE TECIDOS *IN*
VITRO DE *Duroia macrophylla* Huber**

Orientação: Dra. CECILIA VERONICA NUNEZ

Dissertação apresentada ao Programa Integrado de Pós-Graduação em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Botânica.

MANAUS, AMAZONAS

Março, 2015.

AULA DE QUALIFICAÇÃO

PARECER

Aluna: **SABRINA SCHUMACKER ZANCA**
Curso: **BOTÂNICA**
Nível: **Mestrado**
Orientadora: **CECÍLIA VERÔNICA NUNEZ (INPA)**

Título:

"Análise da Sazonalidade Fitoquímica e Cultura de Tecidos in Vitro de Duroia Macrophylla Huber "

BANCA JULGADORA

TITULARES:

SÉRGIO MASSAYOSHI NUNOMURA (INPA)
ADRIAN MARTIN POHLIT (INPA)
DAIANE MARTINS RAMOS (INPA)

SUPLENTES:

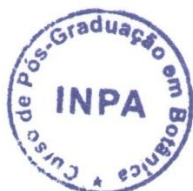
MARIA TERESA FERNADEZ PIEDADE (INPA)
ISOLDE DOROTHEA KOSSMANN FERAZ (INPA)

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
SÉRGIO MASSAYOSHI NUNOMURA	(X) Aprovado () Reprovado	
ADRIAN MARTIN POHLIT	(X) Aprovado () Reprovado	
DAIANE MARTINS RAMOS	(X) Aprovado () Reprovado	

Manaus (AM), 25 de Março de 2014.

OBS: _____

Alberto Vicentini
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Botânica
PO. 272/2012 DCBO/INPA



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA

Aos vinte seis dias do mês de maio de 2015 às 14:00h, na sala de aulas do Bloco CPPN/INPA-Campus I, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Dr. Sergio Massayoshi Nunomura, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque, da Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia(UEA) e Dra. Daiane Martins, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais (INPA), tendo como suplentes: Dr. Adrian Martin Pohlit, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), e Dr. Ricardo Lima Serudo, da Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia (UEA), sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, intitulada: **“Análise Fitoquímica Sazonal e Cultura de Tecidos in vitro de Duroia Macrophylla Huber”** discente: **Sabrina Schumacker Zanca**, sob orientação: Cecília Verônica Nunez.

Após a exposição, dentro do tempo regulamentar, a discente foi argüida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
SERGIO MASSAYOSHI NUNOMURA	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO () REPROVADO	
PATRÍCIA MELCHIONNA ALBUQUERQUE	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO () REPROVADO	
DAIANE MARTINS	<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO () REPROVADO	
ADRIAN MARTIN POHLIT	() APROVADO () REPROVADO	_____
RICARDO LIMA SERUDO	() APROVADO () REPROVADO	_____

Manaus (AM), 26 de Maio de 2015.

OBS: _____

Nada mais havendo, foi lavrado a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Dr. Michael John Gilbert Hopkins
Coordenador do Programa de
Pós Graduação em Botânica
PO. 258/2014 - DCTRO/INPA

Ficha catalográfica

Biblioteca do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

Z27 Zanca, Sabrina Schumacker
Análise fitoquímica sazonal e cultura de tecidos *in vitro* de
Duroia macrophylla Huber / Sabrina Schumacker Zanca. ---
Manaus: [s.n.], 2015.
xx, 116 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.
Orientadora : Cecilia Veronica Nunez.
Área de concentração : Botânica.

1. Fitoquímica. 2. *Duroia macrophylla*. 3. Alcaloides. I.
Título.

CDD 583.52

Sinopse:

A variação química dos metabólitos secundários das folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla* Huber foi analisada durante 12 meses. Também foi realizado o estabelecimento *in vitro* de calos a fim de determinar a sua composição química. Ambos foram analisados para verificar a presença de alcaloides e outros metabólitos produzidos pela espécie.

Palavras-chave: *Duroia macrophylla*, fitoquímica, cultura de tecidos *in vitro*.

Aos meus amados pais Simone e Eliton, às minhas queridas irmãs Susana e Sarah, às minhas avós Erany e Dinorá, e ao meu marido Wagner. A eles agradeço pelo amor, carinho, confiança, força e por tudo que sou. Com amor e gratidão, dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por toda força e coragem na hora de enfrentar os desafios.

À minha família, em especial aos meus pais Eliton e Simone, pelo apoio, incentivo, paciência, amor e carinho, não somente durante a realização do mestrado, mas em toda a minha vida, até mesmo quando distantes. Às minhas irmãs Sarah e Susana, por fazerem parte da minha vida. Obrigada por serem a minha fortaleza, meu porto seguro! Amo vocês!

Ao meu marido, meu amor, Wagner, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos, por fazer meu sonho se tornar realidade e compartilhar de tantos outros sonhos para um grande futuro juntos! Te amo!

Aos amigos e familiares que se encontram longe, em Santa Catarina, mas estão sempre presentes em meu coração e em minhas lembranças!

À minha orientadora Dra. Cecilia Veronica Nunez, pelos ensinamentos, oportunidades, pela confiança no meu trabalho e por toda ajuda durante o mestrado.

Ao Dr. Ricardo Serudo, pela colaboração na análise dos dados de componentes principais e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e pelos momentos que passamos juntos! Foram muitos aprendizados, alegrias e tristezas compartilhadas, tornando meus dias, nestes dois anos, muito felizes! Nunca me esquecerei da ajuda e apoio que todos sempre me deram!

Aos companheiros da turma 2013/2014 e professores da PPG-Bot do INPA, pela parceria e por compartilharem dos mesmos ideais que eu! Sucesso a todos!

Ao CNPq pela concessão da bolsa e apoio financeiro para o projeto.

Ao INPA pela infraestrutura e amparo, por ser minha segunda casa, e por possibilitar a realização do meu sonho de ser mestre.

A todos que de alguma forma ajudaram e/ou estiveram presentes durante todo o período do mestrado, meu grande obrigado!

RESUMO

ANÁLISE FITOQUÍMICA SAZONAL E CULTURA DE TECIDOS *IN VITRO* DE *Duroia macrophylla* Huber

A espécie amazônica *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) é produtora de triterpenos e alcaloides com atividades sobre *Mycobacterium tuberculosis* e um alcaloide com atividade tumoral. Entretanto, coletas realizadas em épocas diferentes mostraram diferença na composição química de diferentes indivíduos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a sazonalidade da produção de metabólitos secundários em extratos de *Duroia macrophylla*, durante um ano, em dois espécimes. Também foram obtidos calos *in vitro* da espécie para extrações fitoquímicas e análise da produção dos metabólitos secundários. Para as análises fitoquímicas dos dois indivíduos foram utilizadas folhas coletadas mensalmente de abril/2013 a março/2014. O material vegetal foi submetido à extração com hexano e metanol, em banho de ultrassom. Os extratos foram concentrados e posteriormente analisados por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H . Os espectros foram comparados por meio de uma análise de componentes principais. As culturas de tecidos *in vitro* foram estabelecidas com 50% de assepsia, após vários testes, a partir de explantes provindos de folhas jovens e com diferentes tempos de imersão dos reagentes químicos: etanol 70%, hipoclorito de sódio 2% e solução biocida. Depois de estabelecidos, os explantes *in vitro* foram induzidos ao processo de calogênese através da adição dos reguladores de crescimento cinetina e 2,4-D, em meio Murashige & Skoog. Os calos foram posteriormente extraídos com hexano e metanol e a produção dos metabólitos secundários foi avaliada por análise em CCDC e RMN de ^1H . Os extratos hexânicos e extratos metanólicos obtidos dos dois indivíduos de *Duroia macrophylla* apresentaram indícios da presença de alcaloides e terpenos em todos os meses, durante um ano. A análise de componentes principais demonstrou que há uma variação sazonal na composição química dos extratos hexânicos de folhas de *Duroia macrophylla*, onde o teor de alcaloides indólicos foi maior na época mais chuvosa. Nos extratos metanólicos das folhas, o mês de novembro apresentou teores significativamente menores de alcaloides indólicos em relação aos outros meses, para os dois indivíduos estudados. Sendo o mês de novembro a época de floração da espécie, pode-se inferir que a planta está redirecionando a sua rota biossintética para a produção de alcaloides indólicos menos polares e também para a produção de outros metabólitos. Os extratos dos calos de *D. macrophylla* apresentaram terpenos, mas não alcaloides, e não apresentaram atividades antioxidante, tóxica e antibacteriana nos ensaios realizados.

Palavras-chave: metabólitos secundários, alcaloides, terpenos, calogênese.

ABSTRACT

SEASONAL PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND *IN VITRO* TISSUE CULTURE OF *Duroia macrophylla* Huber

The Amazon species *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) produces triterpenes and alkaloids with activity against *Mycobacterium tuberculosis* and an indole alkaloid active against tumoral cell lines. Previous studies showed that different plant extracts had difference on the chemical composition. So, the present study aim to assess the seasonal production of secondary metabolites in *Duroia macrophylla* extracts, in two specimens for one year. Also, callus *in vitro* were obtained for phytochemical extraction and secondary metabolites production analysis. For the two plants phytochemical analysis, leaves were collected monthly from April/2013 to March/2014. Plant material was grounded and extracted with hexane and methanol, with ultrasound bath. The concentrated extracts were analyzed by thin layer chromatography (TLC) and ¹H-nuclear magnetic resonance (¹H-NMR). The NMR spectra were compared by principal component analysis (PCA). The *in vitro* tissue cultures were established from young leaves with 50% of asepsis after several assays and with different immersion times of the chemical reagents: 70% etanol, 2% sodium hypochlorite and biocide solution. *In vitro* explants were induced to callus formation process by adding the growth regulators kinetin and 2,4-D, on Murashige & Skoog media, and then extracted with hexane and methanol. The production of secondary metabolites was analysed by TLC and ¹H-NMR. All hexane and methanol extracts of two *Duroia macrophylla* individuals showed evidence of the presence of alkaloids and terpenes during a year. The PCA analysis showed seasonal variation on the chemical composition of the hexane extracts of *Duroia macrophylla*'s leaves, where the production of alkaloids increased during the rainy season. Regarding the methanol extracts of the leaves, the extract from November showed a lower alkaloid content. Being November the flowering species period, we can infer that the plant is redirecting its biosynthetic route for the production of less polar indole alkaloids or other metabolites. *D. macrophylla* callus extracts showed terpenes but not alkaloids production, and showed no antioxidant, toxic and antibacterial activities in the performed assays.

Keywords: secondary metabolites, phytochemical, calogenesis.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE ABREVIACÕES	XIX
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Produtos naturais e metabólitos secundários bioativos	04
2.2. Sazonalidade fitoquímica	08
2.3. Cultura de tecidos vegetais <i>in vitro</i>	10
2.3.1. Estabelecimento vegetal <i>in vitro</i>	11
2.3.2. Calogênese	13
2.4. Bioatividades	15
2.4.1. Ação antibacteriana	16
2.4.2. Ação antioxidante	16
2.4.3. Ação tóxica	17
2.5. Família Rubiaceae	18
2.6. Gênero <i>Duroia</i>	19
2.7. <i>Duroia macrophylla</i> Huber	21
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral	25
3.2. Objetivos Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. Estudo de sazonalidade fitoquímica	26
4.1.1. Local de coleta e pesquisa	26
4.1.2. Preparo dos extratos	27
4.1.3. Análise cromatográfica dos extratos	28
4.1.4. Identificação de metabólitos de interesse nos extratos	28
4.2. Cultura de tecidos <i>in vitro</i>	29
4.2.1. Local de coleta e pesquisa	29
4.2.2. Pré-desinfestação	29
4.2.3. Desinfestação	30

4.2.4. Indução de calo	31
4.2.5. Avaliação e estatística	32
4.2.6. Extração química dos calos.....	32
4.2.7. Testes para atividade antioxidante, antibacteriana e toxicidade dos calos.....	32
4.2.7.1. Teste antioxidante	32
4.2.7.2. Teste antibacteriano	33
4.2.7.3. Teste de toxicidade	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. Estudo de sazonalidade fitoquímica	36
5.1.1. Preparo dos extratos	36
5.1.2. Análises em Cromatografia de Camada Delgada.....	37
5.1.3. Análises em Ressonância Magnética Nuclear.....	44
5.2. Cultura de tecidos <i>in vitro</i>	63
5.2.1. Pré-desinfestação e desinfestação	63
5.2.2. Indução dos calos	67
5.2.3. Análise fitoquímica dos extratos dos calos	69
5.2.3.1. Preparo dos extratos	69
5.2.3.2. Análise em Cromatografia de Camada Delgada Comparativa	70
5.2.3.3. Análise em Ressonância Magnética Nuclear	74
5.2.4. Análise dos testes antioxidante, antibacteriano e de toxicidade	79
6. CONCLUSÃO.....	82
7. REFERÊNCIAS.....	84
8. ANEXOS	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Exemplos de alcaloides protótipos de fármacos (BARREIRO & BOLZANI, 2009).	07
Tabela 02. Tempos de imersão dos tratamentos de pré-desinfestação de explantes de <i>Duroia macrophylla</i>	30
Tabela 03. Tratamentos de desinfestação de explantes foliares de <i>Duroia macrophylla</i> com diferentes combinações e tempos de imersão em agentes químicos desinfestantes, em câmara de fluxo laminar.....	31
Tabela 04. Extratos de <i>Duroia macrophylla</i> preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia / COTI - INPA do indivíduo A.	36
Tabela 05. Extratos de <i>Duroia macrophylla</i> preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia / COTI-INPA do indivíduo B.	37
Tabela 06. Porcentagem de contaminação, sobrevivência e sobreviventes assépticos de explantes de folhas adultas de <i>Duroia macrophylla</i> submetidos a diferentes tratamentos de pré-desinfestação e desinfestação, cultivados em meio Murashige & Skoog (1962) (MS), após 30 dias.....	63
Tabela 07. Porcentagem de contaminação, sobrevivência e sobreviventes assépticos de explantes de folhas jovens de <i>Duroia macrophylla</i> submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação e cultivados em meio Murashige & Skoog (1962) (MS), após 30 dias.....	64
Tabela 08. Massa total de quatro grupos de calos de <i>Duroia macrophylla</i> após liofilização.....	70
Tabela 09. Extratos de calos de <i>Duroia macrophylla</i> preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia / COTI-INPA.	70

Tabela 10. Toxicidade de extratos de calos de *Duroia macrophylla* frente a larvas de *Artemia salina*, nas concentrações de 500 a 15 µg/mL de extrato.81

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários.	09
Figura 02. Distribuição de espécies da família Rubiaceae no mundo (TRÓPICOS, 2015).	18
Figura 03. Espécie <i>Duroia macrophylla</i> em habitat amazônico de terra-firme (Reserva A. Ducke). Detalhe das folhas (direita).	22
Figura 04. Características morfológicas de <i>Duroia macrophylla</i> Huber: A - ramo com folha ternada e estípula; B - estípula trisulcada; C – inflorescência; D – antera; E - estilete bífido; F - fruto com cálice persistente. (NASCIMENTO, 2013)	23
Figura 05. Exsicatas de <i>Duroia macrophylla</i> depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, números de depósito 259228 e 261554.	26
Figura 06. Fluxograma da preparação dos extratos.	27
Figura 07. Sequência de procedimentos para teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	35
Figura 08. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, sem reveladores, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2..	38
Figura 09. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em luz ultravioleta em 254 nm, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.	38
Figura 10. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em luz ultravioleta em 365 nm, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.	39
Figura 11. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em reagente de Dragendorff, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.	39

Figura 12. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em sulfato cérico, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.	40
Figura 13. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, sem reveladores, sistema de eluição DCM puro.....	41
Figura 14. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em luz ultravioleta em 254 nm, sistema de eluição DCM puro.	41
Figura 15. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em luz ultravioleta em 365 nm, sistema de eluição DCM puro.	42
Figura 16. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em reagente de Dragendorff, sistema de eluição DCM puro.	42
Figura 17. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> , coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em sulfato cérico, sistema de eluição DCM/MeOH 9:1.	43
Figura 18. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H de doze extratos hexânicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo A (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	45
Figura 19. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H de doze extratos hexânicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo B (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	46
Figura 20. Região detalhada de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H de doze extratos hexânicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo	

A (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	47
Figura 21. Região detalhada de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos hexânicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo B (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	48
Figura 22. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo A (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).....	49
Figura 23. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo B (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).....	50
Figura 24. Região detalhada de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo A (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	51
Figura 25. Região detalhada de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie <i>Duroia macrophylla</i> , indivíduo B (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	52
Figura 26. Valores da matriz de correlação da análise de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de <i>Duroia macrophylla</i>	55
Figura 27. Valores da matriz de correlação da análise de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de extratos metanólicos de <i>Duroia macrophylla</i>	55
Figura 28. Análise de componentes principais das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> (A e B) ao decorrer de um ano, onde 2, 5, 8 e 11 representam coletas dos meses de maio, agosto, novembro (2013) e fevereiro (2014), respectivamente.	56

Figura 29. Projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de <i>Duroia macrophylla</i> na análise de componentes principais.....	57
Figura 30. Região aumentada do primeiro quadrante direito da projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de <i>Duroia macrophylla</i> na análise de componentes principais.....	57
Figura 31. Índices pluviométricos na região de Manaus entre os meses de janeiro e dezembro de 2013 e janeiro e outubro de 2014 (INPE, 2014).	58
Figura 32. Região aumentada do primeiro quadrante esquerdo da projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de <i>Duroia macrophylla</i> na análise de componentes principais.	59
Figura 33. Análise de componentes principais das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos metanólicos de dois indivíduos de <i>Duroia macrophylla</i> (A e B) ao decorrer de um ano, onde: 2, 5, 8 e 11 representam coletas dos meses de maio, agosto, novembro (2013) e fevereiro (2014), respectivamente.....	61
Figura 34. Projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos metanólicos de <i>Duroia macrophylla</i> na análise de componentes principais.	62
Figura 35. Formação inicial de calo em segmento foliar de <i>Duroia macrophylla</i>	68
Figura 36. Calo multiforme de <i>Duroia macrophylla</i> , após dois meses <i>in vitro</i> : A – calo clorofilado; B – calo friável; C – calo compactado.	68
Figura 37. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de quatro grupos de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia macrophylla</i> , sem reveladores (A), em revelação com luz ultravioleta em 254 nm (B) e em 365 nm (C); sistema de eluição Hexano / Acetato de Etila com proporção 9:1.	71
Figura 38. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de quatro grupos de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia macrophylla</i> , com revelação em reagente de Dragendorff (A) e sulfato cérico (B); sistema de eluição Hexano / Acetato de Etila com proporção 9:1.	71

Figura 39. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de oito extratos metanólicos de quatro grupos de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia macrophylla</i> , sem reveladores, sistema de eluição metanol puro.	72
Figura 40. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de oito extratos metanólicos de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia macrophylla</i> , em revelação com luz ultravioleta em 254 nm (A) e 365 nm (B), sistema de eluição metanol puro.	72
Figura 41. Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de oito extratos metanólicos de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia macrophylla</i> , com revelação em reagente de Dragendorff (A) e sulfato cérico (B); sistema de eluição metanol puro.	73
Figura 42. Ressonância Magnética Nuclear de quatro extratos hexânicos de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia macrophylla</i> (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	75
Figura 43. Ressonância Magnética Nuclear de oito extratos metanólicos (quatro precipitados e quatro sobrenadantes) de calos cultivados <i>in vitro</i> de <i>Duroia macrophylla</i> (sinais ajustados com transformação de Fourier e Phase – Software ACD/Labs).	76
Figura 44. Esquema da formação dos extratos de calos conduzidos aos testes biológicos.	80

LISTA DE ABREVIações

- 2AH** – Extrato hexânico da coleta de maio/2013 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 2AM** – Extrato metanólico da coleta de maio/2013 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 2BH** – Extrato hexânico da coleta de maio/2013 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.
- 2BM** – Extrato metanólico da coleta de maio/2013 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.
- 5AH** – Extrato hexânico da coleta de agosto/2013 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 5AM** – Extrato metanólico da coleta de agosto/2013 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 5BH** – Extrato hexânico da coleta de agosto/2013 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.
- 5BM** – Extrato metanólico da coleta de agosto/2013 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.
- 8AH** – Extrato hexânicos da coleta de novembro/2013 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 8AM** – Extrato metanólico da coleta de novembro/2013 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 8BH** – Extrato hexânico da coleta de novembro/2013 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.
- 8BM** – Extrato metanólico da coleta de novembro/2013 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.
- 11AH** – Extrato hexânico da coleta de fevereiro/2014 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 11AM** – Extrato metanólico da coleta de fevereiro/2014 do indivíduo A de *Duroia macrophylla*.
- 11BH** – Extrato hexânico da coleta de fevereiro/2014 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.

11BM – Extrato metanólico da coleta de fevereiro/2014 do indivíduo B de *Duroia macrophylla*.

2,4-D – 2,4-diclorofenoxiacético

AIA – Ácido indolilacético

BAP – 6-benzilaminopurina

C5 – Isopreno

CIN – 6-furfurilaminaopurina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

DCM – Diclorometano

DMA – Tratamento de desinfestação de folhas adultas

DMC – Extrato de calos de *Duroia macrophylla*

DMCH – Extratos hexânicos de calos de *Duroia macrophylla*

DMCMp – Extratos metanólicos precipitados de calos de *Duroia macrophylla*

DMCMs – Extratos metanólicos sobrenadantes de calos de *Duroia macrophylla*

DMJ – Tratamento de desinfestação de folhas jovens

DMSO – Dimetilssulfóxido

Fe⁺³ – Ferro III

MeOH – Metanol

MS – Meio de cultura Murashige & Skoog (1962)

PCA – Análise de Componentes Principais

Rf – Fator de Retenção

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TPDA – Tratamento de pré-desinfestação de folhas adultas

TPDJ – Tratamento de pré-desinfestação de folhas jovens

UV – Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

As plantas vêm sendo utilizadas desde os primórdios da civilização na busca da cura e tratamento de diversas doenças, sendo cada vez mais intensa a procura por novos fitoterápicos, a partir dos diversos alvos terapêuticos que se apresentam ao passar do tempo. A busca por novos medicamentos em plantas vem sendo, atualmente, a esperança mais concreta para muitos pacientes com doenças graves, como o câncer.

As plantas constituem uma das mais importantes fontes de substâncias orgânicas, com uma variedade de classes químicas que despertam o interesse científico devido às suas propriedades biológicas e químicas. A extensa e diversa flora do Brasil tem imenso potencial como fonte de metabólitos secundários. Entretanto, somente uma pequena porcentagem da flora tem sido estudada quimicamente, e menos ainda farmacologicamente, se compararmos a quantidade de espécies de plantas conhecidas (PIMENTEL & ALMEIDA, 2010). A Floresta Amazônica, dentro do cenário nacional e mundial, destaca-se no fator biodiversidade, mas ainda apresenta poucos estudos fitoquímicos e em outras diversas áreas, considerando-se a grande diversidade de plantas que possui, podendo constituir uma fonte muito rica para a bioprospecção de produtos naturais biologicamente ativos.

Dentre as substâncias que podem ser encontradas nas plantas, as de interesse fitoquímico são produzidas a partir do metabolismo secundário, sendo estas produzidas em menor quantidade em relação ao metabolismo primário. Segundo Fumagali e colaboradores (2008), os metabólitos secundários têm sido sumariamente definidos como substâncias pouco abundantes, com uma frequência inferior a 1% do carbono total, ou pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicos. Estas moléculas são produzidas em diversas rotas metabólicas e são adaptativas para cada espécie ou grupo de plantas, onde apresentam atividades biológicas que ajudam no desenvolvimento, adaptação e/ou proteção da planta. Esta característica adaptativa do metabolismo secundário para cada grupo ou espécie de plantas é o que proporciona a diversidade de metabólitos encontrados entre as plantas, tornando a busca por substâncias de interesse constante e intensa.

Alcaloides, terpenos e flavonoides são alguns exemplos de metabólitos secundários que possuem grande importância econômica devido à utilização na indústria farmacêutica (CEQUINEL FILHO & YUNES, 1998).

Sabe-se que a produção dos metabólitos secundários é afetada pelos fatores ambientais em que a planta está exposta. A pesquisa biológica moderna, relacionada à interação dos organismos com o meio ambiente, não deve contemplar apenas a descrição macroscópica dos fenômenos em nível de espécie, populações ou indivíduos, mas buscar explicações científicas com maior profundidade em nível químico/bioquímico (CASTRO et al., 2004). O perfil fitoquímico da planta, estudada isoladamente, pode ser alterado por diversos fatores, como o local e época de coleta, polinizadores diferentes, exposição ao sol, entre outros fatores ambientais. Com isso, se torna necessária a realização de estudos onde sejam realizadas diferentes coletas, em diferentes épocas do ano, buscando conhecer os efeitos desses fatores na produção de metabólitos de interesse (RASKIN et al., 2002).

Tendo em vista o crescente consumo de cosméticos e medicamentos elaborados a partir de produtos naturais, cada vez mais se têm investido em pesquisas para a busca de novas substâncias de origem vegetal. Porém alguns fatores podem comprometer o uso das plantas medicinais para esses propósitos, como a heterogeneidade dos indivíduos, devido a variabilidades genética e bioquímica e dificuldade de multiplicação. Além disso, muitas espécies estão sob forte pressão antrópica, expostas a erosão genética e redução drástica de populações endêmicas o que dificulta a utilização em larga escala (COSTA, 2012).

Na busca por minimizar os fatores que influenciam na variabilidade e instabilidade na produção de metabólitos de interesse, técnicas como a produção *in vitro* vêm sendo aplicadas às pesquisas, bem como a interação cada vez mais intensa com a fitoquímica, trazendo benefícios bastante promissores em relação à produção em grande escala e produção constante dos metabólitos. Diferente da interação entre os fatores ambientais, sazonais e a planta, o estabelecimento de culturas de tecidos vegetais *in vitro* pode induzir um ambiente propício para a produção dos metabólitos para cada tipo de espécie, beneficiando a produção constante dos metabólitos das plantas.

A cultura de tecidos, para produção de metabólitos secundários, tem sido utilizada para a obtenção de algumas substâncias de importância econômica, como

a substância fenólica chiconina, corante natural, extraído de células cultivadas por suspensão celular de *Lithospermum erythrorhizon* estabelecidas *in vitro* (MIZUKAMI et al., 1993). Diversos trabalhos vêm demonstrando ótimos resultados com a utilização de culturas vegetais *in vitro* como fonte para a extração de metabólitos: Chakraborty e colaboradores (2013) extraíram com sucesso os metabólitos “whithaferin A” e “whithanolide A” a partir de calos de *Withania somnifera* (L.) Dunal e Kokotkiewicz e colaboradores (2012), a partir de calos de *Cyclopia subternata* Vogel, extraíram os flavonoides calicosina7-O-β-glucosídeo, rotidina e ononina, inéditos para esta planta.

Entre a grande diversidade de plantas, a família Rubiaceae, quarta maior família botânica entre as angiospermas, possui grande interesse econômico, agregando espécies utilizadas na alimentação, como o café (*Coffea arabica*), até espécies utilizadas amplamente na medicina popular e na fabricação de fitofármacos e fitoterápicos, como a unha-de-gato (*Uncaria tomentosa*) (OLIVEIRA, 2009).

Entre as diversas espécies com grande potencial da família Rubiaceae, encontra-se a espécie *Duroia macrophylla* Huber, que a partir de estudos fitoquímicos de suas folhas foi evidenciada a presença de um alcaloide indólico de interesse farmacêutico, com atividade biológica contra células tumorais (NUNEZ & VASCONCELOS, 2012) e também a presença de terpenos com atividades anti-tuberculose (MARTINS et al., 2014), além de outros estudos realizados com os galhos, que também indicaram terpenos e alcaloides indólicos com atividade anti-tuberculose (MARTINS et al., 2014). Porém, verificou-se que nem todos os extratos de folhas de diferentes indivíduos desta espécie apresentaram alcaloides.

Assim, o presente trabalho teve como finalidade avaliar a sazonalidade na produção dos metabólitos, principalmente alcaloides e terpenos, em extratos de folhas de *Duroia macrophylla*, durante um ano em dois indivíduos. Também teve como finalidade a obtenção de calos *in vitro* da espécie para extrações dos metabólitos secundários de interesse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produtos naturais e metabólitos secundários bioativos

A biodiversidade vegetal do Brasil é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos, a qual vem despertando a cobiça de laboratórios de pesquisa das empresas farmacêuticas localizadas, em sua ampla maioria, ao norte do Equador. Diante desta realidade, várias pesquisas de bioprospecção dos nossos biomas vêm sendo incrementadas objetivando a busca racional de bioprodutos de valor agregado (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON & ANDERSON, 1998). Muitas dessas substâncias constituem-se, sobretudo, em modelos para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos modernos, tais como procaína, cloroquina, tropicamida, ou de fármacos imprescindíveis como, vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®), podofilotoxina e os análogos etoposídeo (VP-16-213; Vepeside®) e teniposídeo (VM-26; Vumon®), taxol (Paclitaxel; Taxol®) e mais recentemente camptotecina e derivados, com participação num mercado que movimenta cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (PINTO et al., 2002).

Metabólitos secundários, podendo ser também denominados como princípios ativos se relacionados à utilização terapêutica, são substâncias produzidas pelos organismos como função adaptativa ao ambiente onde vivem, e são originadas de vias derivadas do metabolismo primário. Entre a diversidade dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas, podemos classificar estes em três grandes grupos de classes químicas: alcaloides, terpenoides e os substâncias fenólicos, onde suas diferenças se originam das suas rotas metabólicas precursoras (DELBONI & LANDO, 2010).

Os metabólitos secundários são produzidos em diferentes partes da planta, como raiz, folha, caule, casca, entre outros, e se originam de diversas rotas metabólicas, sendo que as principais rotas compreendem as vias acetato-malonato, acetato-mevalonato e chiquimato (SANTOS, 2007; DEWICK, 2002). A via do chiquimato é uma das maiores rotas biossintéticas em plantas superiores e engloba a formação de três aminoácidos aromáticos: fenilalanina, tirosina e triptofano, onde estes aminoácidos são utilizados como precursores de proteínas e diversos metabólitos secundários (HERRMANN, 1995).

Entre os grupos de metabólitos secundários com grande destaque em potencial medicinal, encontram-se os alcaloides. Alcaloides são moléculas nitrogenadas farmacologicamente ativas e são encontradas predominantemente nas angiospermas (HENRIQUES et al., 2007). Possuem em sua estrutura, além dos elementos básicos das substâncias orgânicas carbono e hidrogênio, oxigênio e sempre um ou mais átomos de azoto (nitrogênio), que conferem à molécula propriedades básicas. Esta característica originou a designação de alcaloide dada no início do século XIX por W. Meissner, termo que derivou da palavra árabe “al kaly” (alcalis) e da palavra grega “eidos” (aspecto) (CUNHA et al., 2005).

Especificamente, segundo Pelletier (1988), um alcaloide é uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. De acordo com Dewick (2002), os alcaloides são classificados de acordo com o aminoácido que fornece o átomo de azoto e a porção do esqueleto fundamental do alcaloide.

Os alcaloides podem ser encontrados em todas as partes de um vegetal, contudo em um ou mais órgãos haverá um acúmulo preferencial dessas substâncias. Esse acúmulo ocorre principalmente em quatro tipos de tecidos ou células: tecidos com crescimento ativo, células epidérmicas e hipodérmicas, bainhas vasculares e vasos lactíferos (PELLETIER, 1988).

A presença de alcaloides no reino vegetal é difundida entre diversas famílias. Nas eucotiledôneas, os alcaloides são regularmente encontrados em espécies das famílias Apocynaceae, Asteraceae, Berberidaceae, Borraginaceae, Buxaceae, Fabaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Rubiaceae, Rutaceae, entre outras. Nas monocotiledôneas, distinguem-se entre duas famílias: Liliaceae e Amarilidaceae

(CUNHA et al., 2005). Os alcaloides são encontrados em aproximadamente 14,2% dos gêneros de plantas superiores (CORDELL et al., 2001), em representantes de todos os grupos vegetais, apresentando distribuição restrita nas talófitas, nas pteridófitas e nas gimnospermas (HENRIQUES et al., 2007).

A função dos alcaloides nas plantas ainda é uma fonte de dúvidas na comunidade científica, onde muitas das hipóteses formuladas têm poucos fatos que as comprovem. Dado que muitos dos alcaloides são dotados de elevada toxicidade e têm um gosto amargo, admitiu-se que as plantas com estas moléculas estariam defendidas de herbívoros. No entanto, verificou-se que há animais que as comem, bem como numerosos insetos e fungos que as parasitam. Entre outras hipóteses formuladas, destacam-se: a hipótese de que os alcaloides sejam formados na desintoxicação do organismo vegetal durante o catabolismo primário, mas a tese não é compatível com o complexo processo biossintético dessas substâncias; a de que há relação entre os alcaloides e a síntese dos aminoácidos e substâncias proteicas, para além de servir de reserva de azoto e de ser uma forma de transporte de prótidos; a hipótese de que sejam hormônios reguladores de crescimento ou, ainda, inibidores de ataques de microrganismos e vírus; e a hipótese de que os alcaloides são produtos de uma evolução metabólica, cujos processos evolutivos intermédios só recentemente seriam atingidos (CUNHA et al., 2005).

Em relação às ações terapêuticas e farmacológicas, diversos alcaloides são utilizados puros ou em associação, e também na forma de derivados. Outros são utilizados como matéria-prima para a síntese de fármacos (HENRIQUES et al., 2007).

Os alcaloides, devido à sua grande diversidade estrutural, apresentam elevado número de atividades biológicas. Inúmeros alcaloides são representativos da importância desta classe de produtos naturais na descoberta de fármacos, conforme listado na tabela 01.

Tabela 01 - Exemplos de alcaloides protótipos de fármacos (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

Protótipo natural	Fármaco	Indicação terapêutica
Quinina	Mefloquina	Antimalárico
Pilocarpina	Pilocarpina	Colinesterásico
Tubocurarina	Hexametônio	Bloqueador ganglionar
Papaverina	Sildenafil	Antidisfunção erétil
Reserpina	Reserpina	Antiarritmico
Mescalina	Anfetamina	Anoréxico
Vincristina	Vincristina	Anticâncer
Galantamina	Galantamina	AntiAlzheimer
Camptotecina	Exatecan	Inibidor topoisomerase-2
Huperzina – A	Selagina*	AntiAlzheimer
Epibatidina	ABT - 418	Analgésico periférico

* Selagina é sinonímia de Huperzina-A

Outro grupo de metabólitos com grande potencial medicinal são os terpenos. Os terpenos, ou terpenoides, constituem o grupo mais numeroso de metabólitos secundários (mais de 40.000 moléculas diferentes). Os terpenos se classificam pelo número de unidades de isopreno (C₅) que contém: os terpenos de dez carbonos contêm duas unidades de C₅ e são chamados de monoterpenos; os terpenos de quinze carbonos possuem três unidades de isopreno e se denominam de sesquiterpenos; os terpenos com vinte carbonos contêm quatro unidades de C₅ e são chamados de diterpenos; os triterpenos contêm trinta carbonos (6x5C); os tetraterpenos possuem quarenta carbonos (8x5C); e os politerpenos são aqueles terpenos que possuem mais que oito unidades de isopreno (GARCIA & CARRIL, 2009).

Muitos terpenoides são comercialmente interessantes por seus usos como aromas e fragrâncias, na alimentação, cosmética, e também por suas qualidades como produtos agrícolas, como, por exemplo, inseticidas; outras substâncias terpenoides têm importância medicinal por suas propriedades anticarcinogênicas, antiulcerosas, antimaláricas, antimicrobianas, etc (GARCIA & CARRILL, 2009).

Um exemplo da importância dos terpenos e de sua pesquisa, em termos de potencial medicinal, é a atividade que o ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxi-olea-12-en-28-óico) tem apresentado, terpeno que demonstra atividade antitumoral, fazendo deste triterpeno pentacíclico alvo de estudo, assim como diversos outros terpenoides, uma vez este em especial possui capacidade de induzir a apoptose

celular e de modelar o ambiente do tumor aliando estas características ao seu poder anti-inflamatório, já que a inflamação possui um importante papel no desenvolvimento e progressão do câncer (MANTOVANI et al., 2008).

Para o estudo aprofundado das atividades biológicas que os metabólitos podem apresentar, é necessário que estas substâncias sejam devidamente isoladas de seu extrato original, para que seja possível elucidar suas moléculas e comprovar suas atividades biológicas sem a presença dos demais metabólitos presentes no extrato inicial da planta. Para tal processo, atualmente existem instrumentos e métodos de grande tecnologia que ajudam na separação e isolamento de substâncias, como métodos de cromatografia em placas de camada delgada ou colunas, e na elucidação e identificação de substâncias, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio e de Carbono-treze e Espectrometria de Massas.

2.2. Sazonalidade fitoquímica

Os metabólitos secundários em plantas podem ser encontrados em partes diferentes das plantas, sendo em flores, folhas, raízes, frutos, caules e até mesmo cascas. Suas concentrações não são homogêneas, variando com vários fatores abióticos e bióticos (figura 01), como: sazonalidade, temperatura, herbivoria e ataque de patógenos, radiação UV, índice pluviométrico, parte da planta, competição, estágio de desenvolvimento da planta, etc. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Portanto, se um estudo visa encontrar substâncias bioativas de vegetais, ou padronização de extratos com utilização terapêutica, deve considerar todos os fatores que possam influenciar na produção ou o acúmulo da(s) substância(s) de interesse, tendo cuidado especial com relação à época e local da coleta, secagem, transporte, etc (CALIXTO, 2001).

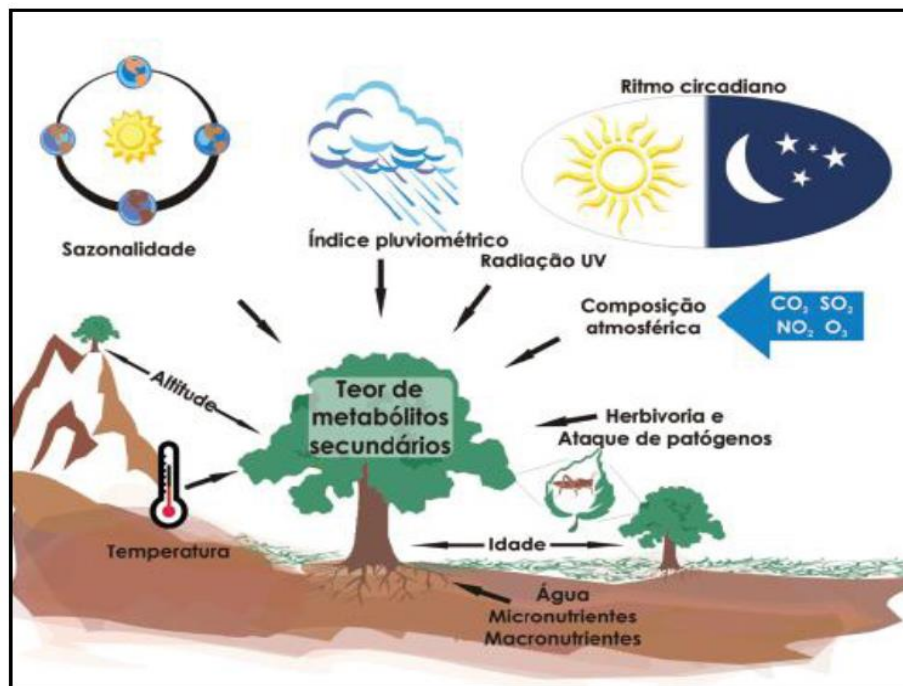


Figura 01: Fatores que influenciam no teor de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Na busca de novos fármacos, é importante realizar, além dos estudos fitoquímicos e farmacológicos da substância de interesse, estudos botânicos e sazonalidade química da substância produzida, pois normalmente vários princípios ativos de grande potencial farmacêutico acabam sendo descartados por problemas nestes quesitos. Segundo Evans (1996), a planta medicinal oferece dificuldades já na fase preliminar (botânica). Primeiramente, porque é comum a confusão botânica entre espécies afins; em segundo lugar, porque exemplares de uma mesma espécie, colhidos em épocas diferentes, ou locais diferentes, não têm necessariamente a mesma atividade biológica e; em terceiro lugar, porque é difícil controlar quimicamente um extrato vegetal em virtude do grande número de substâncias normalmente presentes.

É possível afirmar então que somente a identificação botânica de uma espécie não é suficiente para garantir a presença de uma substância de interesse nela. Estudos fitoquímicos sazonais devem ser realizados com a espécie medicinal, a fim de garantir, quantificar e validar a presença do metabólito de interesse, podendo então partir para as próximas etapas de estudos pré-clínicos.

2.3. Cultura de tecidos vegetais *in vitro*

Para a produção de substâncias naturais de interesse em maiores escalas e padronizadas, as indústrias farmacêuticas, cosméticas e afins buscam cada vez mais por novas tecnologias que correspondam economicamente e qualitativamente às demandas.

Tradicionalmente, a produção da maioria destas substâncias naturais tem sido realizada pela extração de substâncias de espécies vegetais espontâneas ou, mais recentemente, de espécies cultivadas em plantações organizadas. Porém, a produção de substâncias naturais por via agrícola esta sujeita a diversos fatores que condicionam o custo e a qualidade das matérias-primas, tais como as condições climáticas e geopolíticas dos países produtores, a sazonalidade das produções agrícolas, as variações do teor em constituintes ativos nas plantas da mesma espécie, as pragas e doenças nas plantações, a escassez e dificuldade de propagação de certas espécies, etc. (PARANHOS, 2005).

Outro fator a ser considerado está relacionado com a destruição de habitats naturais e coletas ilegais e indiscriminadas de plantas nesses locais, que acabam ameaçando tanto as espécies de plantas medicinais como o próprio ambiente (MAHENDRAN, 2013). Além disso, a grande maioria das plantas medicinais é coletada em habitat natural, e por maior que seja o número de indivíduos numa localidade, não serão suficientes para atender uma demanda constante e ininterrupta de uma determinada substância química, principalmente quando a substância tem multiusos (COSTA, 2012).

Uma alternativa eficaz para a obtenção destes produtos, neste contexto, é a tecnologia da cultura de células e tecidos vegetais *in vitro*, que assegura um controle mais rigoroso do rendimento e da qualidade da produção das substâncias bioativas, além da conservação dos recursos genéticos.

Foi em 1872 que o botânico alemão Vochting, ao pesquisar os fatores que tomam parte na formação de órgãos e na diferenciação em plantas, relatou que em cada fragmento de planta, ainda que pequeno, permanecem os elementos, a partir dos quais após o isolamento dos referidos fragmentos, em condições apropriadas, pode-se reconstruir todo o organismo (MANTELL et al., 1994). A partir deste relato, vários estudos foram realizados, por diversos cientistas, em busca de protocolos e

respostas em relação à cultura de tecidos vegetais, fazendo com que hoje os avanços na área da cultura de tecidos sejam cada vez maiores e mais importantes.

A propagação vegetativa *in vitro*, também denominada de micropropagação por causa do tamanho dos propágulos utilizados, é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e aquela de maior impacto (TORRES et al., 1998). A micropropagação pode ser definida como “qualquer” procedimento asséptico que compreende a manipulação de células, tecidos e órgãos que produzem populações de plântulas e que permitam o desvio tanto do processo sexual normal como da propagação vegetativa não asséptica que é praticada convencionalmente (ROCA e MROGINSKI, 1991). Além da capacidade para a multiplicação rápida de plantas, a micropropagação também oferece um meio de eliminação de muitas doenças de plantas cultivadas. Isto se deve, segundo Mantell e colaboradores (1994), à erradicação de agentes patogênicos, seja como parte da fase de descontaminação da preparação do explante, durante a fase de assepsia do mesmo, ou como resultado do cultivo de explantes suficientemente pequenos, que contêm muito pouco ou nenhum dos agentes infecciosos.

2.3.1. Estabelecimento vegetal *in vitro*

As técnicas de propagação *in vitro*, possuem vários estágios e processos, havendo mudanças em seus protocolos por causa das peculiaridades de cada espécie. Os estágios básicos, segundo Debergh & Zimmerman (1991), são:

- Estágio 0 – seleção e preparação dos explantes da planta matriz: consiste em selecionar e cultivar plantas doadoras (matriz) em condições adequadas visando alterar sua condição fitossanitária e fisiológica com o intuito de se produzir um material saudável e capaz de iniciar uma cultura viável e eficiente;
- Estágio 1 – estabelecimento de processos de desinfestação: tem o objetivo de obter culturas assépticas de explantes da planta selecionada capaz de responder por crescimento de broto, raiz ou caule, nesta etapa busca-se estabelecer culturas isentas de microrganismos contaminantes, estabelecendo assim altos índices de sobrevivência;
- Estágio 2 – multiplicação das plântulas: aumento de órgão ou estruturas, como gemas axilares, laterais pré-formadas; indução de gemas adventícias, que podem

dar origem a novas plantas; ou indução de células indiferenciadas (calos), onde posteriormente cada célula poderá ser induzida a gerar uma nova planta;

- Estágio 3 – enraizamento: indução e iniciação radicular, ou seja, enraizamento da microplanta e preparação para a aclimatização;
- Estágio 4 – aclimatização: transição da condição heterotrófica *in vitro* para autotrófica *ex vitro*.

O estado fisiológico da planta de onde serão retirados os explantes tem grande influência no posterior comportamento das culturas. A primeira consideração diz respeito ao estado nutricional da planta e à fase de crescimento em que se encontra; plantas bem nutridas, sem sintomas de deficiência nutricional e hídrica, em geral, fornecem melhores explantes (TORRES et al., 1998). Deve-se também ser considerada a condição fitossanitária da planta matriz, que é de grande importância para o bom desenvolvimento do explante, pois irá determinar a facilidade em descontaminar o explante durante os processos de isolamento e assepsia.

Várias substâncias com ação germicida são utilizadas para fazer a desinfestação dos explantes. Os mais comuns são o etanol e os compostos a base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio e de cálcio (TORRES et al., 1998). O cloreto de mercúrio também tem sido empregado nos protocolos de assepsia, sempre utilizados em concentrações e tempos de exposição menores, por causa de sua característica tóxica (GEORGE, 1993).

Após as assepsias, os explantes são colocados em meios de cultura para o início do desenvolvimento de cultivo. Não há uma formulação padrão, mas o meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) tem apresentado em suas modificações e diluições bons resultados para diversas espécies (TORRES et al., 1998). Este meio é composto por macronutrientes inorgânicos contendo nitrogênio, sódio, potássio, fósforo, cálcio, magnésio e ferro; micronutrientes inorgânicos contendo manganês, cobre, zinco, boro, sódio, cloro, iodo, enxofre, molibdênio, cobalto, alumínio e níquel; vitaminas como ácido nicotínico, piridoxina e tiamina; fontes de nitrogênio orgânico glicina e inositol; sacarose; e agente gelatinoso opcional, o ágar. Existem outros meios de cultura bastante utilizados, que são formulações mais específicas para cada tipo de vegetal, como, por exemplo, o meio de cultura Wood Plant Medium (WPM) (LLOYD & McCOWN, 1981), bastante potencial para plantas lenhosas. O meio WPM, de acordo com Pasqual (2001), possui 25% das concentrações de íons nitrato e

amônia, quando comparado ao meio MS, mais potássio e um elevado nível de íons sulfato, fazendo com que plantas lenhosas tenham melhor desempenho no desenvolvimento *in vitro*.

A adição de nutrientes e reguladores de crescimento nos meios de cultura é de grande importância, de acordo com o objetivo do estabelecimento *in vitro* dos explantes. Dependente do tipo de regulador, sua concentração e sua combinação com outros reguladores, estes podem induzir o desenvolvimento do explante formando novos órgãos, podem induzir a formação de massas de células indiferenciadas, chamados de calos, ou podem induzir a formação de embriões somáticos, processo denominado de embriogênese somática.

2.3.2. Calogênese

Sabe-se que uma das características mais notáveis das plantas está na capacidade de suas células somáticas se desdiferenciarem, e logo retomarem a divisão celular e produzirem novas plantas. Esta capacidade é explicada pelo conceito da totipotência, onde teoricamente qualquer célula vegetal possui a capacidade de formar uma nova planta (CANHOTO, 2010).

No cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais, uma das maneiras de multiplicação é por meio da organogênese indireta, passando pela fase de calo (massa de células indiferenciadas). Para ocorrer a indução de calo, qualquer tecido vegetal pode ser utilizado como explante. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que apresentem maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Explantes oriundos de tecidos jovens, não lignificados, são mais apropriados para a cultura de calo (PIERIK, 1990).

O calo corresponde a uma massa de células desorganizadas e parcialmente indiferenciadas que variam quanto ao tipo, tamanho, conteúdo celular e espessura da parede. Traqueídeos, células parenquimáticas, câmbio e periderme podem se formar durante a calogênese (NARAYANASWAMY, 1977). Na rota da calogênese, são formados calos nodulares, que apresentam aspecto heterogêneo; e os calos friáveis, que apresentam uma estrutura tenra composta de células com alta atividade mitótica (BESSE et al., 1992).

Para a indução do processo de calogênese, normalmente os reguladores de crescimento, a concentração e o balanço de auxinas e citocininas, são fatores determinantes na diferenciação celular e no padrão de desenvolvimento *in vitro* (GUEYE et al., 2009). As auxinas desencadeiam os processos de desdiferenciação (modelo indireto) e rediferenciação (modelo direto) *in vitro*, alterando a determinação e conferindo novas competências às células responsivas dos explantes (FEHE´R et al., 2003); as citocininas estimulam a divisão celular e podem induzir a embriogênese somática (MELLO et al., 2000).

Segundo Flick e colaboradores (1983) e Grattapaglia & Machado (1990), em geral, meios contendo altas concentrações de auxina e baixas concentrações de citocininas promovem a proliferação celular resultando na formação de calos. Esta proporção hormonal tem apresentado bons resultados para a calogênese em outras espécies lenhosas, como *Minquartia guianensis* (MORAIS, comunicação oral, 2015) e *Uncaria guianensis* (PEREIRA et al., 2007).

Entre os reguladores de crescimento mais comumente utilizados no processo de calogênese, encontram-se as citocininas cinetina (CIN) e 6-benzilaminopurina (BAP) e as auxinas ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), thidiazuron (TDZ) e picloram (PIC).

A indução de células indiferenciadas *in vitro* atualmente é uma das formas mais eficazes de se obter metabólitos secundários, onde os calos são induzidos a produzirem os metabólitos de interesse com a utilização de biorreatores e suspensão celular (FUMAGALI et al., 2008).

As culturas de células de plantas podem sintetizar grandes quantidades de metabólitos secundários dentro de um período de cultivo de duas semanas. Isto é muito favorável em relação à produção na planta, para as quais o espaço de tempo para o acúmulo destes metabólitos pode variar de uma estação para plantas anuais ou diversos anos no caso das plantas perianuais, como por exemplo, as árvores (CROTEAU et al., 2000). Nas culturas de células de plantas as taxas de biossíntese podem ser aumentadas, facilitando grandemente os estudos fitoquímicos de diversas espécies com potencial medicinal (SANTOS et al., 2007).

Como exemplo, temos o alcaloide cafeína, que foi extraído a partir da cultura de calos *in vitro* da espécie *Coffea arabica* (Rubiaceae) com grande sucesso. As espécies *Nicotiana tabacum* e *Panax ginseng* apresentaram ótimos resultados nas

extrações de metabólitos de interesse através de calos *in vitro* (PARANHOS, 2005). Yoshimatsu (2008), a partir do cultivo de calos e de raízes *in vitro* de *Cephaelis ipecacuanha* (Rubiaceae), também identificou a produção de alcaloides *in vitro*, sendo estes nos mesmos teores que a produção da planta *in situ*.

Atualmente a busca pela extração de metabólitos através das culturas de tecido *in vitro* vem aumentando, justo pela necessidade de desenvolvimento de novos processos sustentáveis. Diversos trabalhos vêm demonstrando ótimos resultados com a utilização de culturas vegetais *in vitro* como fonte para a extração de metabólitos: Chakraborty e colaboradores (2013) extraíram com sucesso os metabólitos withaferin A e withanolide A a partir de calos de *Withania somnifera* (L.) Dunal; Kokotkiewicz e colaboradores (2012), a partir de calos de *Cyclopia subternata* Vogel, extraíram os flavonoides calicosina 7-O- β -glucosídeo, rotidina e ononina, inéditos para esta planta; Ferri e colaboradores (2011) obtiveram polifenóis, como estilbenos e catequinas, a partir de suspensões celulares de uva (*Vitis vinifera* cv. Barbera); Cui e colaboradores (2010) otimizaram, através da tecnologia de biorreator em culturas de raízes adventícias de *Hipericum perforatum*, a produção de hipericina; entre outros.

A micropropagação e a calogênese são alternativas eficazes para estudos do metabolismo secundário *in vitro*, reduzindo a exploração de biomassa de espécies de interesse diretamente da natureza. Assim, o uso de cultura de células de planta para a produção de substâncias químicas e medicamentos contribui grandemente para avanços em diversas áreas da fisiologia e bioquímica vegetal. O uso de ferramentas genéticas e o grande conhecimento atual sobre a regulação das vias do metabolismo secundário poderão fornecer a base para a produção destes metabólitos em níveis aceitáveis comercialmente (FUMAGALI et al., 2008).

2.4. Bioatividades

Atualmente existem diferentes tipos de ensaios que são realizados para identificar metabólitos bioativos, que diferem entre si a partir do objetivo da ação farmacológica que se espera encontrar na substância estudada.

2.4.1. Ação antibacteriana

A descoberta dos antibióticos foi uma parte essencial no combate a infecções bacterianas que sempre assolaram a humanidade. Entretanto, o desenvolvimento e a disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos atualmente disponíveis é uma séria preocupação mundial (SARAIVA, 2012).

A resistência microbiana cada vez maior às drogas existentes é um problema sério de saúde e, portanto, há uma necessidade premente para procurar novas classes de substâncias antibacterianas, especialmente a partir de fontes naturais. Uma alternativa terapêutica para o tratamento de micro-organismos resistentes a antibióticos é a utilização de extratos vegetais. Há muitas vantagens no uso de compostos antimicrobianos de plantas medicinais, como menos efeitos colaterais, melhor tolerância do paciente, mais econômico e melhor aceitação devido à longa história de uso (GUR et al. 2006; PAREKH & CHANDA, 2007).

Com foco na Amazônia Brasileira, que apresenta uma grande variedade de plantas, pesquisas têm evidenciado que estas podem ser potenciais fontes de substâncias antimicrobianas, e têm sido frequentemente relatadas nos últimos anos em diferentes estudos. Um dos exemplos é o estudo realizado por Saraiva (2012), onde todos os extratos e frações das espécies amazônicas *Eleutherine plicata*, *Geissospermum vellosii* e *Portulaca pilosa* demonstraram atividade para pelo menos uma espécie de bactéria multirresistente testada, comprovando que as plantas medicinais podem representar uma importante alternativa no controle da resistência bacteriana.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é um dos diversos tipos de ensaios antibacterianos, e é definida pela menor concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação de um isolado bacteriano. Um dos métodos de CIM mais utilizados é baseado no experimento de Ellof (1998), por ser um método que foi idealizado para uso em extratos vegetais e que apresenta sensibilidade a quantidades mínimas de reagentes, o que possibilita um maior número de réplicas, aumentando a confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al. 2008).

2.4.2. Ação antioxidante

No organismo, os radicais livres desempenham diversos papéis, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização

intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, o excesso deles pode ser responsável por uma série de efeitos deletérios, causando danos às membranas, perda de fluidez da mesma, e levando ao surgimento de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, entre outras doenças (SÁ et al., 2012).

Este excesso é combatido por antioxidantes, sejam eles endógenos ou exógenos, absorvidos na dieta. Dentre os antioxidantes exógenos, destacam-se os fenólicos, principalmente os flavonoides, oriundos de produtos naturais. Por apresentarem ressonância após atuarem no combate aos radicais livres, as substâncias fenólicas possuem uma certa estabilidade, que as permite reter o elétron desemparelhado sem causar danos às estruturas celulares (BARREIROS et al., 2006; SOARES, 2002).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias de plantas, de formas a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes. Dentre estes métodos destaca-se o sistema de seqüestro de radicais livres, tais como os testes com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e Fe^{+3} /Fenantrolina (PRIOR et al., 2005). Estes métodos são baseados no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis de determinada cor quando adicionadas substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio.

2.4.3. Ação tóxica

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias (FORBES & FORBES, 1994). Determinadas substâncias podem apresentar toxicidade suficiente para o combate de pragas, com uso inseticida, ou podem ser utilizadas no tratamento contra células tumorais.

Muitos ensaios de toxicidade podem ser utilizados, como ensaios com células humanas, com ratos, entre outros. Entretanto, o ensaio de letalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para detectar substâncias bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982), é amplamente utilizado, pois é de fácil manipulação em laboratório e possui baixo custo econômico, tornando

possível procedimentos de biomonitoramento na área da fitoquímica, tanto com extratos brutos como de frações e substâncias puras.

2.5. Família Rubiaceae

Dentre a vasta gama de plantas com alto potencial medicinal na flora amazônica, destacam-se as plantas pertencentes à família Rubiaceae. Diversas espécies desta família detêm importância econômica, sendo utilizadas como alimentícias, ornamentais e na indústria farmacêutica, como medicinais e/ou tóxicas (COELHO et al., 2006).

A família Rubiaceae é a maior da ordem Gentianales, com 598 gêneros e 13.443 espécies (GOVAERTS et al., apud MARINERO et al., 2012) correspondendo a mais de 60% do total das Gentianales. Nos neotrópicos, a família Rubiaceae possui representatividade de 26 tribos (8 delas endêmicas) e cerca de 230 gêneros contendo aproximadamente 5.000 espécies, em 41 países e administrações territoriais (TAYLOR, comunicação oral, 2014).

Estudos filogenéticos propõem a divisão de Rubiaceae em três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae (BREMER et al., 1999). Esta família ocorre em todas as regiões do mundo, mas principalmente nos trópicos (figura 02) (TRÓPICOS, 2015).

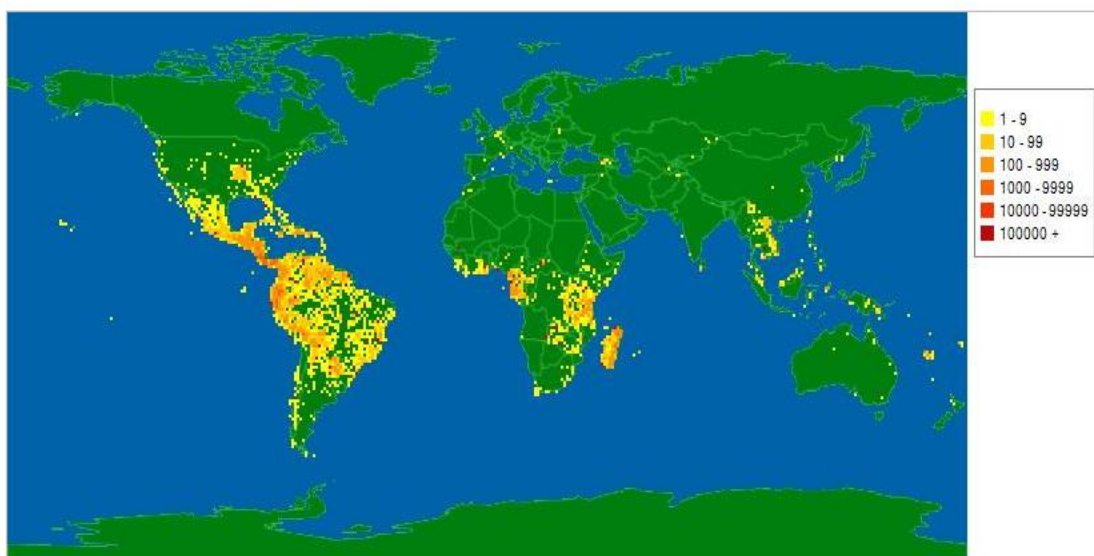


Figura 02 – Distribuição de espécies da família Rubiaceae no mundo (TRÓPICOS, 2015).

No Brasil, a família Rubiaceae é bem representada, sendo encontrados 125 gêneros e 1392 espécies (BARBOSA et al., 2015). Na Amazônia Brasileira está representada por 102 gêneros, 712 espécies, 17 subespécies e 32 variedades (ZAPPI, 2013). Estudos de levantamentos florísticos da Reserva Florestal Ducke, uma das maiores áreas já mapeadas da região, demonstram a grande representatividade da família, constituindo uma das maiores famílias em número de espécies encontradas, com 99 espécies distribuídas em 36 gêneros (TAYLOR et al., 2007).

A maioria das espécies de Rubiaceae são árvores de pequeno porte ou arbustos muito frequentes no sub-bosque. A família pode ser facilmente reconhecida pelas folhas geralmente opostas e pela presença de estípulas interpeciolares. A grande variação nas formas, tamanhos e cores das flores atrai um grande número de polinizadores para a família, sendo que a polinização pelo vento não ocorre no Neotrópico. Os frutos carnosos também variam nas cores e tamanhos, sendo dispersos por pássaros, morcegos ou ainda por pequenos mamíferos (TAYLOR et al., 2007).

2.6. Gênero *Duroia*

Duroia L. F. possui origem nativa e não é endêmico do Brasil. Foi descrito por Linnaeus, no ano de 1782, quando propôs a espécie-tipo, *Duroia eriopila* L. F. (NASCIMENTO, 2013).

Este gênero, pertencente à família Rubiaceae, subfamília Ixoroideae e tribo Gardenieae, apresenta 35 espécies neotropicais, distribuídas desde a América Central, Colômbia, Guianas, Equador, Peru, Bolívia até o Brasil central, e é semelhante ao gênero *Amaioua*, porém as flores pistiladas e os frutos solitários caracterizam *Duroia* (TAYLOR et al., 2004; DELPRETE, 2010).

Nascimento (2013), através de um levantamento dos espécimes do gênero *Duroia* depositados nos herbários IAN, MG, RB, INPA e SPF, constatou um total de 22 espécies de *Duroia* na Amazônia Brasileira: *D. amapana*, *D. aquatica*, *D. duckei*, *D. eriopila*, *D. fusifera*, *D. genipoides*, *D. gransabanensis*, *D. hirsuta*, *D. hirsutissima*, *D. kotchubaeoides*, *D. longiflora*, *D. macrophylla*, *D. maguirei*, *D. micrantha*, *D. nitida*,

D. palustris, *D. paraensis*, *D. petiolares*, *D. prancei*, *D. saccifera*, *D. triflora* e *D. velutina*. Na Reserva Florestal Ducke, uma das reservas mais estudadas na Amazônia, foram encontradas e identificadas em levantamento florístico quatro espécies do gênero, descritas na chave de identificação abaixo (TAYLOR et al., 2007).

Chave de identificação - *Duroia* na Reserva A. Ducke (TAYLOR et al., 2007):

- 1. Folhas opostas *D. gransabanensis*
- 1'. Folhas ternadas.
 - 2. Folhas sésseis, com um par de domácias em forma de bolsa na base *D. saccifera*
 - 2'. Folhas pecioladas, sem domácias conspícuas base.
 - 3. Folhas lanceoladas a elípticas ou obovadas, cartáceas, 25–30 × 8–11 cm; pecíolo 1,5–2 cm comprimento. *D. longiflora*
 - 3'. Folhas ovadas a lanceoladas, coriáceas, 30–40 × 14–24 cm; pecíolo 5–8, 5 cm comprimento. *D. macrophylla*

Segundo Taylor e colaboradores (2007), a descrição morfológica que caracteriza o gênero segue da seguinte maneira: podem ser árvores, arvoretas ou arbustos, dioicos, frequentemente com formigas nos ramos ou folhas; ramos quadrangulares ou cilíndricos, frequentemente fistulosos, glabros ou pilosos; estípulas unidas num capuz cônico sobre a gema terminal, decíduas, seríceas ou pilosas; folhas opostas ou 2–5-verticiladas, decussadas, sésseis ou pecioladas, às vezes dotadas de protuberâncias basais cuja presença está associada com a presença de formigas; inflorescências estaminadas terminais, cimosas, fasciculadas ou capitadas; flores estaminadas com cálice truncado ou 5–8-lobado; corola hipocrateriforme, alva a amarelada, geralmente carnosa, serícea externamente, glabra a pilosa internamente, 5–8-lobada, prefloração contorta; estames 5–8, inseridos no tubo da corola, anteras dorsifixas; pistilódio semelhante ao estigma, ovário estéril; inflorescências pistiladas 1–3-floras, capitadas; flores pistiladas com cálice e corola semelhantes ao das flores estaminadas ou frequentemente de tamanho maior; estaminódios semelhantes aos estames; ovário 1-locular, óvulos muitos por lóculo; estigma inteiro; frutos bacáceos, bem desenvolvidos, ovoides ou

oblongos, coriáceos ou lenhosos, geralmente pardos; sementes numerosas, comprimidas ou suborbiculares, envolvidas numa polpa gelatinosa.

Espécies do gênero *Duroia* são comumente habitadas por formigas, formando uma relação de mutualismo entre a planta e as mesmas. Normalmente as plantas que possuem este tipo de relação, dentro do gênero, possuem domáceas (estruturas anatômicas presentes na face inferior das folhas ou em suas bases), como, por exemplo, as espécies *Duroia saccifera* e *Duroia hirsuta* (NASCIMENTO et al., 2013).

Poucos estudos fitoquímicos, até hoje, foram realizados sobre este gênero. Apenas duas espécies, *Duroia hirsuta* e *Duroia macrophylla*, possuem estudos fitoquímicos e/ou ecológicos. A espécie *Duroia hirsuta* é utilizada como medicamento de cura popular, e demonstrou em pesquisas atividades bioativas contra *Mycobacterium phlei* (LOPEZ et al., 2001) e atividade antiviral contra o vírus *Herpes simplex* (HSV) em estudos *in vitro* (KHAN et al., 2005), além de estudos fitoquímicos que isolaram flavonoides e uma lactona iridoide da planta (AQUINO et al., 1999). Já *D. macrophylla* é o tema da presente dissertação. Com isso, existe ainda um grande número de espécies com nenhum estudo químico ou biológico do gênero, justificando a demanda de novas pesquisas.

2.7. *Duroia macrophylla* Huber

Entre as diversas espécies com grande potencial da família Rubiaceae e do gênero *Duroia*, encontra-se a espécie *Duroia macrophylla* Huber, popularmente conhecida como puruí ou puruí-grande-da-mata (figura 03). É uma espécie arbórea, frutífera comestível, não cultivada, e é encontrada na região amazônica, geralmente em habitat de solo argiloso, úmido e margens de igarapé, mas também se apresentam em habitats diversos como em moitas de tucumã e cupiúba (NASCIMENTO, 2013). Esta espécie ocorre nas Guianas e no Brasil, nos estados do Pará, Amapá, Rondônia e Amazonas. Segundo Campos & Brito (1999), em estudos realizados na Reserva Ducke, em Manaus (AM), a espécie ocorre nas florestas de baixio, vertente e platô; floresce em novembro e dezembro e frutifica de janeiro a junho. Já Nascimento (2013) encontrou espécies de *Duroia macrophylla* florescendo em setembro, outubro, novembro e dezembro, e frutificando em outubro e dezembro.



Figura 03 – Espécie *Duroia macrophylla* em habitat amazônico de terra-firme (Reserva A. Ducke). Detalhe das folhas (direita).

Segundo Taylor e colaboradores (2007), a espécie *Duroia macrophylla* Huber é descrita morfologicamente como: árvores de 15 a 20 metros de altura, 12 a 25 centímetros de diâmetro, com tronco circular, base às vezes acanalada, digitada; ritidoma marrom a marrom avermelhado, levemente fissurado, escamoso; exterior da casca marrom ou bege, fibrosa, com 2 a 3 milímetros de espessura; casca internamente marrom, alaranjada ou rosada, com 3 a 5 milímetros de espessura; alborno bege ou alvo-alaranjado; odor forte; ramos quadrangulares, espessos, fistulosos, ferrugíneo-hirsutos; estípulas com 3 a 4 x 1,5 centímetros, ferrugíneo-tomentosas; folhas ternadas, longamente pecioladas; pecíolo com 5 a 8,5 centímetros de comprimento; lâmina ovada a lanceolada com 30 a 40 x 14 a 24 centímetros, coriácea, ápice acuminado, base obtusa, face adaxial glabra exceto as nervuras seríceas, face abaxial pubérula com as nervuras tomentosas; nervuras laterais entre 18 e 21 pares, impressas na face adaxial; inflorescências estaminadas umbeladas, multifloras, com 4,5 a 5,5 centímetros de comprimento; flores

estaminadas pediceladas, pedicelos de 0,5 a 3 centímetros de comprimento; cálice truncado ou 6-denticulado, com 1,5 centímetro de comprimento, seríceo; corola creme, com 3,3 a 4 centímetros de comprimento, serícea, 6-lobada; flores pistiladas não vistas; bagas solitárias, sésseis, subglobosas ou elipsóides, com 5,5 a 7,6 x 7 a 7,6 centímetros, ferrugíneo-tomentosas; sementes orbiculares, comprimidas, pubescentes, com 6 x 7 milímetros. Na figura 04 é possível observar as principais características da espécie.

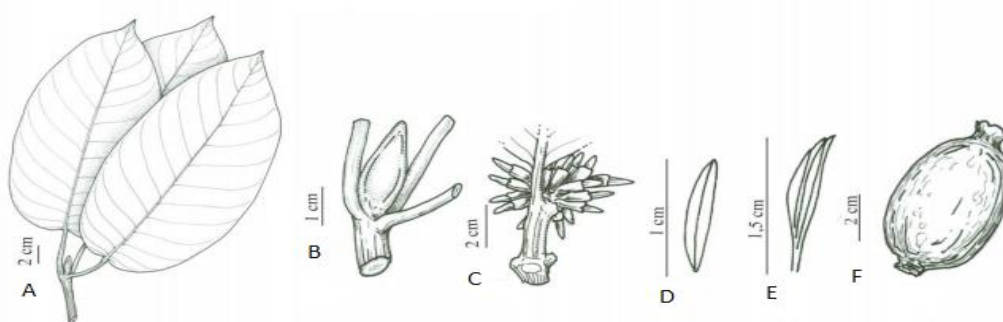


Figura 04 – Características morfológicas de *Duroia macrophylla* Huber. A - ramo com folha ternada e estípula; B - estípula trisulcada; C – inflorescência; D – antera; E - estilete bifido; F - fruto com cálice persistente (NASCIMENTO, 2013).

A espécie *Duroia macrophylla* vem sendo pesquisada atualmente por um único grupo de pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, onde alguns extratos de diferentes espécimes já demonstraram atividades com grande potencial medicinal. Estudos evidenciaram a presença de um alcaloide indólico de interesse farmacêutico em extratos de suas folhas, ao qual apresentou atividade antitumoral (NUNEZ & VASCONCELOS, 2012). Foram também isolados de extratos metanólicos de folhas os triterpenos ácido oleanólico e ursólico, que demonstraram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose (MARTINS *et al.*, 2013), além de alcaloides indólicos isolados a partir de extratos metanólico e diclorometânico de galhos, que também apresentaram atividade contra a mesma micobactéria (MARTINS, 2014).

Atualmente várias doenças ainda se encontram sem cura ou com tratamentos ainda pouco aprimorados, como o câncer e a tuberculose. A descoberta de novas

drogas para o tratamento e a possível cura de tais doenças é de extrema importância, e as atividades biológicas que *Duroia macrophylla* tem apresentado diante das mesmas, em testes preliminares, mostram a importância do aprofundamento da pesquisa. Estudos prévios do grupo de pesquisa mostram que há variação da presença de alcaloides em extratos obtidos de diferentes indivíduos, sendo, portanto necessários outros estudos relacionando a sazonalidade química com a interação ambiental da espécie.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a sazonalidade química e a presença de metabólitos secundários em extratos de folhas de *Duroia macrophylla* Huber, durante um ano em dois espécimes, e obter calos *in vitro* da espécie para extrações dos metabólitos secundários e avaliação de suas atividades biológicas.

3.2. Objetivos Específicos

- Preparar extratos hexânicos e metanólicos de folhas de dois indivíduos de *D. macrophylla*, mensalmente, durante um ano;
- Identificar a presença de alcaloides e outros possíveis metabólitos nos extratos obtidos de *D. macrophylla*;
- Avaliar a relação entre a produção dos metabólitos nas plantas de *D. macrophylla* com a sazonalidade;
- Estabelecer o tipo de explante e o processo de desinfestação mais apropriado para o estabelecimento de cultura asséptica *in vitro* de *D. macrophylla*;
- Realizar a indução de calos em explantes de *D. macrophylla in vitro*.
- Realizar a extração química de calos de *D. macrophylla*.
- Identificar a presença de alcaloides e outros possíveis metabólitos nos extratos obtidos de calos de *D. macrophylla*;
- Avaliar a atividade antioxidante, antibacteriana e toxicidade dos extratos de calos de *D. macrophylla*;
- Avaliar a relação entre a produção de metabólitos nos calos com a produção de metabólitos nas plantas de *D. macrophylla*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ESTUDO DE SAZONALIDADE FITOQUÍMICA

4.1.1. Local de coleta e pesquisa

O material vegetal foi coletado na Reserva Florestal A. Ducke, localizada a 26 km NE de Manaus, na rodovia AM-010, Amazonas. Exsicatas dos materiais coletados foram depositadas no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, números de depósito 259228 (indivíduo A) e 261554 (indivíduo B) (figura 05), e autenticadas pela especialista em rubiáceas Dra. Charlotte M. Taylor, do Missouri Botanical Garden, St. Louis - USA.



Figura 05 – Exsicatas de *Duroia macrophylla* depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, números de depósito 259228 e 261554.

Os materiais vegetais de dois indivíduos de *Duroia macrophylla* (denominados A e B), localizados em parcelas diferentes da reserva (A em local próximo a trilha, em declive; B em local a cinco metros a trilha, em platô), foram obtidos em doze coletas, realizadas mensalmente entre abril de 2013 e março de 2014 (uma coleta mensal). O material de cada coleta recebeu uma numeração diferenciada e, conseqüentemente, resultou em extratos diferentes. Foram observadas durante as coletas as condições climáticas, presença de flores e frutos nos indivíduos e a presença de parasitas nas folhas dos mesmos. Todos os procedimentos laboratoriais e testes foram realizados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA.

4.1.2. Preparo dos Extratos

As folhas das plantas coletadas foram secas em estufas com temperatura média de 40 °C e posteriormente foram moídas em moinho de facas (marca Tecnal, Willye TE-650). As substâncias presentes nas folhas foram extraídas com hexano e metanol, onde foram realizadas de três a quatro extrações com cada solvente, utilizando um banho de ultrassom (marca Unique) por 20 minutos em cada extração. Após o banho de ultrassom, o material foi filtrado (figura 06). Os extratos foram concentrados em rotaevaporador (marca Fisatom) sob temperatura média de 40 °C.

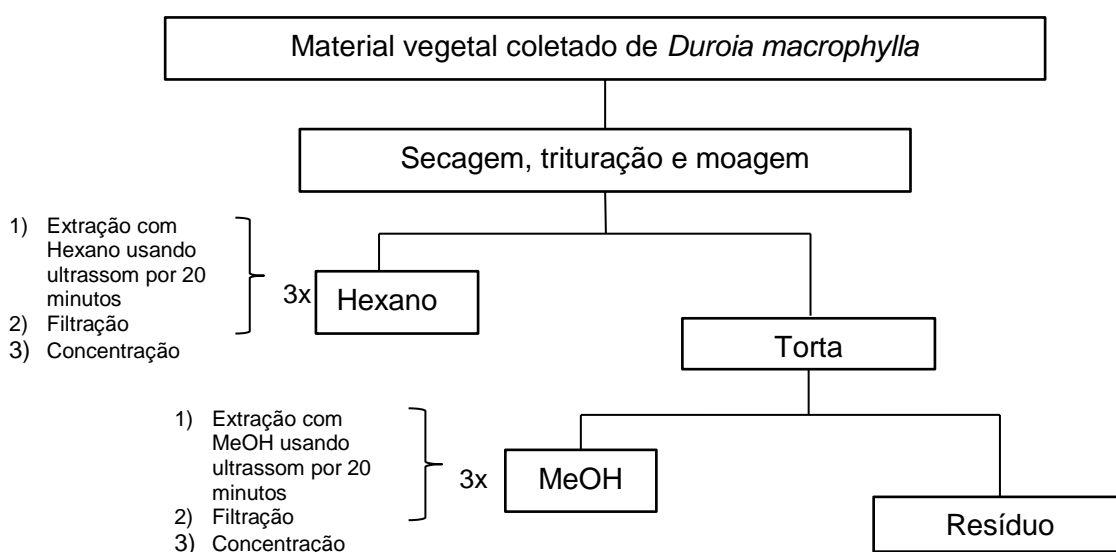


Figura 06 – Fluxograma da preparação dos extratos.

4.1.3. Análise Cromatográfica dos Extratos

As análises iniciais dos extratos foram realizadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), empregando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV 254 nm (marca Macherey – NAGEL – MN). A eluição das cromatofolhas foi realizada com vários solventes, em diferentes proporções. Para revelação empregou-se como revelador físico a luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm) e como reveladores químicos sulfato cérico e reagente de Dragendorff.

Para a padronização das amostras na análise de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa, foram pesados 10 mg de cada extrato, que foram diluídos em 1 mL de solvente (hexano ou metanol). Para a aplicação das amostras nas placas cromatográficas (10x20 cm), foi utilizado um pipetador automático, ajustado para alíquotas de 15 µL.

4.1.4. Identificação de metabólitos de interesse nos extratos

Todos os extratos foram submetidos à Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de 300 MHz (marca Bruker – modelo Fourier 300) de ¹H. As amostras levadas à RMN foram padronizadas, onde foram separados 40 mg de cada extrato, que foram diluídos em 600 µL de solvente deuterado (clorofórmio-d). Cada leitura foi realizada com 16 scans e multiplicação exponencial com LB (line broadening) de 0.3 Hz. Foram utilizados os softwares TOPSPIN – Bruker e ACD/NMR Processor Academic Edition – ACD/Labs para as leituras e processamento dos resultados. Cada análise processada em RMN foi convertida pelo método de transformada de Fourier e realizada a correção de fase (phase) em modo manual. Cada espectro foi analisado e comparado com as análises em RMN das substâncias já isoladas da espécie, visando detectar a presença dos mesmos em cada amostra.

Para projeção dos dados em Análise de Componentes Principais (PCA), foram selecionados os extratos de quatro meses distintos, que representam trimestres diferentes: maio/2013, agosto/2013, novembro/2013 e fevereiro/2014. Foram realizadas triplicatas amostrais em RMN para a análise de comparação e diminuição do erro instrumental e operacional. Estas amostras também foram padronizadas, onde foram separados 30 mg de cada extrato, que foram diluídos em 600 µL de solvente deuterado (clorofórmio-d) adicionado com TMS (0,05%) para

padrão. O ajuste da homogeneidade do campo magnético local (shimming) e da frequência (tuning) da RMN foi calibrado individualmente para cada amostra e repetição, através dos sinais do solvente e padrão. Cada leitura foi realizada com 16 scans e multiplicação exponencial com LB (line broadening) de 0.3 Hz. Foram utilizados os softwares TOPSPIN – Bruker e ACD/NMR Processor Academic Edition – ACD/Labs para as leituras e processamento dos resultados. Cada leitura processada em RMN foi convertida pelo método de transformada de Fourier e realizada a correção de fase (phase) em modo automático (auto simple). Para o processamento dos dados foi utilizado o método de “peakpicking” do software ACD/Labs para a tabelação dos sinais, onde foi utilizado fator de ruído (noise fator) 5 e limite de altura (height threshold) 5 para a determinação dos picos a serem analisados. Para a PCA foi utilizado o software Statística® (versão 10), onde os dados espectrais foram normalizados pelo centro da média e processados.

4.2. CULTURA DE TECIDOS *IN VITRO*

4.2.1. Local de coleta e pesquisa

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais, do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, do INPA. Os explantes utilizados foram obtidos de plantas matrizes de *Duroia macrophylla* em seu habitat natural, situadas na Reserva Florestal A. Ducke, sendo estas os mesmos indivíduos utilizados no estudo de sazonalidade fitoquímica.

4.2.2. Pré-desinfestação

O material vegetal para o processo de cultura de tecidos *in vitro* consistiu de segmentos foliares de folhas jovens e adultas de *Duroia macrophylla*, retiradas das áreas centrais das folhas apresentando nervuras central ou secundárias, com corte de aproximadamente 1 x 0,5 cm, retirados com o auxílio de tesoura e bisturi. Estes segmentos foliares foram denominados explantes.

Foram realizados diversos tipos de pré-desinfestação nos explantes, onde foram lavados com etanol 70%, água destilada e imersos em solução biocida contendo fungicida (2 g.L⁻¹ de Mancozeb®) e antibiótico (100 mg.L⁻¹ de estreptomicina) em diferentes tempos (tabela 02).

Tabela 02 – Tempos de imersão dos tratamentos de pré-desinfestação de explantes foliares de *Duroia macrophylla*.

Material Vegetal	Tratamento	Imersão em etanol 70%	Imersão em biocida*
Folhas jovens	TPDJ 01	1 min	4 h
Folhas jovens	TPDJ 02	1 min	5h
Folhas jovens	TPDJ 03	1 min	8 h
Folhas jovens	TPDJ 04	1 min	20 h
Folhas adultas	TPDA 01	1 min	6 h
Folhas adultas	TPDA 02	1 min	12 h
Folhas adultas	TPDA 03	1 min	18 h
Folhas adultas	TPDA 04	1 min	24 h

* Solução biocida com 2 g.L⁻¹ de Mancozeb® e 100 mg.L⁻¹ de estreptomicina.

4.2.3. Desinfestação

Após os tratamentos de pré-desinfestação, os explantes foram levados à câmara de fluxo laminar (marca Esco – modelo LAB2A2), onde foram submetidos a diversos tratamentos de desinfestação com a combinação entre os agentes desinfestantes etanol 70%, hipoclorito de sódio a 2% e hipoclorito de cálcio a 4% (tabela 03). Foram realizadas entre 15 e 20 repetições para cada tratamento, com um explante em cada tubo de ensaio (parcela). Entre cada imersão de diferentes agentes desinfestantes e ao final do processo de desinfestação os explantes foram submetidos a três lavagens com água destilada esterilizada e foram inoculados no meio de cultura Murashige & Skoog (MS) (1962) acrescentado de 30 g.L⁻¹ de sacarose e 7 g.L⁻¹ de ágar. As avaliações das culturas *in vitro* nos diferentes tratamentos foram realizadas considerando-se nos ensaios de desinfestação a porcentagem de explantes mortos, vivos e contaminados (fungos e bactérias), após um mês da inoculação.

Tabela 03 – Tratamentos de desinfestação de explantes foliares de *Duroia macrophylla* com diferentes combinações e tempos de imersão em agentes químicos desinfestantes, em câmara de fluxo laminar.

Material Vegetal	Tratamento	Tempo de imersão (min)		
		Etanol 70%	NaClO 2%	CaClO 4%
Folhas jovens	DMJ01	1	10	-
Folhas jovens	DMJ02	1	15	-
Folhas jovens	DMJ03	1	20	-
Folhas jovens	DMJ04	2	15	-
Folhas jovens	DMJ05	3	15	-
Folhas jovens	DMJ06	3	20	-
Folhas adultas	DMA01	1	5	-
Folhas adultas	DMA02	3	5	-
Folhas adultas	DMA03	3	10	-
Folhas adultas	DMA04	3	10	5
Folhas adultas	DMA05	3	10	10
Folhas adultas	DMA06	3	15	15
Folhas adultas	DMA07	5	10	10
Folhas adultas	DMA08	5	15	15
Folhas adultas	DMA09	4	20	15
Folhas adultas	DMA10	5	20	15
Folhas adultas	DMA11	3	30	-
Folhas adultas	DMA12	3	30	10
Folhas adultas	DMA13	5	30	-
Folhas adultas	DMA14	5	40	-

4.2.4. Indução de calo

Os explantes que permaneceram vivos e assépticos após os tratamentos de desinfestação, foram transferidos de meio de cultura, para o início do processo de indução de calo nos mesmos.

O meio de cultura utilizado para o processo de calogênese foi o MS adicionado com 30 g.L⁻¹ de sacarose, 7 g.L⁻¹ de ágar, 4 mg.L⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e 2 mg.L⁻¹ de cinetina (CIN).

As culturas foram incubadas em sala de crescimento à temperatura de 28 °C ± 2 °C, umidade relativa do ar de aproximadamente 60%, sob luz difusa (sombreamento) de intensidade de 50 µmol.m².s⁻¹ e 16 horas de fotoperíodo, durante 60 dias.

4.2.5. Avaliação e estatística

Para análise estatística foi utilizada uma análise de variância com teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

4.2.6. Extração química de calos

Os calos obtidos no processo de calogênese *in vitro* foram reunidos e liofilizados. Após a liofilização dos mesmos, foram realizadas extrações químicas, seguindo o mesmo protocolo a ser realizado com os materiais vegetais do item 4.1.2.

4.2.7. Testes para atividade antioxidante, antibacteriana e toxicidade dos calos

4.2.7.1. Teste antioxidante

Para avaliar a propriedade antioxidante dos extratos foram utilizados dois agentes oxidantes: o ferro (Fe^{3+}) e o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), utilizando como padrão de referência o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante, sendo feita a mensuração em espectrofotômetro (metodologia por NOVAES, 2007). A variação da absorbância dos extratos foi comparada com a curva de calibração do ácido ascórbico.

A solução de ácido ascórbico foi preparada com 44 mg do mesmo diluídos em 50 mL de água deionizada. A partir desta solução foram feitas diluições resultando nas seguintes concentrações: 0; 88; 176; 352; 526 e 704 $\mu\text{g/mL}$. Para o preparo da solução de DPPH foram solubilizados 28 mg do DPPH em 1 mL de DCM e posteriormente adicionado MeOH até atingir o volume de 100 mL. Para o preparo da solução de Fe^{3+} , 8,6344 g de sulfato férrico foram diluídos em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1% (v/v), onde posteriormente a solução foi transferida, quantitativamente, para um balão volumétrico com capacidade para 1 L. Após a dissolução, o volume restante foi preenchido com a solução de ácido clorídrico. Para a visualização da ação oxidante do ferro, foi utilizado 1,10-fenantrolina, sendo preparada uma solução com 0,25g de 1,10-fenantrolina diluídos em solução tampão de acetato de sódio (pH 4,5) com volume total de 100 mL.

Foram formuladas curvas-padrão, com o ácido ascórbico, para cada agente oxidante: para a curva com DPPH, foram adicionados em seis microtubos 990 μL de

DPPH e 10 µL de ácido ascórbico nas diferentes concentrações, sendo realizadas as leituras de absorvância após 30 minutos em espectrofotômetro no comprimento de 517 nm; para a curva com o ferro foram adicionados 10 µL do ácido ascórbico diluído em seis microtubos, em seguida 10 µL de Fe³⁺ e por fim, 980 µL de 1,10-fenantrolina, sendo realizadas leituras de absorvância após uma hora em espectrofotômetro no comprimento de 508 nm. Os dados foram registrados em uma planilha que permite a visualização da curva e de sua linearidade.

Para o preparo das amostras com os extratos dos calos, foram pesados 5 mg de cada extrato e solubilizados com o mesmo solvente utilizado para seu preparo. Em seguida cada amostra foi acondicionada em um balão volumétrico com volume final de 10 mL. Para o teste com DPPH foram transferidos 10 µL da amostra para um microtubo seguido pela adição de 990 µL da solução de DPPH, onde a mistura foi homogeneizada. Após 30 minutos, foi medida a absorvância em um espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 517 nm. Para o teste com ferro foram transferidos 10 µL da solução padrão de Fe³⁺ com concentração de 1000 µg.mL⁻¹ para um microtubo, seguido pela adição de 10 µL da amostra e 980 µL da solução de 1,10-fenantrolina 0,25% (m/v), onde a mistura foi homogeneizada. Após uma hora, foi medida a absorvância em um espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 508 nm.

Foi realizado um teste controle para cada tipo de agente oxidante, onde o controle foi preparado da mesma forma como as amostras, substituindo-se a amostra por água deionizada (NOVAES, 2007).

4.2.7.2. Teste antibacteriano

Foram realizados testes com os extratos de calos de *Duroia macrophylla* frente às bactérias: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Edwardsiella tarda* (ATCC 15947), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Providencia rettgeri* (ATCC 29944), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525) e *Nocardia brasiliensis* (ATCC 19296).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos foi realizada conforme metodologia descrita por Eloff (1998) e CLSI (2003).

Para a determinação da CIM os extratos foram primeiramente solubilizados em dimetilssulfóxido (DMSO) a 5%, e em seguida foram realizadas diluições sucessivas em poços (microplaca de 96 poços) para a obtenção das concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60 e 30 µg/mL. Foram adicionados 95 µL de cada concentração do extrato e 5 µL da bactéria testada (McFarland 0,5 contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$) diluída 10 vezes. Para o controle negativo foram utilizados 95 µL de DMSO no lugar do extrato. Para o controle positivo foi utilizado o antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. Em seguida a placa foi incubada a 30 ou 37 °C, dependente da bactéria testada. A CIM foi detectada com o auxílio do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2 mg/mL), sendo adicionada uma quantidade de 40 µL deste revelador em cada poço, onde microrganismos metabolicamente ativos coram-se de vermelho. A CIM foi definida como a menor concentração do extrato que não houve mudança de coloração.

4.2.7.3. Teste de toxicidade

Para a avaliação da toxicidade dos extratos dos calos de *Duroia macrophylla* foi realizado o teste frente à *Artemia salina*. Para a obtenção dos microcrustáceos, foi preparada uma solução salina na concentração de 38 g/L, sendo esta posteriormente filtrada e acondicionada em um béquer de 1 L, onde foram adicionados 10 mg de cistos de *A. salina*. O bécker foi coberto com filme PVC e deixado sob luz artificial (luminária) por 48 h sob uma temperatura ambiente de 27-30 °C.

Para o teste, foram preparadas soluções de cada amostra de extrato de calos em uma concentração de 10 mg/mL, utilizando como solvente DMSO. Foram acrescentados 1 mL de solução salina em cada poço (em placa de 24 poços), contendo em cada poço também dez indivíduos de *A. salina*. Em seguida, foi adicionada a amostra solubilizada juntamente com a solução salina (sem indivíduos), como esquematizado na figura 07, completando o volume do poço para 2 mL. O teste foi realizado em triplicata e o controle negativo foi feito utilizando a solução salina e o solvente no lugar da amostra.

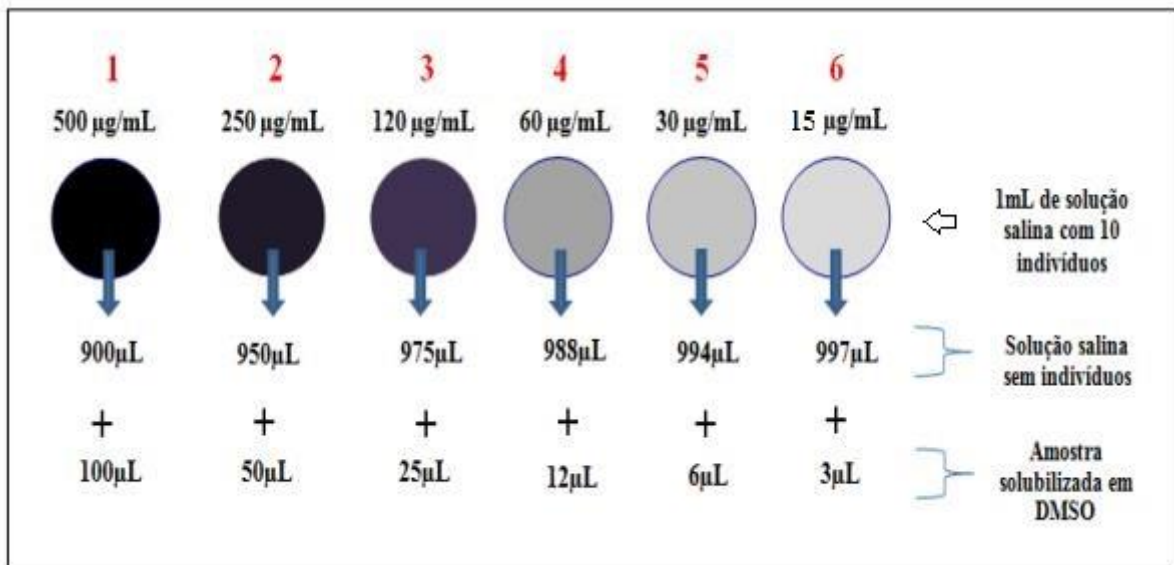


Figura 07 – Sequência de procedimentos para teste de toxicidade frente à *Artemia salina*.

As placas foram deixadas em temperatura ambiente de 27-30 °C sob luz artificial durante 24 horas. Posteriormente foi feita a leitura dos resultados a partir da observação das larvas, sendo consideradas mortas todas as que não apresentaram qualquer movimento ou debilidade na motilidade durante 10 minutos. A determinação da toxicidade foi realizada através do percentual (%) de mortalidade das larvas (MEYER et al. 1982; CECHINEL et al. 2003), considerando-se alta toxicidade as amostras de que apresentaram 60% de mortalidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDO DE SAZONALIDADE FITOQUÍMICA

5.1.1. Preparo dos extratos

Foram realizadas doze coletas de folhas de dois indivíduos (denominados A e B) da espécie *Duroia macrophylla*, de abril de 2013 a março de 2014. Esses materiais vegetais originaram 48 extratos (tabelas 05 e 06). Em algumas amostras foram realizadas duas repetições de extração com cada solvente a mais para maior rendimento do extrato, pelo fato do material vegetal coletado ser inferior à dos outros meses.

Tabela 04 – Extratos de *Duroia macrophylla* preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia/ COTI-INPA do indivíduo A.

Material Vegetal	Material	Hexânico		Metanólico	
	inicial (g)	M (g)	R (%)	M (g)	R (%)
Coleta 04/2013	140,0	0,503	0,359	2,733	1,952
Coleta 05/2013	198,5	0,541	0,273	6,544	3,297
Coleta 06/2013	95,4	1,729*	1,812	7,904*	8,285
Coleta 07/2013	192,8	1,198	0,621	7,277	3,774
Coleta 08/2013	132,5	2,532	1,913	9,505	7,174
Coleta 09/2013	132,8	1,362	1,026	6,081	4,579
Coleta 10/2013	119,3	0,810	0,679	5,982	5,014
Coleta 11/2013	179,8	3,402	1,892	8,650	4,811
Coleta 12/2013	178,8	2,401	1,343	12,852	7,188
Coleta 01/2014	205,4	1,638	0,797	15,013	7,309
Coleta 02/2014	197,5	2,550	1,291	14,728	7,457
Coleta 03/2014	104,1	1,669	1,603	5,911	5,678

M – Massa ; R – Rendimento

* Realizada repetições de extração em ultrassom a mais.

Tabela 05 – Extratos de *Duroia macrophylla* preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia/ COTI-INPA do indivíduo B.

Material Vegetal	Material	Hexânico		Metanólico	
	inicial (g)	M (g)	R (%)	M (g)	R (%)
Coleta 04/2013	181,4	0,673	0,371	2,942	1,622
Coleta 05/2013	142,7	1,010	0,708	6,693	4,690
Coleta 06/2013	67,8	0,735*	1,084	6,401*	9,441
Coleta 07/2013	197,6	0,544	0,275	5,371	2,718
Coleta 08/2013	89,8	1,105*	1,321	8,137*	9,066
Coleta 09/2013	102,2	0,936	0,916	6,601	6,459
Coleta 10/2013	75,7	1,108*	1,464	0,372**	0,491
Coleta 11/2013	110,2	1,051	0,954	8,571	7,778
Coleta 12/2013	72,7	0,761	1,047	6,790*	9,340
Coleta 01/2014	105,1	0,688	0,655	7,407	7,048
Coleta 02/2014	60,7	0,695	1,145	5,346*	8,807
Coleta 03/2014	57,7	0,829*	1,437	4,993*	8,653

M – Massa ; R – Rendimento

* Realizada repetições de extração em ultrassom a mais.

** Parte da amostra fungou durante secagem do solvente, foi realizada uma filtragem do extrato.

5.1.2. Análises em Cromatografia de Camada Delgada Comparativa

Os extratos foram analisados em CCDC utilizando diferentes sistemas de eluição, para a escolha do melhor sistema, de acordo com a polaridade da amostra.

Para os extratos hexânicos, o sistema Hexano / Acetato de Etila na proporção 8:2 demonstrou a melhor eluição para análise com os reveladores químicos e físicos (figuras 08 a 12).

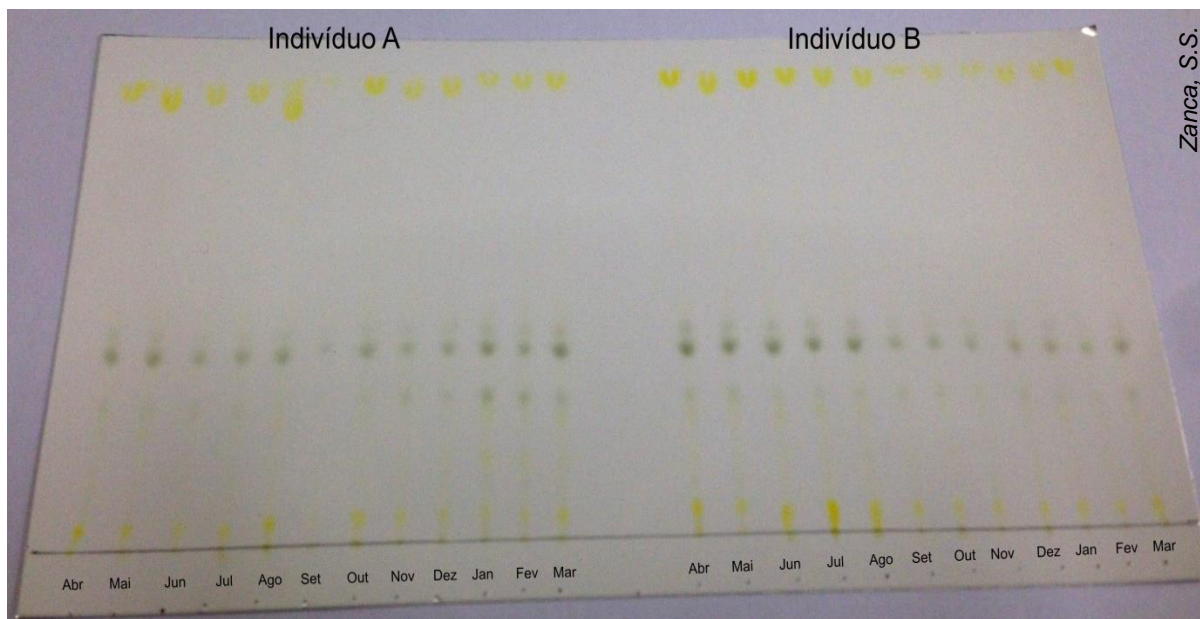


Figura 08 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, sob luz visível, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.



Figura 09 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação sob luz ultravioleta em 254 nm, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.

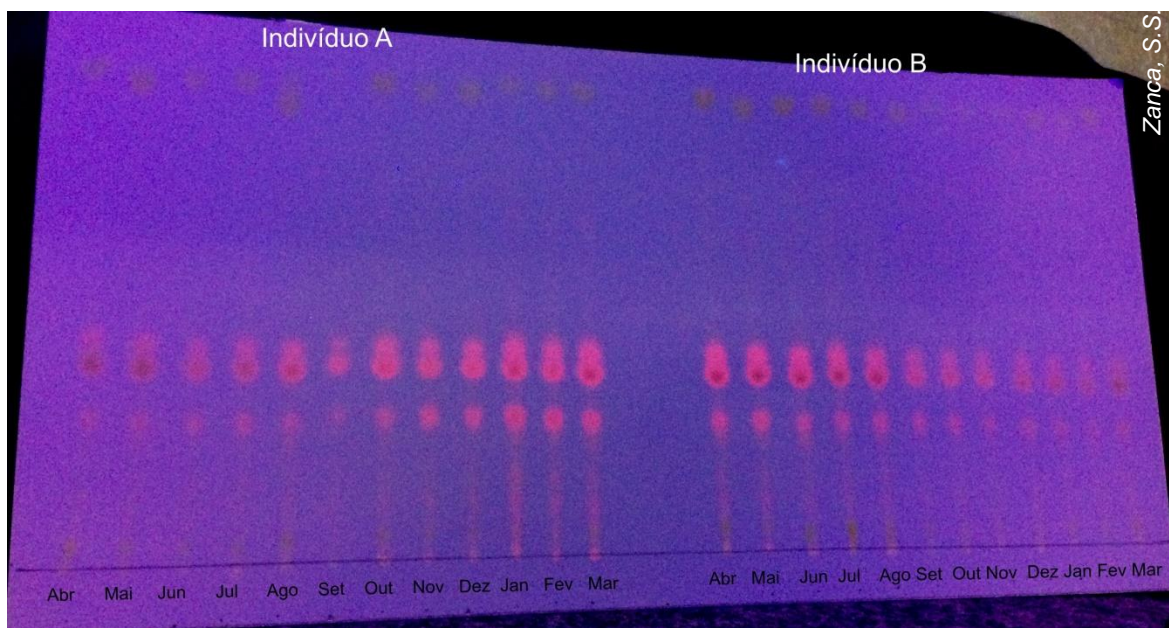


Figura 10 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação sob luz ultravioleta em 365 nm, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.

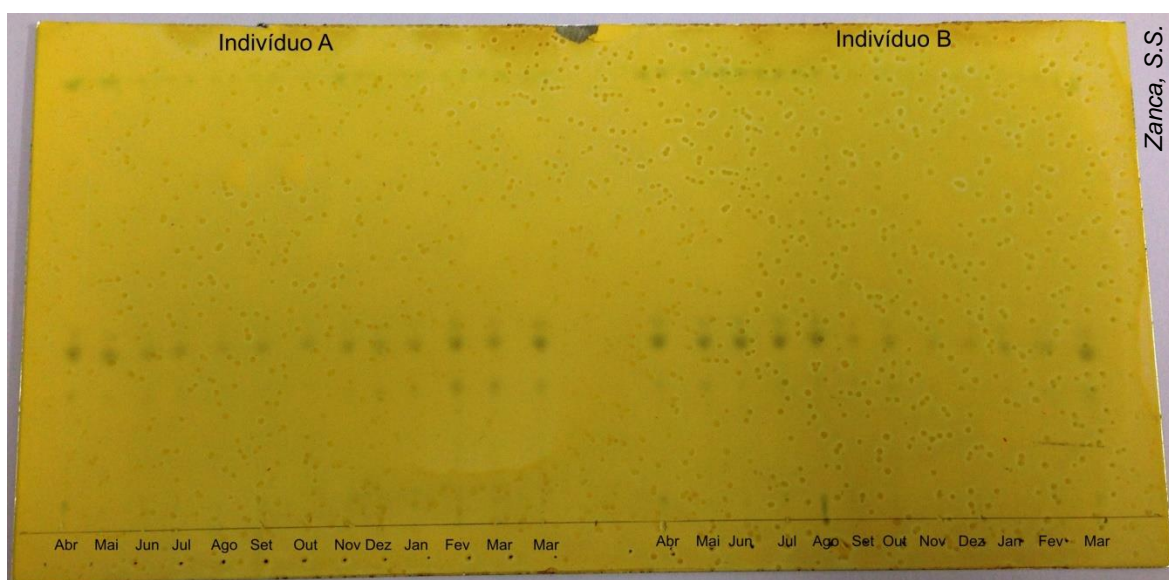


Figura 11 - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em reagente de Dragendorff, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.



Figura 12 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação com sulfato cérico, sistema de eluição Hexano/Acetato de Etila 8:2.

Quando utilizada a luz UV 365 nm como revelador (figura 10), ambos os indivíduos, em todos os meses, apresentaram manchas alaranjadas com fator de retenção (R_f) entre 0,4 e 0,5, indicando a presença de clorofilas (comuns nos extratos de folhas).

Quando utilizado o reagente de Dragendorff (figura 11), um dos reveladores para moléculas nitrogenadas como os alcaloides, nenhum dos indivíduos estudados ao longo de 12 meses apresentou manchas alaranjadas, ou seja, não houve indícios da presença de alcaloides nos extratos hexânicos.

Quando revelados com sulfato cérico (figura 12), a maioria dos extratos hexânicos apresentou indícios da presença de terpenoides, revelando uma coloração roxa em R_f de aproximadamente 0,9.

Para os extratos metanólicos os sistemas de eluição DCM puro e DCM / MeOH 9:1 demonstraram boa separação das substâncias para a análise com os reveladores químicos e físicos (figuras 13 a 17).

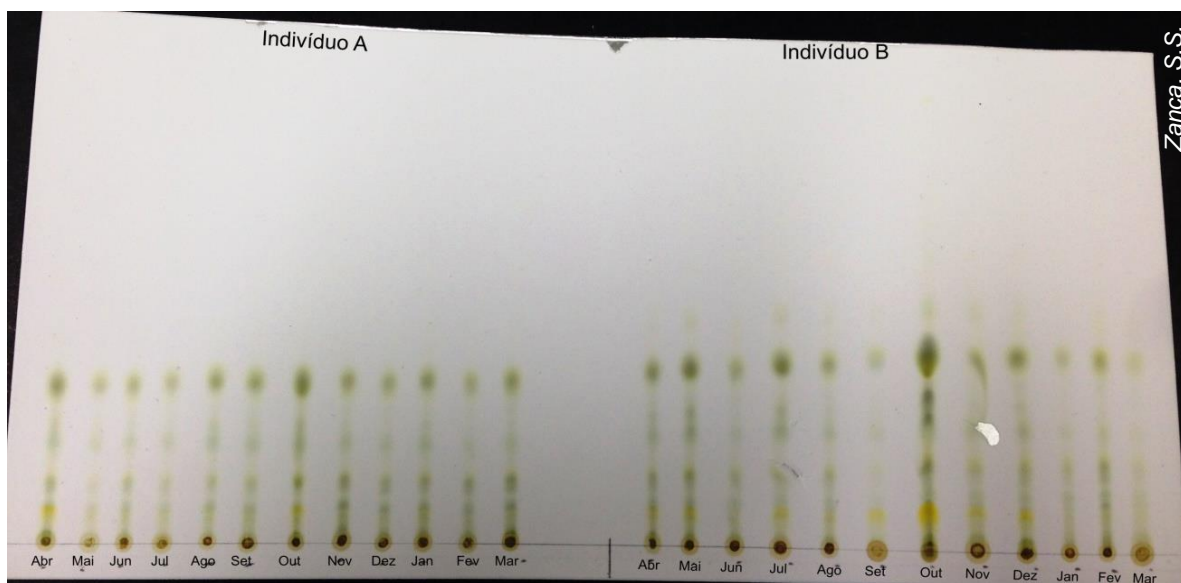


Figura 13 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, sob luz visível, sistema de eluição DCM puro.

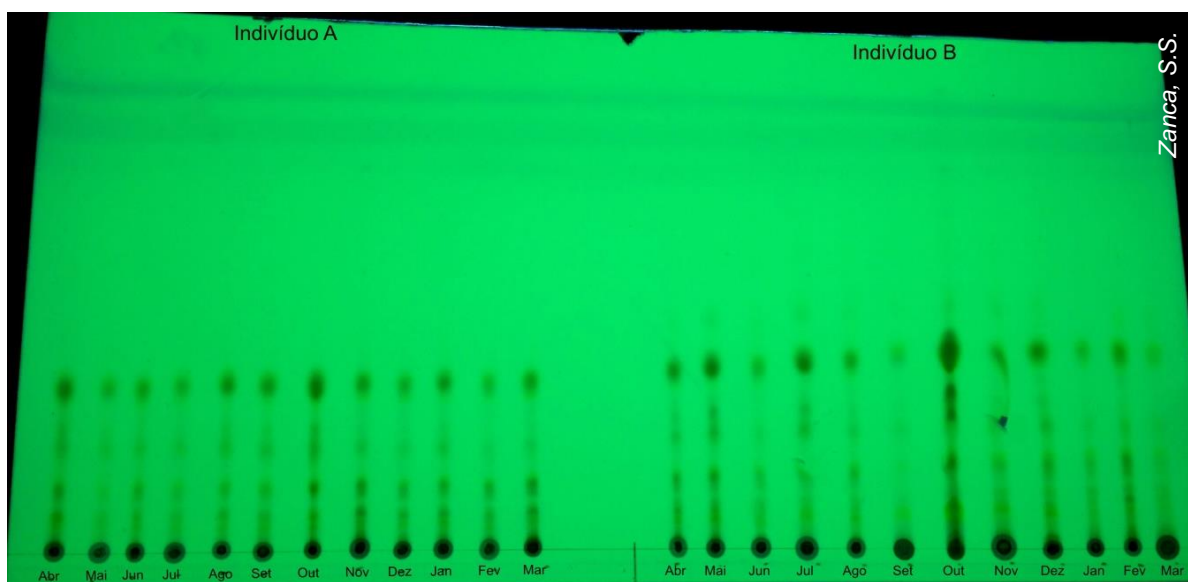


Figura 14 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação sob luz ultravioleta em 254 nm, sistema de eluição DCM puro.



Figura 15 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação sob luz ultravioleta em 365 nm, sistema de eluição DCM puro.

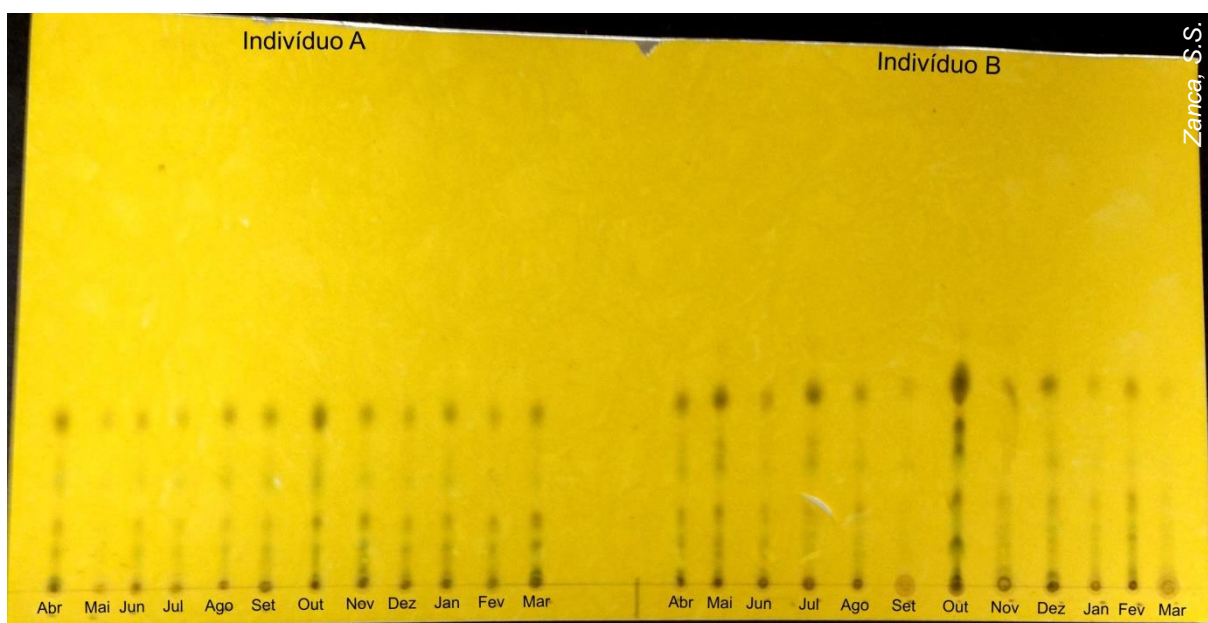


Figura 16 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação em reagente de Dragendorff, sistema de eluição DCM puro.

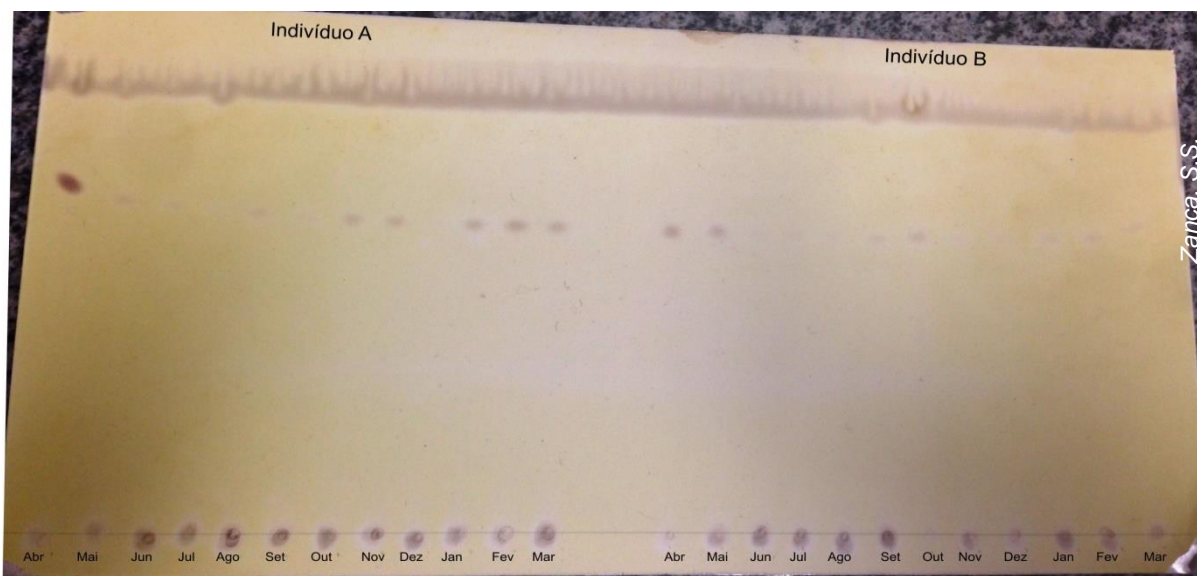


Figura 17 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos metanólicos de folhas de dois indivíduos de *Duroia macrophylla*, coletados de abril/2013 a março/2014, com revelação com sulfato cérico, sistema de eluição DCM/MeOH 9:1.

Nos extratos metanólicos, ambos os indivíduos, quando revelados com luz UV 365 nm (figura 15), apresentaram, ao longo do período de estudo, manchas azuis na origem (ponto de aplicação da amostra), um indicativo da presença de substâncias cromóforas como as cumarinas ou furanocumarinas.

Assim como nos extratos hexânicos, os extratos metanólicos dos dois indivíduos não apresentaram o indicativo de alcaloides quando revelados em reagente de Dragendorff (figura 16).

Quando utilizado sulfato cérico como revelador (figura 17), os extratos metanólicos de ambos os indivíduos apresentaram manchas de coloração roxa, indícios da presença de terpenos com Rfs distintos (uma parte na origem, e outra com Rf em torno de 0,8).

Não houve diferença significativa entre os dois indivíduos na separação de substâncias na CCDC. Porém, em relação à composição química dos extratos, houve uma diferença entre os hexânicos e metanólicos, como esperado, mas não houve grande variação na composição química dos dois indivíduos ao longo do período de estudo.

Nos extratos hexânicos e metanólicos das duas plantas não foi possível evidenciar a presença de alcaloides, uma vez que a cor laranja é a característica

deste grupo químico em contato com o reagente de Dragendorff, que não foi revelada em nenhum dos extratos (figuras 11 e 16). Normalmente os alcaloides se apresentam fluorescentes em cores azul ou amarela nos reveladores físicos de luz ultravioleta a 254 nm e/ou 365 nm (WAGNER et al., 1984), mas, apesar de nas cromatografias dos extratos de *Duroia macrophylla* haverem fluorescências (figuras 09, 10, 14 e 15), não é possível afirmar que as substâncias em questão sejam realmente alcaloides, uma vez que outros grupos químicos também apresentam fluorescência nesses reveladores.

Martins e colaboradores (2013) também não evidenciaram a presença de alcaloides em folhas da espécie *Duroia macrophylla* em testes de CCDC, apenas encontrando alcaloides em galhos.

A presença de terpenos nos extratos desta espécie já foi descrita anteriormente (MARTINS et al., 2013 e MARTINS et al., 2014), tanto nas folhas como também nos galhos. A presença de terpenos em extratos de plantas da família Rubiaceae é bastante comum, podendo ser encontrados em tipos de extratos diferentes (partes da planta ou tipos de solventes de extração), principalmente em plantas com uso medicinal tradicional (SEN et al., 2012; HARIDASS et al., 2012; MORENO et al., 2014; MAHANTHESH et al., 2014; entre outros).

Batista e colaboradores (2014) isolaram o triterpeno ácido ursólico de raízes da espécie *Sabicea brasiliensis* (Rubiaceae), o mesmo isolado por Martins e colaboradores (2013) a partir de folhas de *Duroia macrophylla*. As duas espécies pertencem à mesma sub-família Ixoroideae, indicando que a presença de terpenos em espécies da família Rubiaceae é bastante comum, assim como a parte da planta onde se encontram também é bastante variável, sendo encontrados terpenos em folhas, galhos e raízes das plantas.

5.1.3. Análises em Ressonância Magnética Nuclear

Apesar da presença de alcaloides não ter sido evidenciada nos testes de CCDC, as análises realizadas por RMN com todos os extratos de *Duroia macrophylla*, tanto hexânicos quanto metanólicos, evidenciaram a presença de alcaloides, uma vez que todos os espectros apresentaram sinais na região de deslocamento entre 9 e 10 ppm (Figuras 18 a 25), região onde os hidrogênios ligados a nitrogênios se apresentam, principalmente em alcaloides indólicos, já

encontrados em extratos de galhos da espécie em outros estudos do grupo de pesquisa (MARTINS, 2014).

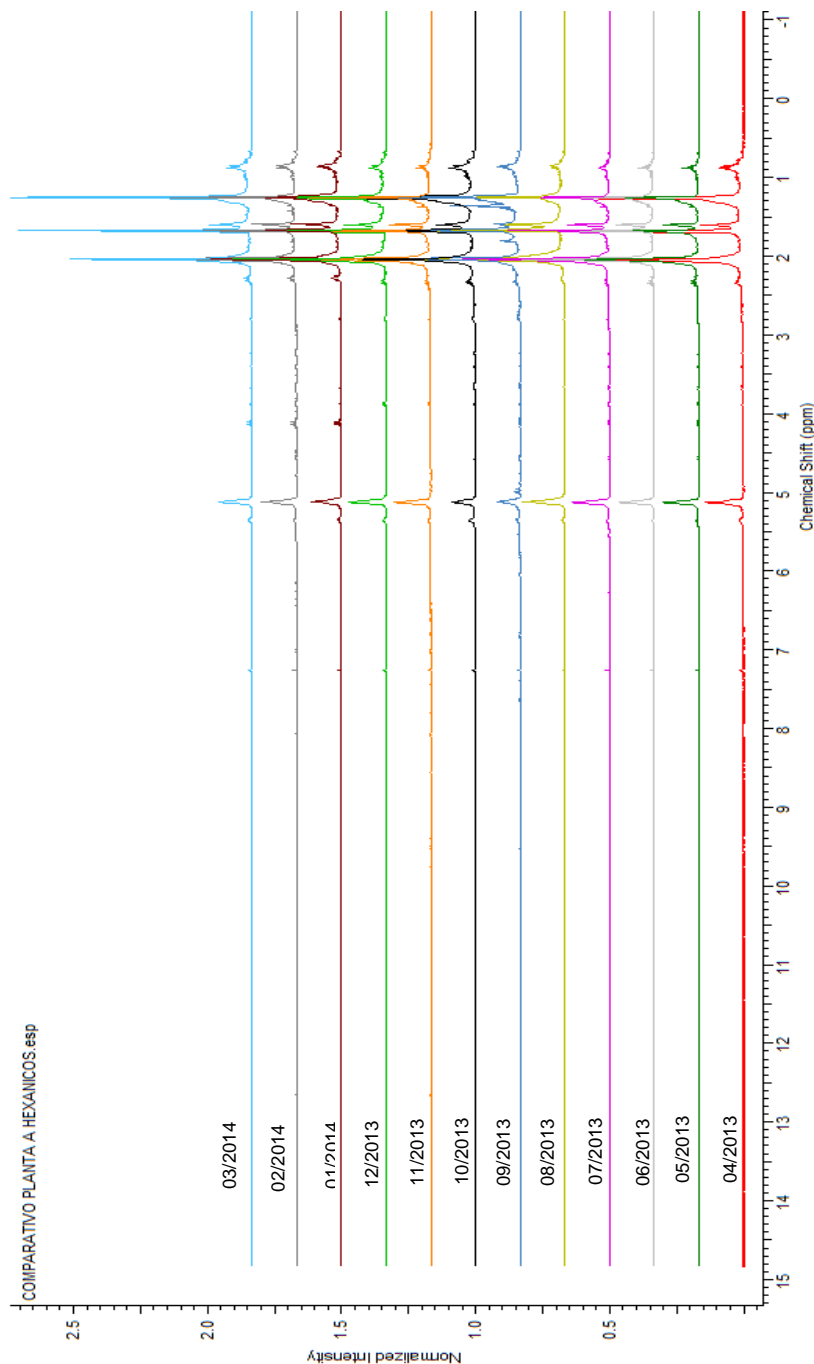


Figura 18 – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos hexânicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo A (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

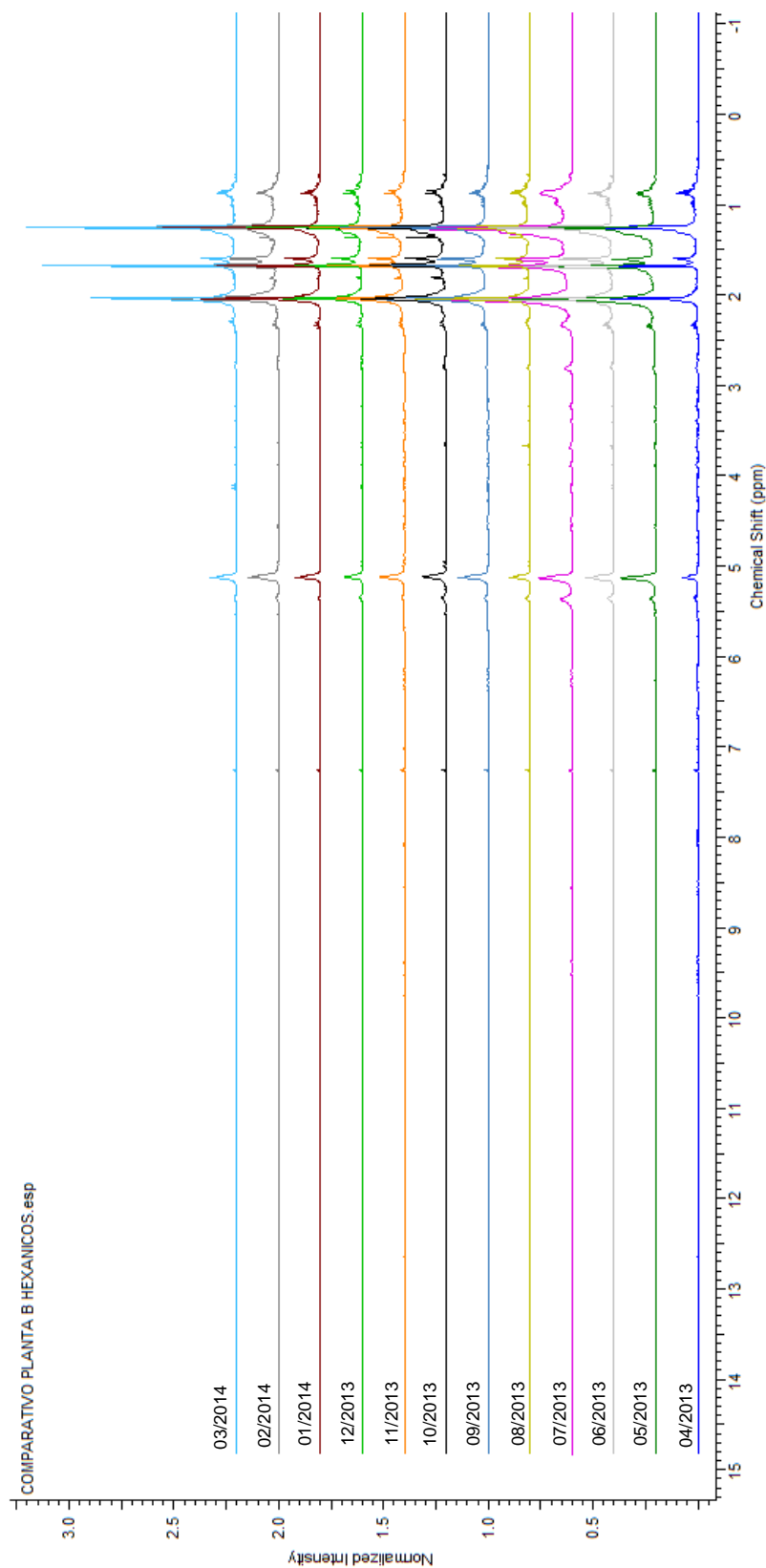


Figura 19 – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos hexânicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo B (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

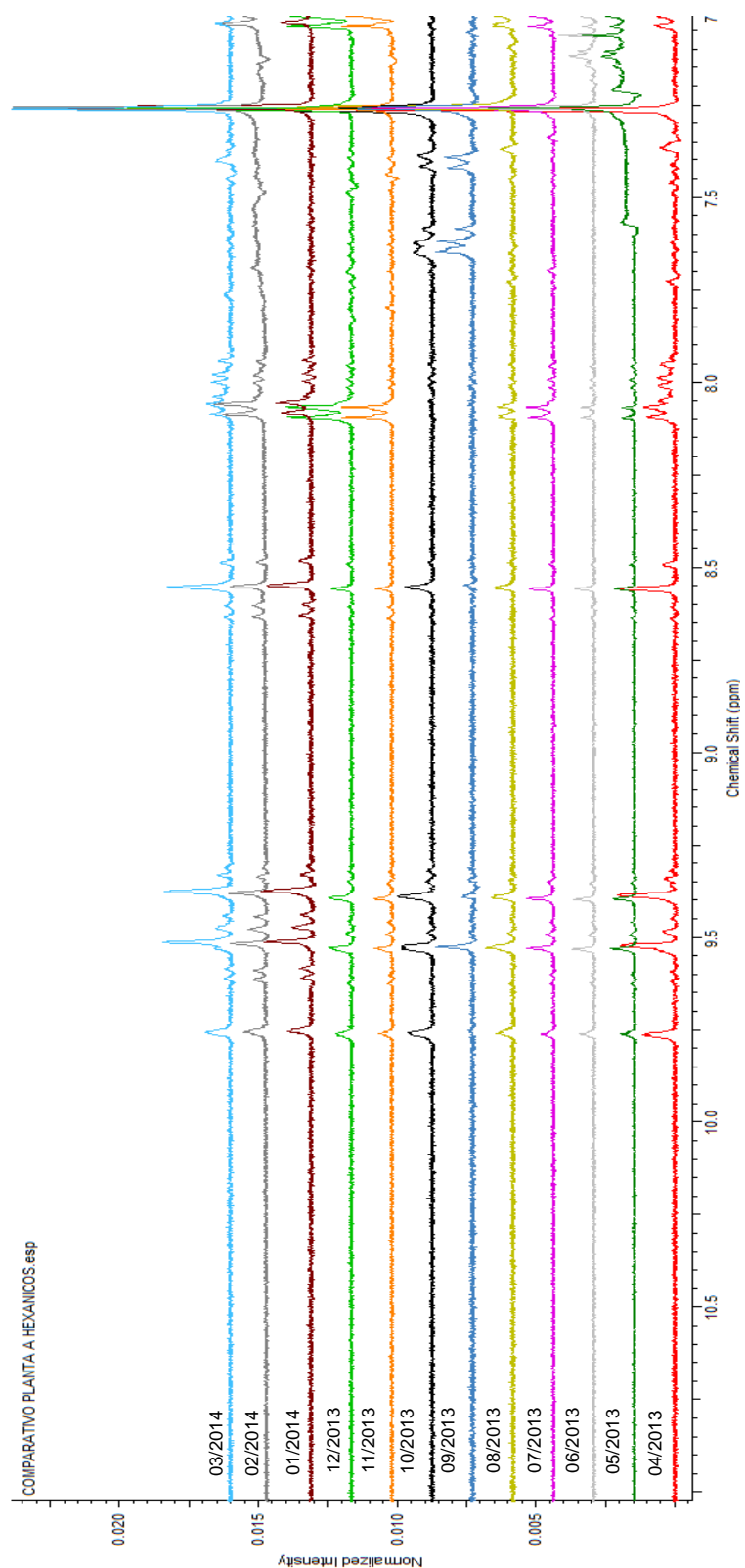


Figura 20 – Expansão da região entre 7 e 11 ppm do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos hexânicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo A (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

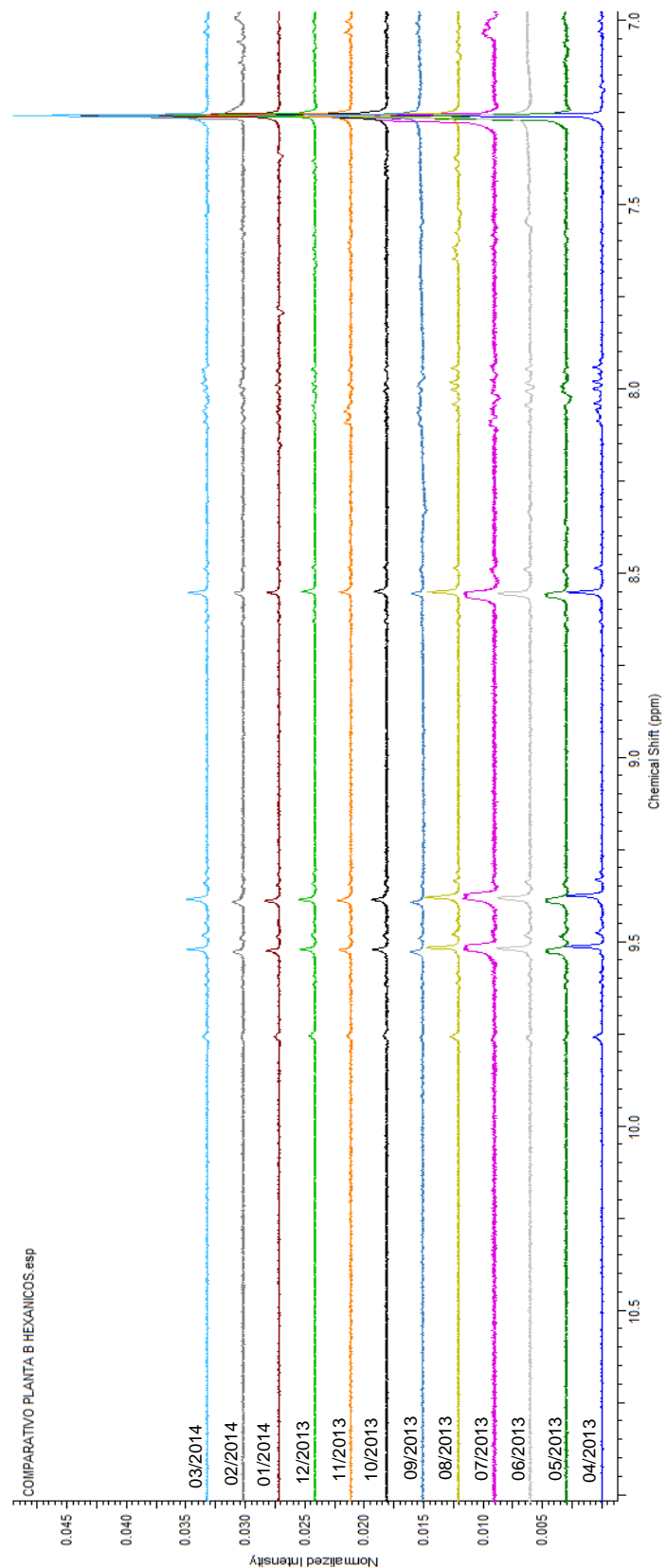


Figura 21 – Expansão da região entre 7 e 11 ppm do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H de doze extratos hexânicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo B (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl₃, 300 MHz).

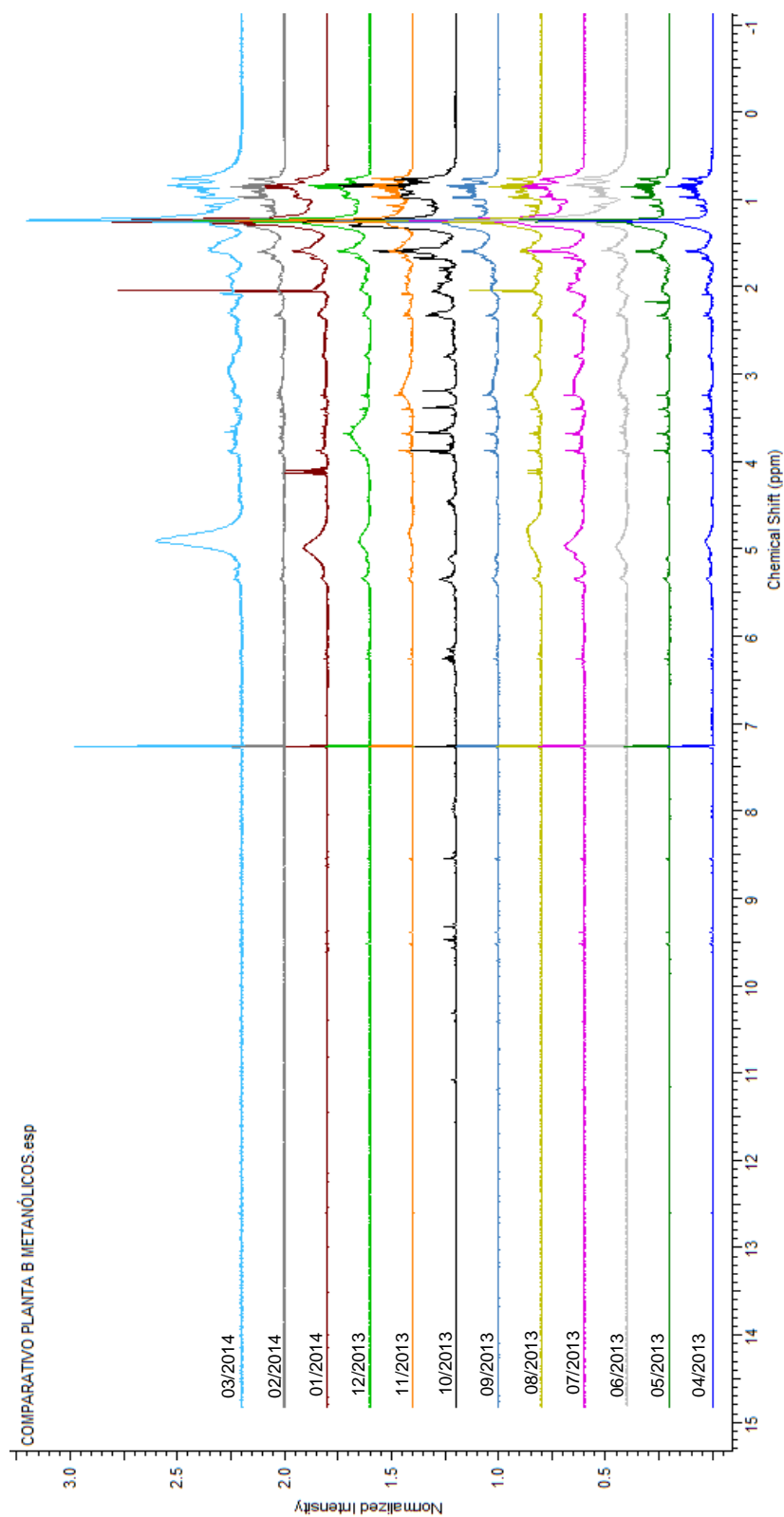


Figura 22 – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo A (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

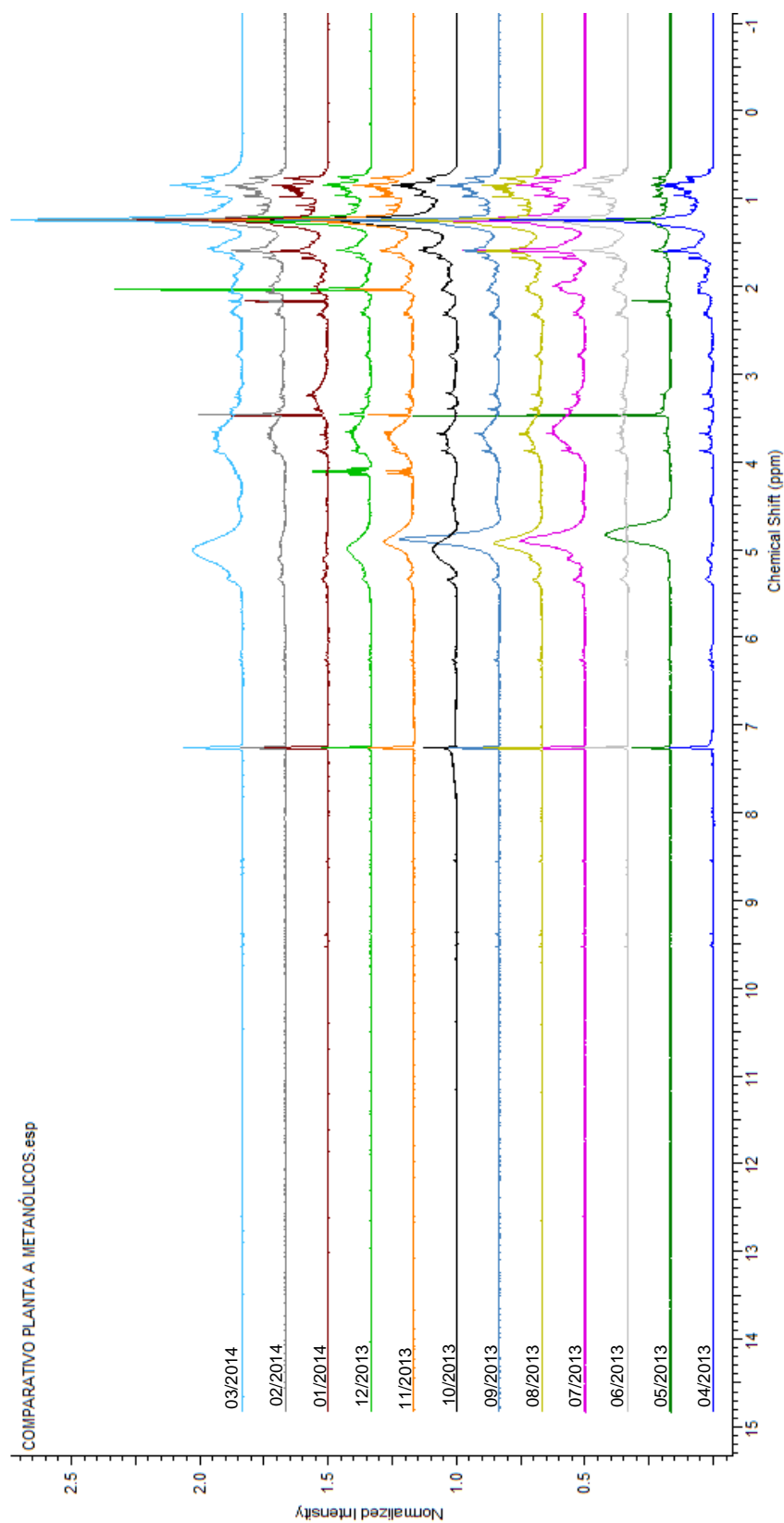


Figura 23 – Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo B (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

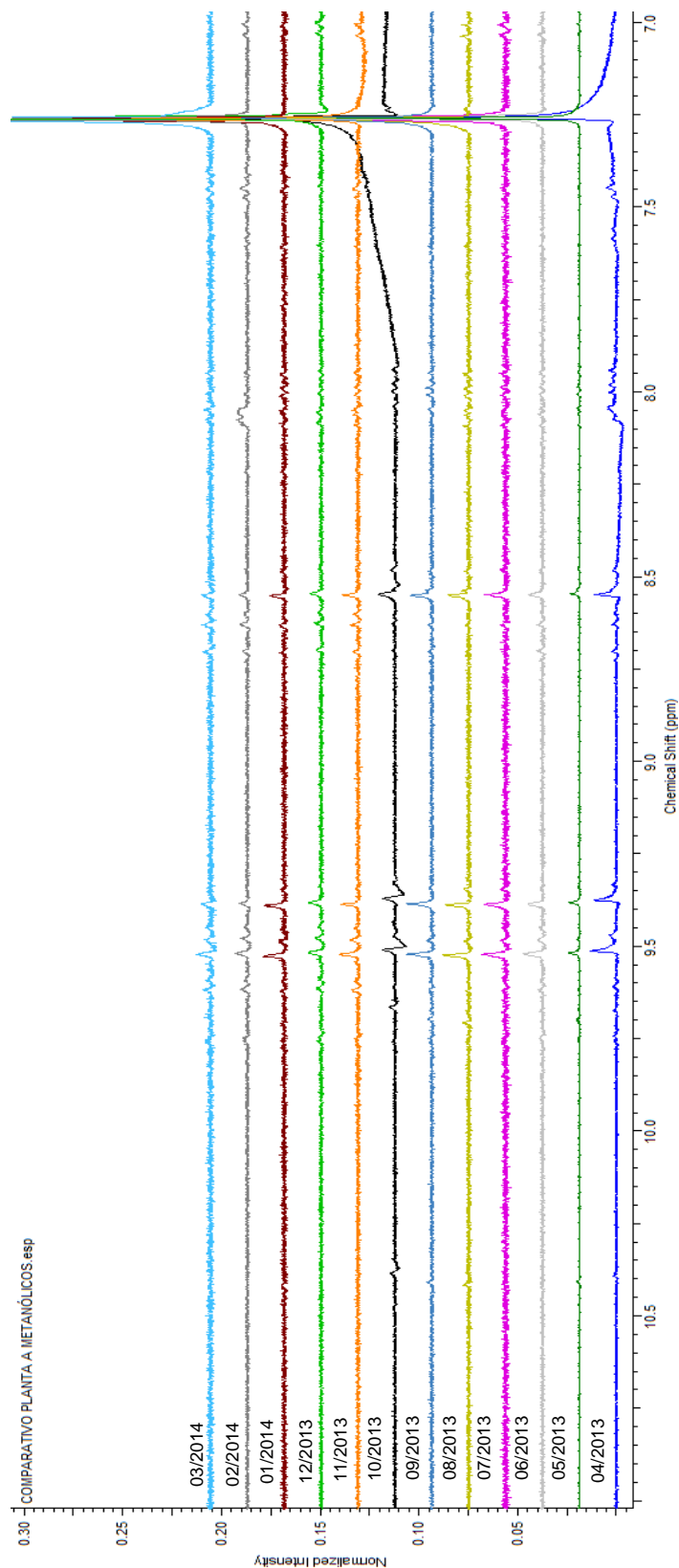


Figura 24 – Expansão da região entre 7 e 11 ppm do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo A (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

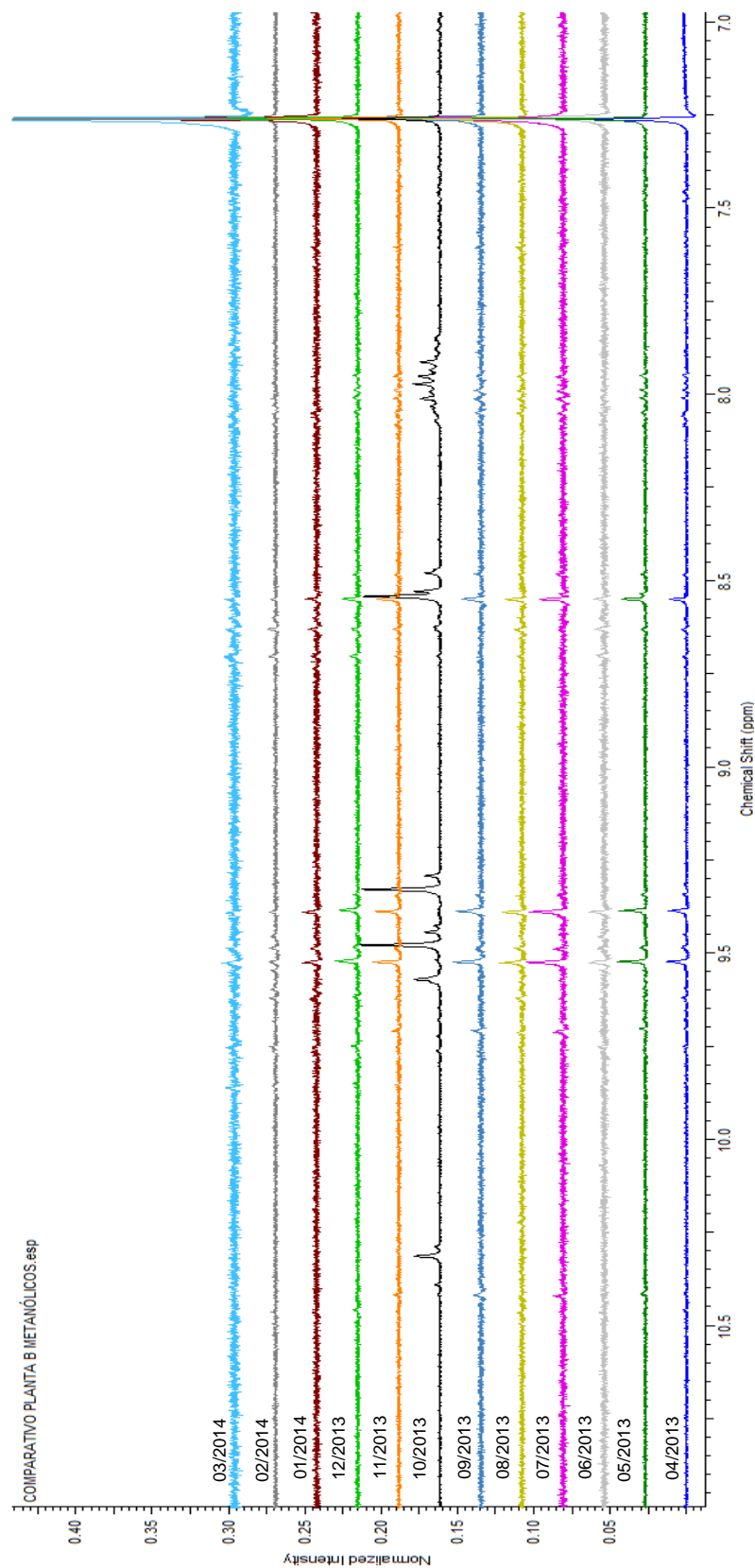


Figura 25 – Expansão da região entre 7 e 11 ppm do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H de doze extratos metanólicos da espécie *Duroia macrophylla*, indivíduo B (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

Um dos fatores que pode ter ocasionado o falso negativo para detecção de alcaloides nas placas de CCDC e positiva na RMN foi a quantidade dos metabólitos presentes nas amostras analisadas. A RMN é uma técnica bastante sensível em relação à detecção de substâncias presentes em amostras, mesmo em quantidades consideravelmente pequenas.

Martins (2014) evidenciou a presença de alcaloides somente em galhos de *Duroia macrophylla*, tanto nas placas de CCDC como nas análises de RMN realizadas. Não foi evidenciada a presença de alcaloides nos extratos das folhas por nenhum dos dois métodos. Uma das explicações para que os alcaloides não tenham sido evidenciados em RMN no estudo destes pesquisadores, e sim neste trabalho, foi o tipo de equipamento de RMN aos quais os testes foram realizados: Martins utilizou um equipamento de RMN com frequência de 60 MHz, e neste trabalho foi utilizado um equipamento de RMN com frequência de 300 MHz. Os alcaloides encontrados nas folhas desta planta são bastante minoritários em relação às outras substâncias presentes nos extratos, fazendo com que seja necessário um equipamento de maior frequência para que seja possível detectar a presença dessas substâncias em baixa concentração nas amostras.

Foi evidenciada, a partir dos espectros de RMN, a possível presença de terpenos em todas as amostras analisadas (figuras 18, 19, 22 e 23), tanto hexânicas como metanólicas, onde foram observados diversos sinais na região espectral entre δ 0,7 e 1,2, que indicam hidrogênios metílicos característicos de triterpenos. Martins e colaboradores (2013) também identificaram a presença de triterpenos em extratos de folhas de *Duroia macrophylla*, onde foram isolados de extratos diclorometânicos de folhas os triterpenos, ácido oleanólico e ácido ursólico, que demonstraram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose.

A amostra metanólica do mês 10/2014, do indivíduo B, apresentou visualmente sinais com maior intensidade e deslocamentos químicos diferentes das demais amostras. Porém, esta amostra foi a única ao qual foi contaminada por fungos durante o processo de secagem do solvente, tendo que passar por um processo de filtragem para a recuperação do extrato.

Com exceção do mês 10/2014 do indivíduo B, todos os extratos apresentaram características bastante similares, principalmente na região de deslocamento entre 9,0 e 10,5 ppm, indicando a possível presença de alcaloides. No entanto, as

amostras metanólicas do indivíduo B, provenientes das coletas dos meses de fevereiro e março de 2014 (as duas últimas coletas), apresentaram sinais menores que os demais entre δ 9,0 e 10,5. Como o outro indivíduo não apresentou o mesmo perfil, o fator que ocasionou a diminuição da produção relativa da substância pode ser considerado de origem predatória ou do habitat local, não sendo relacionado à sazonalidade e/ou clima.

Nas amostras hexânicas de ambos os indivíduos (figuras 18 e 19) foi observada a presença de sinais em torno das faixas de δ 5,13; 5,3-5,4 e 5,53, indicando a presença de duplas ligações dentre as substâncias presentes, como de esteroides e triterpenos. Também foi observado um sinal de duplo dubleto em δ 4,14 em todas as amostras, com exceção dos meses maio e setembro (2013) do indivíduo B. Em todas as amostras foi observado um singlete em δ 8,56, e apenas nas amostras do indivíduo A foi observado com clareza um dubleto em δ 8,08 (exceção de setembro e outubro de 2013). Estes sinais entre os deslocamentos 6,5 e 9 ppm indicam a presença de grupos aromáticos e heteroaromáticos, que condizem com os alcaloides aromáticos previamente isolados desta espécie (MARTINS, 2014; NUNEZ et al., 2012). Foram observados três singletos nos deslocamentos de δ 8,55, 8,60 e 8,70, indicando a possível presença de grupos aromáticos e heteroaromáticos.

Em uma análise de comparação entre os extratos de cada mês, para cada indivíduo, é possível afirmar que, no caso dos extratos hexânicos, não houve grande variação na produção de metabólitos durante os meses dentro de um ano, onde os espectros de cada mês são bastantes similares uns aos outros. Já os extratos metanólicos apresentam maiores variações nos sinais dos espectros, comparando-se mês a mês.

A partir das análises de projeção dos componentes principais (PCA) foi possível observar a variação entre os perfis químicos dos extratos dos dois indivíduos em diferentes épocas do ano. Para as amostras hexânicas, a análise da PCA1 com a PCA2 explicaram a maior parte dos dados (68,6%), onde estes dois componentes consistem de uma maior quantidade de variação de dados (figura 26). Para as amostras metanólicas, a PCA1 e PCA2 apresentaram a maior porcentagem de influência nos dados (39,7%), mas não apresentaram variações nas áreas de interesse, provavelmente pela influência da variação nos deslocamentos dos sinais

de uma amostra para outra; já a análise da PCA2 com a PCA3 (23,6%) demonstraram padrões melhores relacionados aos sinais de interesse, apesar de menor porcentagem de influência (figura 27).

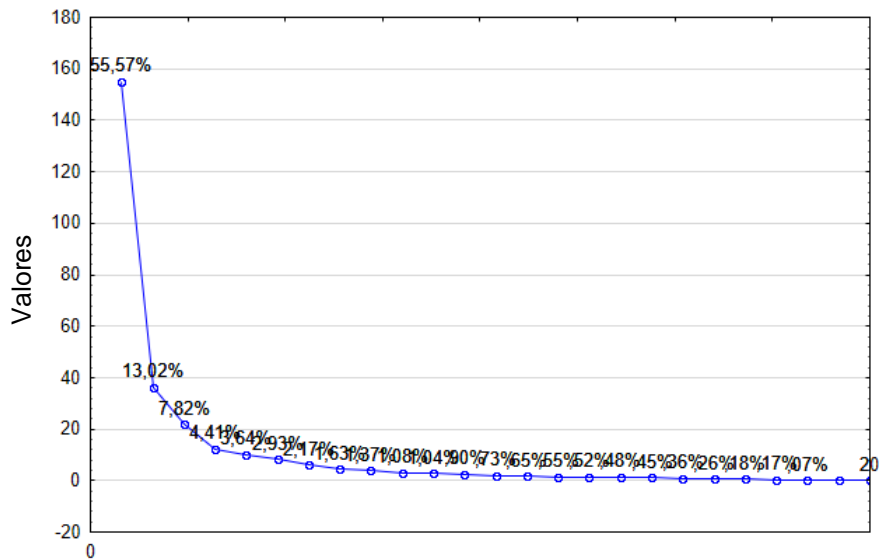


Figura 26 – Valores da matriz de correlação da análise de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de *Duroia macrophylla*.

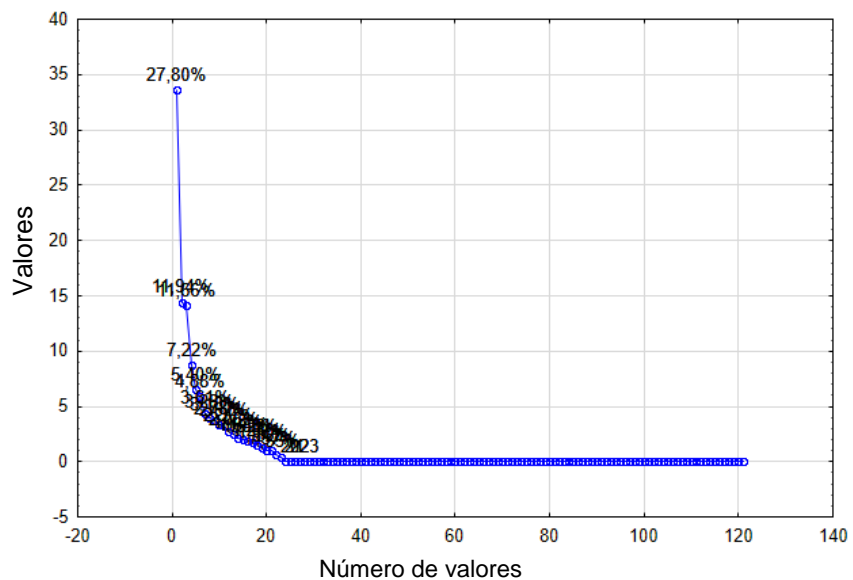


Figura 27 – Valores da matriz de correlação da análise de componentes principais dos espectros de ressonância magnética nuclear de extratos metanólicos de *Duroia macrophylla*.

Na PCA dos extratos hexânicos, foi possível observar uma separação entre os dois indivíduos, onde três das quatro amostras do indivíduo B se apresentaram em quadrantes diferentes das amostras do indivíduo A (figura 28). O fator indicativo da diferença entre as amostras dos dois indivíduos parece estar associado à intensidade dos sinais presentes nos deslocamentos entre 0,68 e 1,17 ppm, conforme é possível visualizar através do loading (figura 29), que apresenta a maioria dos sinais desta área no primeiro quadrante direito (figura 30). Desta forma, é possível afirmar que o indivíduo B apresenta maior quantidade de triterpenos que o indivíduo A, pois a área entre 0,7 e 1,2 ppm é onde se encontram os sinais de metilas de triterpenos. Também foi observado que as amostras dos extratos 5BH se destacaram, uma vez que, dentre as demais amostras analisadas, estas apresentaram a maior intensidade de sinais para metilas de triterpenos (tabela de sinais – intensidade x deslocamento – em anexo).

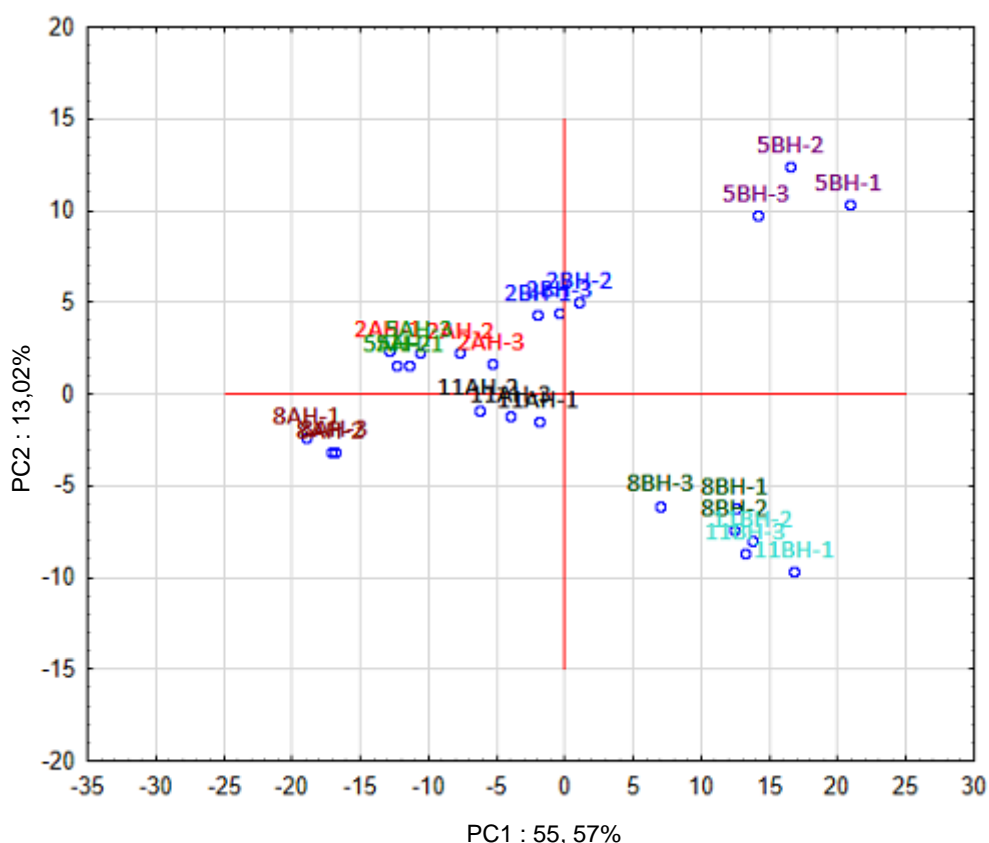


Figura 28 – Análise de componentes principais das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de dois indivíduos de *Duroia macrophylla* (A e B) ao decorrer de um ano, onde 2, 5, 8 e 11 representam coletas dos meses de maio, agosto, novembro (2013) e fevereiro (2014), respectivamente.

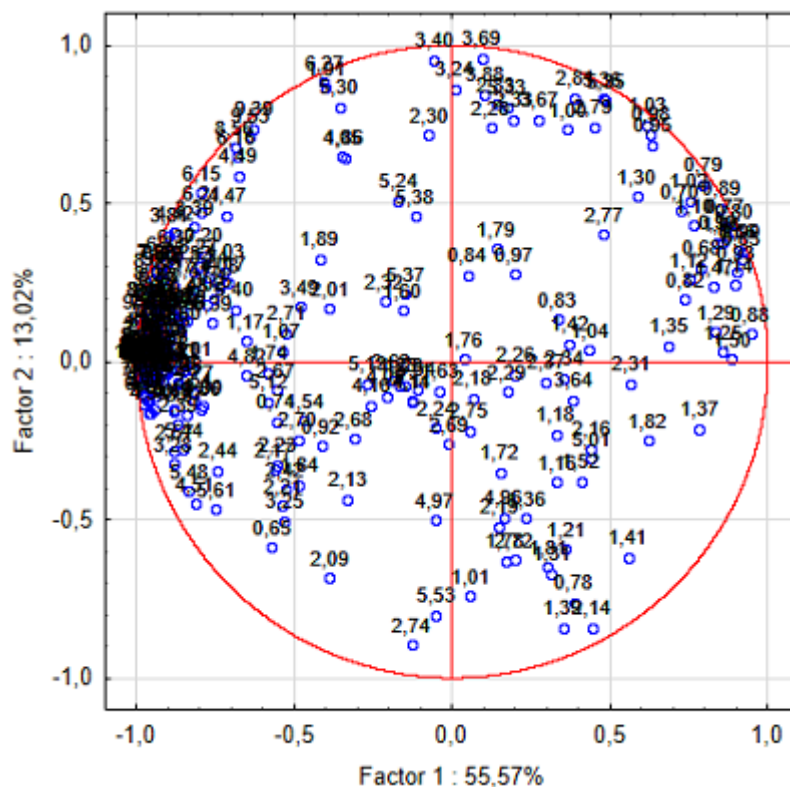


Figura 29 – Projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de *Duroia macrophylla* na análise de componentes principais.

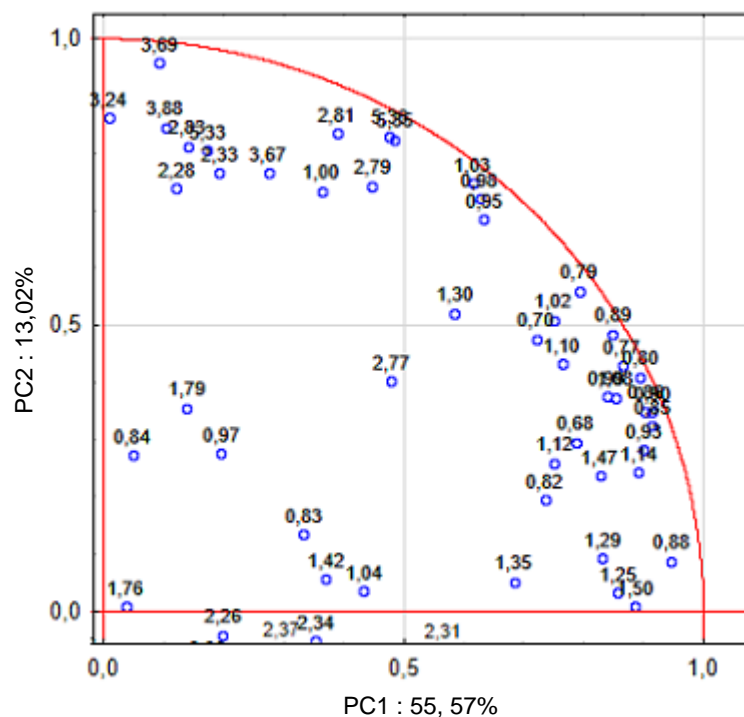


Figura 30 – Região aumentada do primeiro quadrante direito da projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de *Duroia macrophylla* na análise de componentes principais.

As amostras 8AH, 8BH, 11AH e 11BH apresentaram uma separação das amostras 2AH, 2BH, 5AH e 5BH, indicando uma diferença química entre os meses mais chuvosos e os demais, segundo comparação aos índices de pluviosidade dos meses referentes às coletas das amostras (figura 31). Também está relacionada à esta separação, a intensidade dos sinais nas áreas espectrais entre 9 e 10 ppm, posicionadas principalmente no primeiro quadrante esquerdo (figura 32), onde os meses com maior índice de chuvas apresentaram maiores intensidades nestes sinais, que são relacionados à presença de alcaloides indólicos (hidrogênios ligados à nitrogênio). Desta forma, é possível inferir que a presença de alcaloides indólicos nas plantas de *Duroia macrophylla* é encontrada em maiores quantidades nos meses mais chuvosos do ano.

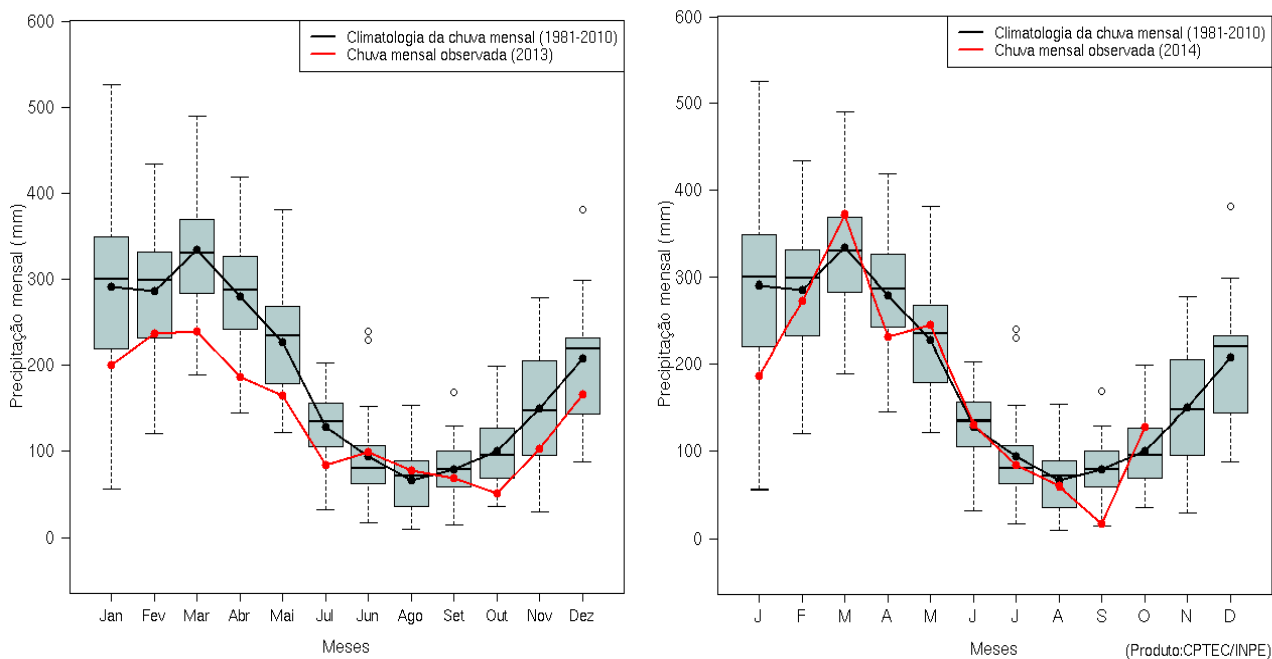


Figura 31 – Índices pluviométricos na região de Manaus entre os meses de janeiro e dezembro de 2013 e janeiro e outubro de 2014. (INPE, 2014).

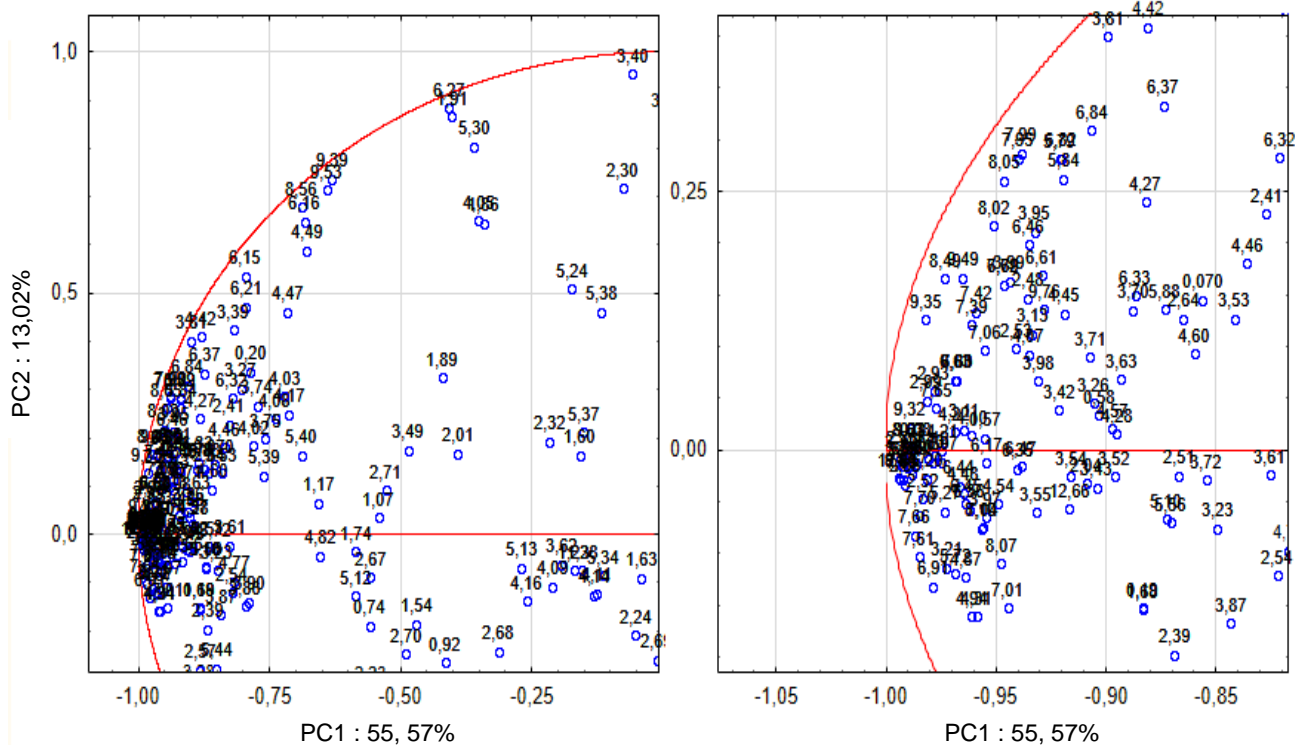


Figura 32 – Região aumentada do primeiro quadrante esquerdo da projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos hexânicos de *Duroia macrophylla* na análise de componentes principais.

A região amazônica é uma área de grande precipitação pluviométrica, mesmo nos meses de verão amazônico, onde as chuvas diminuem consideravelmente. Por se tratar de uma região com temperaturas altas e razoavelmente constantes, estes fatores podem não influenciar tanto no metabolismo das plantas, com exceção daquelas que se encontram em áreas alagáveis como a várzea e o igapó. Plantas em ambientes com grandes variações ambientais podem apresentar maiores oscilações metabólicas (GOBBO-NETO & NETO, 2007). Em exemplo, em um estudo realizado na região sudeste do Brasil, onde a temperatura e o clima oscilam bastante entre verão e inverno, Figueiredo (2010) verificou variação na atividade antioxidante de extratos etanólicos brutos das folhas de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) de acordo com a influência da sazonalidade, onde também verificou que fatores climáticos, como o índice pluviométrico e temperatura, podem estar relacionados com a atividade biológica apresentado pelo extrato da planta.

As amostras 8AH se apresentaram bastante separadas das demais, deslocadas no segundo quadrante esquerdo. Esta posição, provavelmente, foi

apresentada pelo fato de que a intensidade dos sinais entre 9 e 10 ppm destas amostras são muito baixas, onde as leituras de peakpicking realizadas não capturaram a presença destes picos. Portanto, apesar de apresentar os sinais para alcaloides, os mesmos apresentaram-se pouco intensos para que fossem apresentados na PCA.

De acordo com Gobbo-Neto & Lopes (2007), a época da coleta da planta é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes ativos não é constante durante o ano. São relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, como óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, saponinas, alcaloides, taninos, graxas epicuticulares, iridoides, glucosinolatos e glicosídeos cianogênicos.

Além dos sinais entre 9 e 10 ppm, houve uma grande influência dos sinais entre 8 e 9 ppm no posicionamento das amostras nos PC1xPC2, onde os mesmos se apresentaram somente nos quadrantes esquerdos, assim como os sinais entre 9 e 10 ppm (figura 32). Os sinais entre os deslocamentos de 8 e 9 ppm sugerem a presença de componentes aromáticos, que podem inferir uma relação aos sinais de hidrogênios ligados a nitrogênios, sendo estas duas características de alcaloides indólicos.

Na PCA dos extratos metanólicos foi possível observar que as amostras, tanto dos dois indivíduos como entre os meses de coleta, diferem entre si (figura 33). Com exceção das amostras dos meses de novembro/2013 e de fevereiro/2014 (11AM e 11BM, 2AM e 2BM, respectivamente), as amostras dos dois indivíduos não se apresentaram no mesmo quadrante, indicando influências de sinais diferentes nas amostras. As amostras foram agrupadas nos quadrantes por influências de sinais diversificados, onde as únicas amostras que apresentaram diferenciação na posição da PCA por causa dos metabólitos de interesse foram as amostras do mês de novembro, dos dois indivíduos (11AM e 11BM).

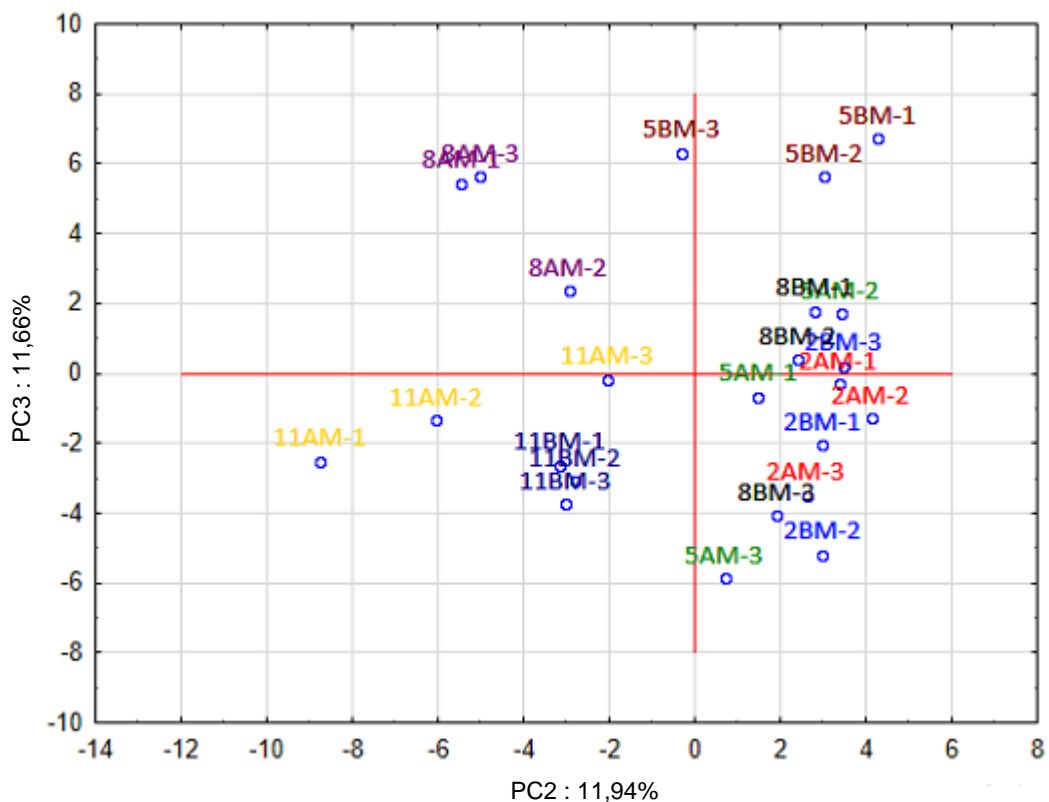


Figura 33 – Análise de componentes principais das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos metanólicos de dois indivíduos de *Duroia macrophylla* (A e B) ao decorrer de um ano, onde: 2, 5, 8 e 11 representam coletas dos meses de maio, agosto, novembro (2013) e fevereiro (2014), respectivamente.

As amostras dos dois indivíduos do mês de novembro se posicionaram no segundo quadrante esquerdo, devido ao posicionamento contrário dos sinais dos deslocamentos 9,39 e 9,53 ppm, que indicam hidrogênios ligados a nitrogênios (característica de alcaloides indólicos): de acordo com o loading da PCA (figura 34) é possível verificar a presença destes sinais no primeiro quadrante direito, responsáveis pelo posicionamento das amostras no quadrante contrário. Esta separação consiste pela baixa evidência e intensidade destes sinais nestas amostras, indicando a baixa produção ou nula de alcaloides nesta época do ano nas folhas dos indivíduos de *Duroia macrophylla*.

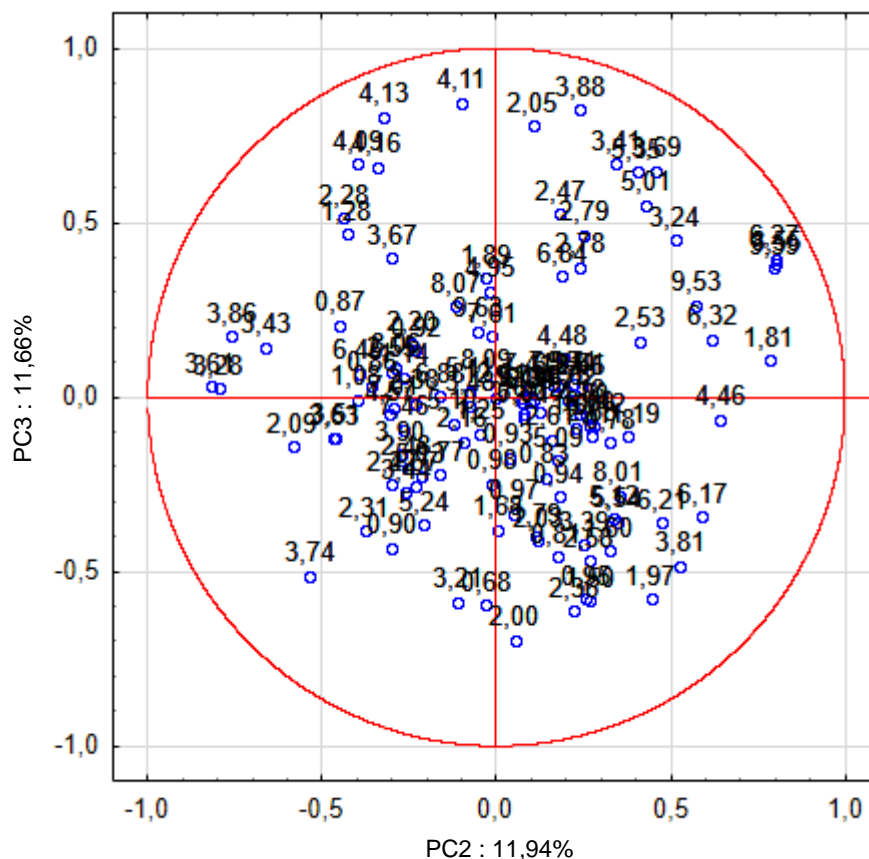


Figura 34 – Projeção das variáveis sobre o loading das amostras de ressonância magnética nuclear de extratos metanólicos de *Duroia macrophylla* na análise de componentes principais.

A baixa produção de alcaloides no mês de novembro pode estar associada à época de reprodução da espécie, onde neste mês inicia-se a época de floração das espécies de *Duroia macrophylla*. Os dois indivíduos coletados encontravam-se com inflorescências nos meses de novembro e dezembro.

Sabe-se que os metabólitos secundários tem grande participação nos eventos ligados à reprodução e proteção das plantas, onde metabólitos específicos possuem funções vitais para tais eventos. Neste caso, a baixa produção de alcaloides pode estar associada a mudança de fluxo de energia e precursores para a formulação de outras substâncias com ação específica para os processos metabólitos ligados à floração e reprodução.

5.2. CULTURA DE TECIDOS *IN VITRO*

5.2.1. Pré-desinfestação e desinfestação

Todos os tratamentos de desinfestação de explantes de folhas adultas, independente da pré-desinfestação, não estabeleceram explantes assépticos vivos, não havendo diferenças entre os tratamentos (tabela 06). Os tratamentos de desinfestação de explantes de folhas jovens apresentaram resultados satisfatórios no estabelecimento de explantes vivos e assépticos, dependente da pré-desinfestação, onde os tratamentos DMJ05 (TPDJ02) e DMJ06 (TPDJ02) foram significativamente melhores do que os demais (tabela 07).

Tabela 06 – Porcentagem de contaminação e sobrevivência de explantes de folhas adultas de *Duroia macrophylla* submetidos a diferentes tratamentos de pré-desinfestação e desinfestação, cultivados em meio Murashige & Skoog (1962) (MS), após 30 dias.

Tratamento Pré-desinfestação	Tratamento Desinfestação	Contaminação (%)		Sobrevivência (%)	Sobreviventes Assépticos(%)
		Fungo	Bactéria		
TPDA 01	DMA01	100	0	100	0
	DMA02	100	0	100	0
	DMA03	100	0	100	0
	DMA04	100	0	100	0
	DMA11	100	0	100	0
	DMA12	100	0	100	0
TPDA 02	DMA01	100	0	100	0
	DMA02	100	0	100	0
	DMA03	100	0	100	0
	DMA04	100	0	100	0
	DMA11	100	0	100	0
	DMA12	100	0	100	0
	DMA13	100	0	100	0
	DMA14	100	0	100	0
TPDA 03	DMA05	100	0	100	0
	DMA06	95	5	100	0
	DMA07	90	0	100	0
	DMA08	95	0	100	0
	DMA09	95	0	100	0
	DMA10	95	0	100	0
TPDA 04	DMA01	100	0	100	0
	DMA02	100	0	100	0
	DMA03	100	0	100	0
	DMA04	100	0	100	0

Não houve diferenças significativas entres os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 07 – Porcentagem de contaminação e sobreviventes de explantes de folhas jovens de *Duroia macrophylla* submetidos a diferentes tratamentos de desinfestação e cultivados em meio Murashige & Skoog (1962) (MS), após 30 dias.

Pré-desinfestação	Tratamento Desinfestação	Contaminação (%)		Sobreviventes (%)	Sobreviventes Assépticos (%)
		Fungos	Bactérias		
TPDJ 01	DMJ02	80 <i>a</i>	5 <i>a</i>	90 <i>ab</i>	5 <i>b</i>
	DMJ03	70 <i>ab</i>	5 <i>a</i>	80 <i>ab</i>	5 <i>b</i>
	DMJ04	100 <i>a</i>	0 <i>a</i>	100 <i>a</i>	0 <i>b</i>
TPDJ 02	DMJ04	100 <i>a</i>	0 <i>a</i>	100 <i>ab</i>	0 <i>b</i>
	DMJ05	13,3 <i>cd</i>	0 <i>a</i>	66,6 <i>bc</i>	53,3 <i>a</i>
	DMJ06	26,6 <i>cd</i>	0 <i>a</i>	66,6 <i>bc</i>	40 <i>a</i>
TPDJ 03	DMJ02	0 <i>d</i>	0 <i>a</i>	0 <i>d</i>	0 <i>b</i>
	DMJ03	0 <i>d</i>	0 <i>a</i>	0 <i>d</i>	0 <i>b</i>
TPDJ 04	DMJ01	45 <i>bc</i>	5 <i>a</i>	50 <i>bc</i>	0 <i>b</i>
	DMJ02	10 <i>d</i>	5 <i>a</i>	15 <i>d</i>	0 <i>b</i>
	DMJ03	0 <i>d</i>	0 <i>a</i>	0 <i>d</i>	0 <i>b</i>

Em cada variável as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A diferença entre os resultados dos explantes de folhas adultas e jovens provavelmente deve-se por conta do tempo da exposição natural das folhas adultas às interações ambientais e aos microrganismos presentes no habitat, que é maior que das folhas jovens. A maior quantidade de contaminação em folhas adultas já foi observada em diversos estudos com microrganismos endofíticos de plantas: McCutcheon e colaboradores (1993) encontraram maior variabilidade genética em populações da bactéria *Rickettsia parkeri* coletados em folhas maduras de *Pseudotsuga menziesii* (Pinaceae) do que em folhas jovens; Pimentel e colaboradores (2006), através de pesquisas com fungos endofíticos em erva-mate, constataram que a quantidade de fungos endofíticos em folhas adultas é muito maior que em folhas jovens; assim como Esteves e colaboradores (2007), que também notaram que a riqueza de endofíticos em *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) aumenta conforme a idade das folhas é maior.

É importante ressaltar a importância da seleção da planta matriz e o tipo de explante a ser utilizado para um bom protocolo de desinfestação e estabelecimento *in vitro* de plantas. A condição fitossanitária e fisiológica do material vegetal é importante para uma cultura viável e eficiente, e no caso de folhas jovens, essa condição normalmente é melhor, além de que o processo de desdiferenciação nos tecidos juvenis é teoricamente mais fácil, pois apresentam uma grande capacidade

de crescimento e resposta à aplicação de fitorreguladores (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Sabe-se que o sucesso na obtenção de culturas assépticas *in vitro* depende da eficiência da combinação dos agentes químicos, das concentrações utilizadas, dos tempos de exposição aos agentes e da intensidade de contaminação do explante. Entre os tratamentos onde se utilizaram explantes de folhas jovens, o processo de pré-desinfestação foi o fator principal para o melhor rendimento do processo de desinfestação. O tratamento de pré-desinfestação onde os explantes ficaram imersos em solução biocida durante 5 horas demonstraram resultados significativamente melhores do que os outros. Os explantes que ficaram imersos em solução biocida por tempos maiores que 8 horas demonstraram resultados significativamente melhores de assepsia que os outros, mas acabaram causando a morte dos tecidos vegetais dos explantes. Os tratamentos com tempo menor de exposição à solução biocida, de 4 horas, causaram as maiores taxas de contaminação dos explantes por fungos. A contaminação por bactérias foi pequena e não demonstrou diferenças significativas entre os tratamentos.

Uma das alternativas para contornar o problema de contaminações em explantes é a aplicação de fungicidas, que evitam ou diminuem a severidade das doenças e, conseqüentemente, podem aumentar a produtividade da cultura (DUDIENAS et al., 1990).

Sabe-se que os fungicidas normalmente são bastante tóxicos, e seu uso deve ser controlado e equilibrado de forma que não cause danos aos tecidos vegetais. O uso ideal dos fungicidas é a sua aplicação diretamente na planta matriz, onde a aplicação correta do fungicida é de extrema importância para a maior eficiência do produto. Um dos métodos mais usuais para a total cobertura do fungicida sobre os fungos da planta hospedeira é por meio de pulverização, onde se deve levar em conta o tipo de fungicida utilizado (contato ou sistêmico) em relação aos locais da planta que devem ser pulverizados (SONEGO & GARRIDO, 2014).

No entanto, a planta *Duroia macrophylla*, utilizada neste estudo, se trata de uma matriz silvestre (que se encontra em seu habitat natural, ao meio da floresta amazônica), onde o tratamento com solução biocida se torna inviável. Portanto, optou-se por tratamento direto nos explantes com imersão prolongada à solução biocida, que contém o fungicida de contato Mancozeb na sua composição.

A maioria dos protocolos de pré-desinfestação que utilizam imersão de explantes em fungicidas e antibióticos utilizam apenas alguns minutos de imersão, com exceção da desinfestação de sementes e de explantes provindos de espécies lenhosas, que normalmente apresentam maiores problemas de contaminação, onde os mesmos podem ser imersos por horas ou até um dia. Diversos estudos tem utilizado a imersão de explantes em agentes fungicidas para a obtenção de culturas assépticas: Andrade e colaboradores (2005) obtiveram melhores resultados na desinfestação de explantes de mangueira com 30 minutos de imersão em fungicida; Freitas (2009) utilizou 24 horas de imersão em fungicida como protocolo para o auxílio da descontaminação de sementes de canela-de-ema; Naranjo e colaboradores (2014) também utilizaram como parte do protocolo de pré-desinfestação de *Psychotria ipecacuanha* (Rubiaceae) a imersão de explantes em fungicida, onde explantes foliares foram mantidos por 2 horas em imersão; Regalado e colaboradores (2015) conseguiram bons resultados na desinfestação de rizomas de *Asparagus brachyphyllus* e *Asparagus pseudoscaber* (Asparagaceae), utilizando imersão dos explantes em fungicida (Benomyl) durante 20 minutos; Medina & Casas (2014), no processo de desinfestação de *Thymus moroderi* (Lamiaceae), utilizaram imersão em fungicida durante 15 minutos.

Entre os tratamentos de desinfestação, dentro do melhor grupo de pré-desinfestação (TPD02), destacaram-se os tratamentos com maior tempo de exposição ao etanol 70%, sendo os tratamentos DMJ05 e DMJ06.

Sabe-se que o etanol 70% possui características germicidas com maior ação sobre fungos, além de sua ação surfactante, que quando aplicado inicialmente, facilita a ação do hipoclorito de sódio, que possui efeito principalmente sobre bactérias (PELCZAR et al., 1996). O etanol geralmente é utilizado a 70% e 80%, pois acima dessa concentração é menos eficiente e pode desidratar rapidamente os tecidos (ANDRADE et al., 2005).

O tempo de exposição dos tecidos ao etanol é, em geral, de algumas dezenas de segundos, mas, conforme a sua consistência, pode chegar a alguns minutos. As folhas de *Duroia macrophylla*, por serem coriáceas e apresentarem uma camada de cutícula espessa sobre a epiderme, condicionam maior dificuldade para o contato dos agentes desinfestantes com os tecidos da planta. Segundo Grattapaglia &

Machado (1998), quando o explante está protegido por outras camadas de tecido, concentrações e tempos de exposições maiores podem ser utilizados.

Apesar dos resultados positivos, ainda fazem-se necessários mais testes de desinfestação para o estabelecimento da espécie *in vitro*, visto que os melhores resultados apresentados são de apenas 50% de assepsia dos explantes.

Uma das principais dificuldades encontradas na micropropagação *in vitro*, além do enraizamento, é a obtenção de um número suficiente de culturas assépticas que permitam dar prosseguimento ao cultivo *in vitro*. Isso se verifica em função da frequente presença de microrganismos associados aos explantes e da relativa ineficiência dos procedimentos de desinfestação superficial em espécies lenhosas, que costumam ser empregados com sucesso em espécies herbáceas (GOLLE et al., 2013).

5.2.2. Indução de calos

Os explantes que se mantiveram vivos e assépticos após o processo de desinfestação foram inoculados em meio MS com 4 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 2 mg.L⁻¹ de CIN para a indução de calo. O estabelecimento deste meio para o processo de calogênese foi baseado em estudos com *Coffea arabica*, espécie da mesma família que *Duroia macrophylla*, onde maiores porcentagens de formação de calos em explantes foliares foram obtidas com a utilização de 4,18 mg.L⁻¹ de 2,4-D combinado com 2 mg.L⁻¹ de cinetina, ou seja, com uma razão auxina/citocinina 2:1 (MACIEL et al., 2003).

A combinação de citocinina e auxina é amplamente utilizada para a indução da calogênese *in vitro*, porém sabe-se que o responsável principal do processo é a auxina. Segundo Bhojwani & Dantu (2013), reguladores de crescimento, em particular a auxina, são comumente utilizados para induzir a desdiferenciação, onde a auxina é considerada o principal hormônio vegetal necessário para a ativação da divisão diferenciada das células, tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo o 2,4-D uma das auxinas mais comumente utilizadas.

Após duas semanas de inoculação, os explantes começaram a apresentar formação de calos nas extremidades dos segmentos foliares (figura 35). Após um mês a transformação dos tecidos dos segmentos foliares em calo foi total. Os calos formados em segmentos foliares de *Duroia macrophylla* apresentaram-se

multiformes, onde em uma mesma parcela foram evidenciados calos friáveis, compactados e clorofilados (figura 36).

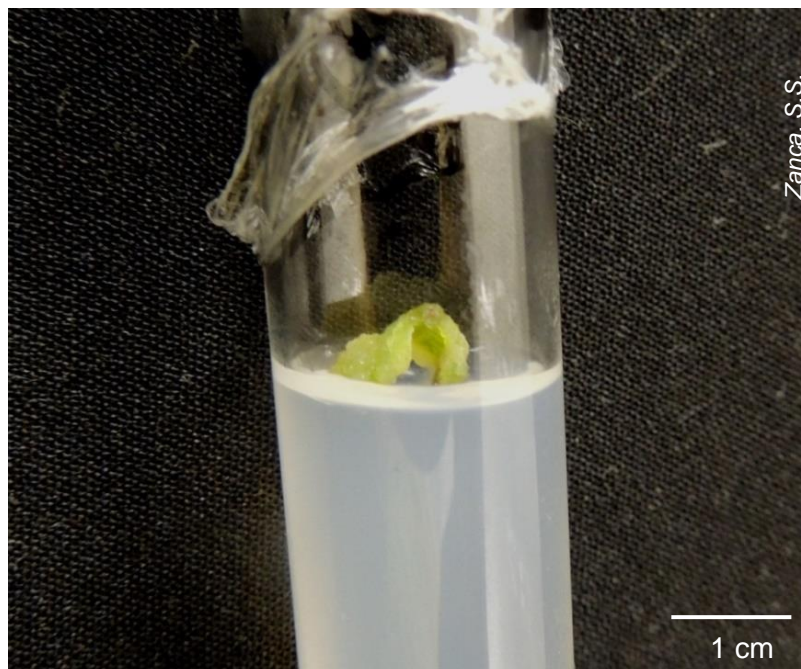


Figura 35 – Formação inicial de calo em segmento foliar de *Duroia macrophylla*.

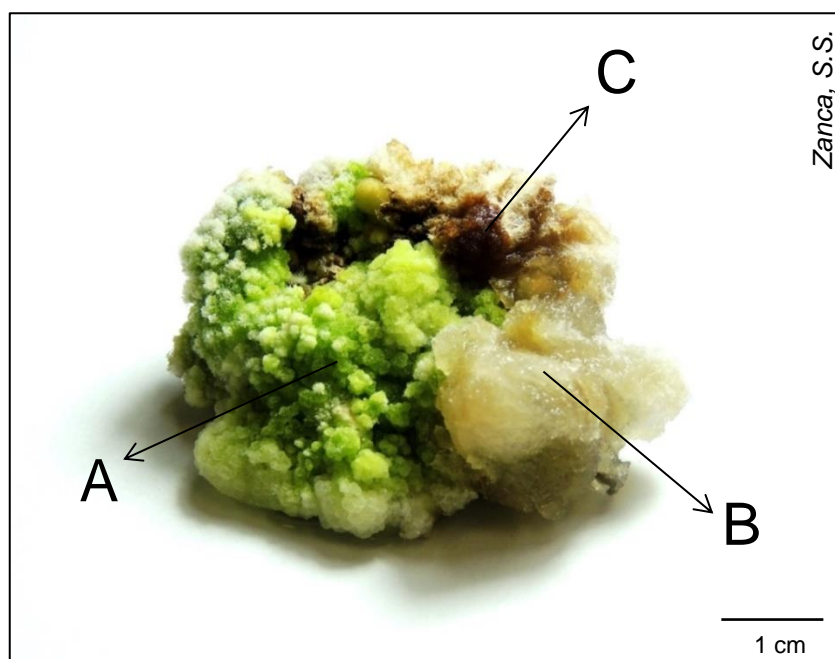


Figura 36 – Calo multiforme de *Duroia macrophylla*, após dois meses *in vitro*: A – calo clorofilado; B – calo friável; C – calo compactado.

Apesar da variação dos tipos de calos presentes, todos são considerados massas de células indiferenciadas. Werner e colaboradores (2009) também evidenciaram calos multiformes em testes de calogênese na espécie arbórea *Caesalpinia echinata* (Fabaceae).

Para a obtenção de calos com células uniformes pode-se alterar o balanço das citocininas e auxinas, até que o resultado esperado seja presenciado. Stella e Braga (2002) somente obtiveram sucesso na indução de calos *in vitro* de *Rudgea jasminoides* com a utilização de Picloram, isolado ou combinado com cinetina, onde os melhores resultados (calos friáveis e uniformes) foram obtidos com Picloram isolado; Pereira e colaboradores (2007), com a espécie *Uncaria guianensis* (Rubiaceae), obtiveram calos que variaram em coloração e consistência, dependendo dos tipos de auxinas presentes no meio; Almeida e colaboradores (2010) obtiveram melhor aspecto visual e melhor desenvolvimento nos calos *in vitro* de *Mussaenda erythrophylla* (Rubiaceae) na presença da auxina ANA (ácido naftalenoacético) nos meios.

5.2.3. Análise fitoquímica dos extratos dos calos

5.2.3.1. Preparo dos extratos

Para realizar as extrações dos calos, os mesmos foram repicados para o aumento da massa total do material vegetal. Os calos formados nos tratamentos DMJ02 (TPDJ01) e DMJ03 (TPDJ01) foram repicados cinco vezes, e depois de liofilizados foram pesados e denominados de DMC01 e DMC02, respectivamente. Os calos formados nos tratamentos DMJ05 (TPDJ02) e DMJ06 (TPDJ02) foram repicados duas vezes, e depois de liofilizados foram pesados e denominados de DMC03 e DMC04, respectivamente (tabela 08). Os quatro grupos de calos foram submetidos a extrações com hexano e metanol, e originaram oito extratos iniciais. Os extratos metanólicos, quando secos em rotaevaporador, formaram um precipitado, que foi separado do sobrenadante. Foi originado então um total de 12 extratos, provenientes de calos de *Duroia macrophylla* (tabela 09).

Tabela 08 – Massa total de quatro grupos de calos de *Duroia macrophylla* após liofilização.

Grupo de calos	Número de calos inicial	Número de Repicagens	Massa total final fresca (g)	Massa total final liofilizada (g)	Rendimento Final (%)
DMC 01	1	5	30,68	2,52	8,21
DMC 02	1	5	30,52	2,38	7,80
DMC 03	8	2	19,27	1,50	7,78
DMC 04	6	2	23,20	1,88	8,10

Tabela 09 – Extratos de calos de *Duroia macrophylla* preparados e armazenados no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia/ COTI-INPA.

Material Vegetal	Material Inicial (g)	Extrato Hexânico		Extrato Metanólico Sobrenadante		Extrato Metanólico Precipitado	
		M (mg)	R (%)	M (mg)	R (%)	M (mg)	R (%)
		DMC 01	2,52	23,2	0,9	635,6	25,2
DMC 02	2,38	26,8	1,1	661,4	27,8	113,1	4,8
DMC 03	1,50	13,0	0,9	706,8	47,1	61,6	4,1
DMC 04	1,88	15,0	0,8	769,1	40,9	74,4	4,0

M – Massa; R – Rendimento.

5.2.3.2. Análise em Cromatografia de Camada Delgada Comparativa

Os extratos foram analisados em CCDC em diferentes sistemas de eluição, para a escolha do melhor sistema, de acordo com a polaridade da amostra.

Para os extratos hexânicos o sistema de eluição com Hexano / Acetato de Etila com proporção 9:1 demonstrou a melhor eluição para análise com os reveladores químicos e físicos (figuras 37 e 38).

Para os extratos metanólicos o sistema de eluição com metanol puro demonstrou a melhor eluição para análise com os reveladores químicos e físicos (figuras 39 a 41).

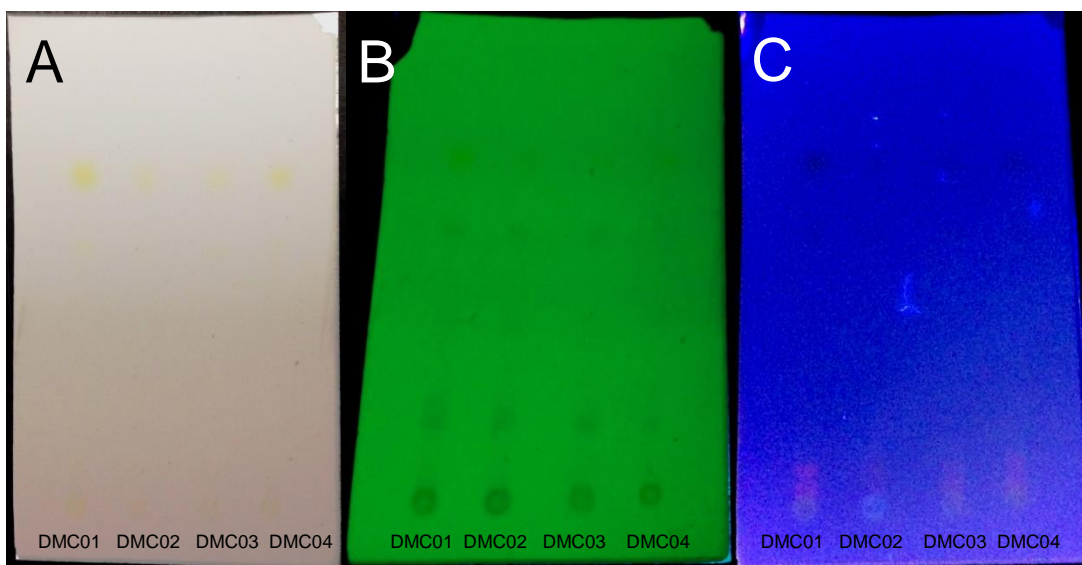


Figura 37 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de quatro grupos de calos cultivados *in vitro* de *Duroia macrophylla*, sob luz visível (A), em revelação sob luz ultravioleta em 254 nm (B) e em 365 nm (C); sistema de eluição Hexano / Acetato de Etila com proporção 9:1.

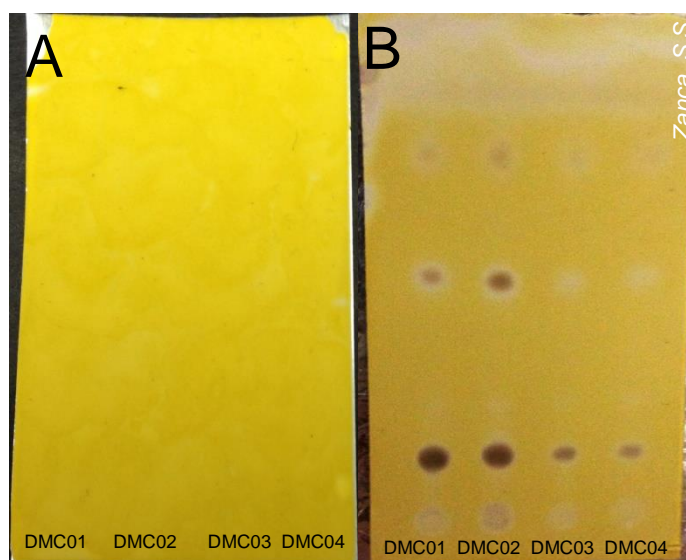


Figura 38 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de extratos hexânicos de quatro grupos de calos cultivados *in vitro* de *Duroia macrophylla*, com revelação em reagente de Dragendorff (A) e sulfato cérico (B); sistema de eluição Hexano / Acetato de Etila com proporção 9:1.

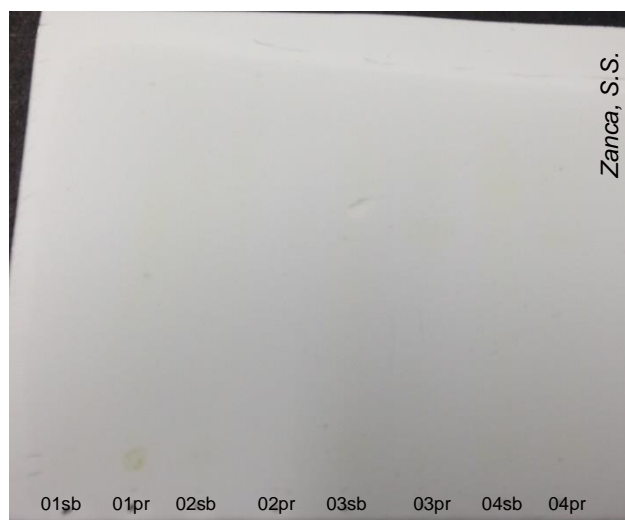


Figura 39 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de oito extratos metanólicos de quatro grupos de calos cultivados *in vitro* de *Duroia macrophylla*, sob luz visível, sistema de eluição metanol puro.

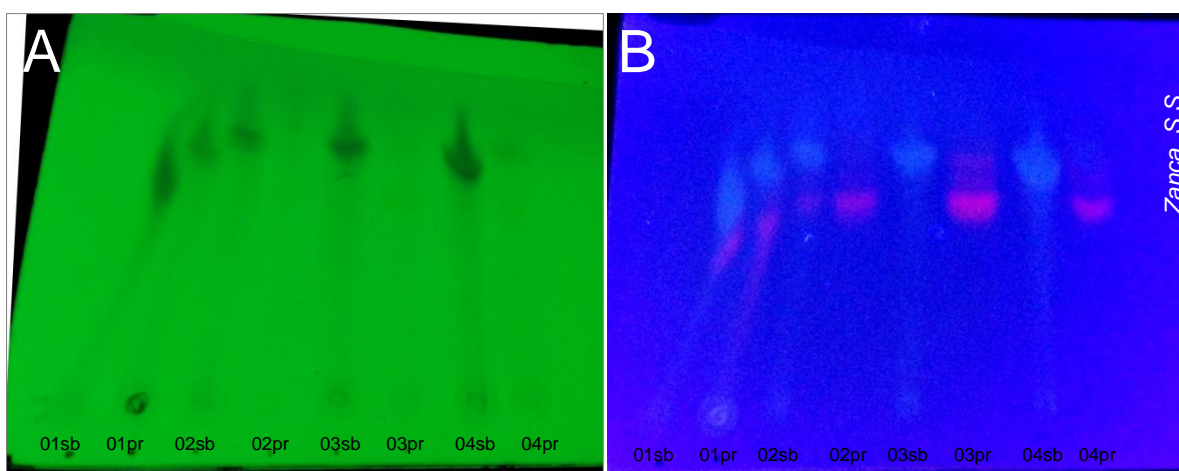


Figura 40 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de oito extratos metanólicos de calos cultivados *in vitro* de *Duroia macrophylla*, em revelação sob luz ultravioleta em 254 nm (A) e 365 nm (B), sistema de eluição metanol puro.

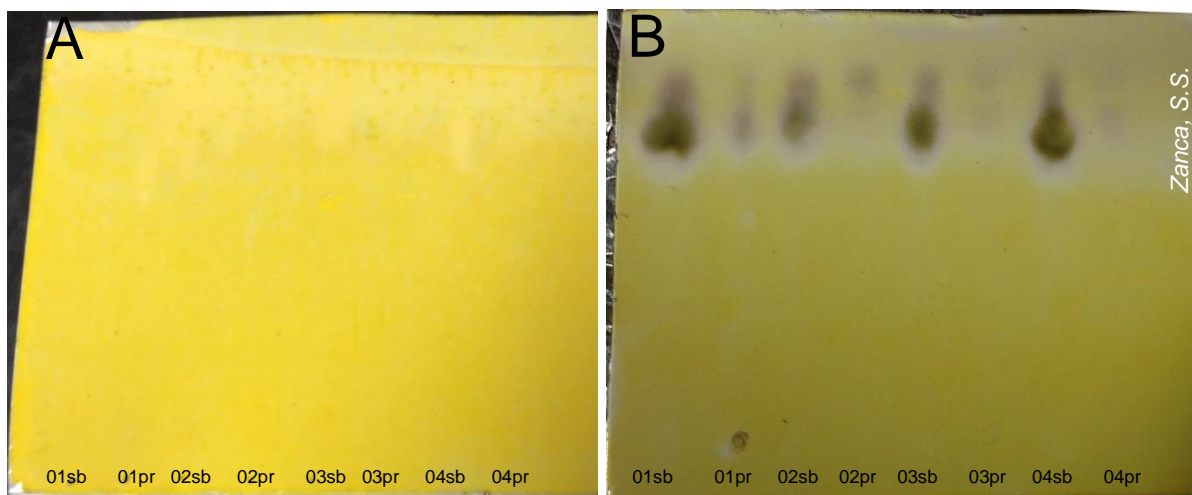


Figura 41 – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa de oito extratos metanólicos de calos cultivados *in vitro* de *Duroia macrophylla*, com revelação em reagente de Dragendorff (A) e sulfato cérico (B); sistema de eluição metanol puro.

Não foi evidenciada a presença de alcaloides em nenhum dos extratos de calos de *Duroia macrophylla*, conforme demonstrado pelo revelador reagente de Dragendorff. Assim como os extratos obtidos diretamente da planta, os extratos de calos não apresentaram coloração alaranjada em nenhuma parte da placa de CCDC.

Assim como nos extratos da planta, as placas com extratos dos calos de *D. macrophylla* reveladas com sulfato cérico também evidenciaram a presença de possíveis terpenos, onde foi evidenciado manchas de coloração roxa após o aquecimento da placa com o revelador (figura 41).

Não houve sinais de fluorescência na placa de CCDC revelada com luz UV no comprimento de 254 nm. Na placa revelada com UV no comprimento de 365 nm foi possível observar fluorescências azuis e laranjas, assim como observado nos extratos das folhas da planta, sugerindo a presença de substâncias com cromóforos (sistemas conjugados), pois absorvem radiação UV e tornam-se fluorescentes na cor azul. Neste caso podem ser consideradas diversas hipóteses de substâncias, pois cromóforos apresentam-se em diferentes tipos de substâncias, em seus diferentes formatos, como anéis aromáticos, ligações duplas, conjugações de oxigênio e carbono, entre outros. As fluorescências de cor laranja em UV 365 nm normalmente indicam a presença de pigmentos como a clorofila.

5.2.3.3. Análises de Ressonância Magnética Nuclear

Ao contrário dos resultados dos extratos realizados diretamente das folhas de *Duroia macrophylla*, os calos cultivados *in vitro* da espécie não indicaram a presença de alcaloides nas análises realizadas em ressonância magnética nuclear em nenhum dos extratos (figuras 42 e 43), uma vez que não foi evidenciado nenhum sinal na faixa da região específica para o grupo químico nas leituras, nem mesmo entre nove e dez ppm, onde são encontrados os sinais dos hidrogênios acoplados aos nitrogênios dos alcaloides indólicos, já encontrados na espécie. A presença de terpenos nos extratos de calos de *Duroia macrophylla* pode ser inferida a partir da presença de sinais entre os deslocamentos de 0,7 e 1,2 ppm nos espectros de RMN. Estes sinais podem ser um indício de que os calos de *D. macrophylla* podem estar produzindo os mesmos terpenos, ou similares, que a planta, conforme os sinais observados nos espectros realizados da planta *in natura* neste trabalho e por Martins (2014).

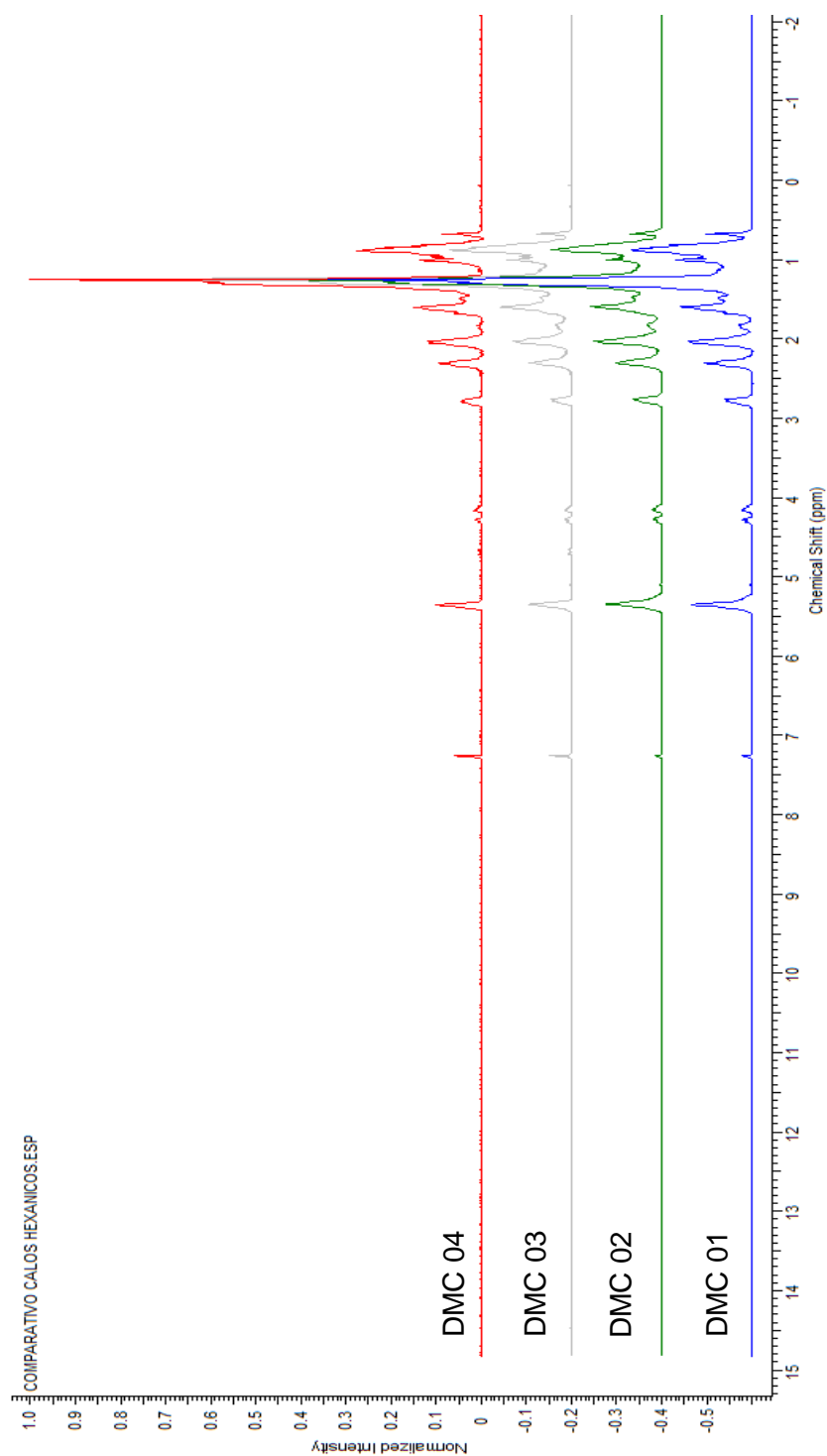


Figura 42 – Ressonância Magnética Nuclear de quatro extratos hexânicos de calos cultivados *in vitro* de *Duroia macrophylla* (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl₃, 300 MHz).

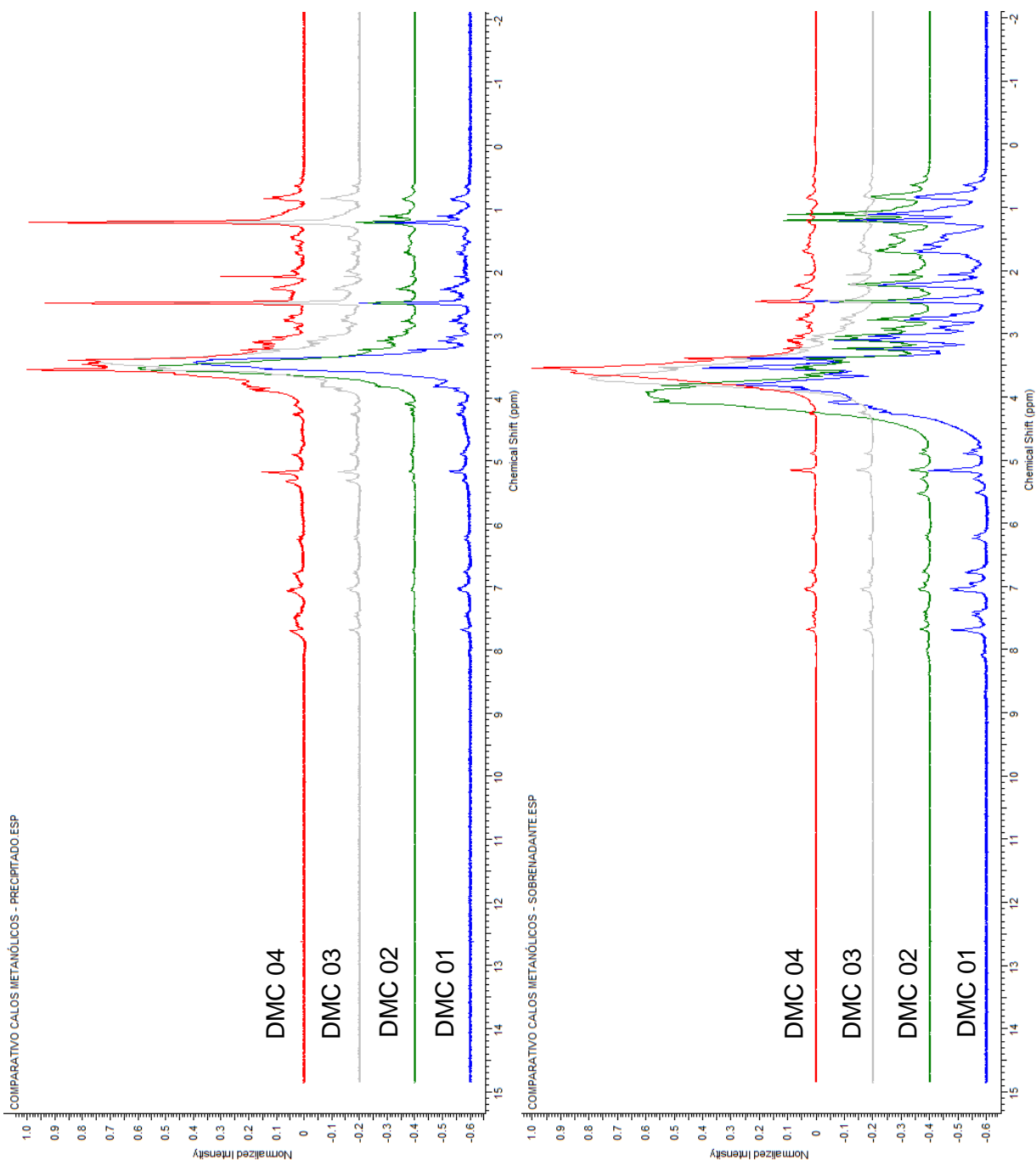


Figura 43 – Ressonância Magnética Nuclear de oito extratos metanólicos (quatro precipitados e quatro sobrenadantes) de calos cultivados *in vitro* de *Duroia macrophylla* (sinais ajustados com transformada de Fourier e Phase – Software ACD/Labs) (CDCl_3 , 300 MHz).

A produção dos metabólitos em culturas de tecidos *in vitro* nem sempre apresenta as mesmas proporções que a produção *in vivo*, mesmo buscando as melhores condições *in vitro* para a planta. Metabólitos secundários de células e de

culturas de tecidos de *Catharanthus roseus* normalmente apresentam um padrão de alcaloide muito mais simples do que as plantas intactas (MORENO et al., 1995). Silva e colaboradores (2009), através de estudos fitoquímicos com calos de carqueja (*Baccharis trimera*, Asteraceae), constaram que apenas uma, de duas substâncias de interesse encontradas *in natura*, foi produzida pelos calos: um tipo de flavona não foi constatada em plantas *in vitro* nas condições de análise adotadas; em calos, não foram detectadas os dois tipos de flavonas observados da planta *in natura*; por outro lado, o ácido clorogênico, uma das substâncias de interesse, não só foi constatado nos calos, como revelou teores mais elevados quando comparado com os teores detectados em plantas *in vitro* e *in vivo* (meio MS + 1,0 µM de CIN).

Vários autores observaram que pode haver diferenças na produção de metabólitos secundários pelas culturas de células e plantas intactas da mesma espécie (BROWN et al., 1990; DiCOSMO & TOWERS, 1984). Estas diferenças estão relacionadas, entre outros, às condições ambientais do cultivo de células bem como a composição do meio de cultura. As culturas de células tanto podem sintetizar os metabólitos em concentrações muito baixas como podem até deixar de produzi-los. Ainda, a produção de metabólitos secundários pode também ser bastante comprometida em células morfológicamente desdiferenciadas (calos, suspensões celulares e células meristemáticas), pois normalmente é dependente da produção de algumas enzimas que, por sua vez, dependem da fase de desenvolvimento do vegetal (SIERRA, 1991).

Pereira (2004), através de estudos químicos com as plantas *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* (Rubiaceae), também obteve resultados diferentes comparando extrações realizadas com plantas cultivadas *in vivo*, plântulas cultivadas *in vitro* e calos cultivados *in vitro*. Alcaloides produzidos pela planta *in vivo* foram encontrados somente nas plântulas cultivadas *in vitro* (em menor proporção), mas não nos calos cultivados *in vitro*. A autora ressalta que os meios utilizados, MS adicionado de auxinas variadas na concentração de 0,5 mg.L⁻¹, foram inadequados para a produção de alcaloides.

Khanam e colaboradores (2001), em estudos fitoquímicos com a espécie *Duboisia myoporoides* (Solanaceae) cultivada *in vitro*, somente obtiveram os alcaloides de interesse hiosciamina e escopolamina depois da regeneração dos

calos em folhas e raízes, sendo que enquanto o tecido *in vitro* estava em forma de calo não houve a produção dos alcaloides.

O sucesso na síntese de metabólitos de interesse em culturas de tecidos *in vitro* pode estar diretamente ligado ao meio de cultura e reguladores de crescimento utilizados para o processo de calogênese. Diversos estudos com diferentes espécies demonstraram resultados positivos na produção de metabólitos *in vitro*, encontrando as condições ideais para tal procedimento.

Um grande exemplo de sucesso na produção de metabólitos *in vitro* foi evidenciado na obtenção de alcaloides de interesse a partir de culturas de tecidos *in vitro* da espécie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). A espécie *in natura* produz uma das substâncias mais utilizadas atualmente contra o câncer, o alcaloide vincristina. Desta mesma planta foram isolados diversos metabólitos bioativos, como os alcaloides anti-leucêmicos vinblastina e vincristina, o alcaloide ajmalicina com ação anti-hipertensiva, e a serpentina, que tem um efeito sedativo. Para o aumento da produção dos metabólitos de interesse, a cultura de tecidos vegetais *in vitro* foi testada para a produção dos mesmos, onde a vincristina e vinblastina foram detectadas em culturas de calos e de órgãos de *C. roseus*, embora produzidas em proporções pequenas, como na planta *in natura* (MIURA & HIRATA, 1986). Oliveira e colaboradores (2002) também obtiveram sucesso na obtenção de alcaloides de interesse em culturas de calos *in vitro* da planta *Aspidosperma ramiflorum* (Apocynaceae), sendo estes ramiflorina A, ramiflorina B e 10-metoxigeissoschizol.

Vários métodos têm sido testados com o objetivo de melhorar a produção de alcaloides *in vitro*. Entre os diferentes métodos empregados e seus efeitos sobre a produção de alcaloides, a adição dos precursores secoiridóides nos meios de cultura parece ser o mais eficaz (MORENO et al., 1995). Este tratamento proporciona um aumento na produção de alcaloides em diversas linhas celulares testadas.

A composição dos nutrientes e hormônios dos meios de cultura também se mostram bastantes importantes para a produção de metabólitos *in vitro*. Fernandes e colaboradores (2009) obtiveram ótimos resultados na produção do metabólito afrormosina (7-hidroxi-4',6-dimetoxi-isoflavona) em culturas de células em suspensão e calos *in vitro* da espécie *Dipteryx odorata* (Fabaceae), especialmente na cultura de células em suspensão, utilizando o meio MS adicionado de 2,0 mg.L⁻¹ de 2,4-D + 0,5 mg.L⁻¹ de 6-BAP (6-benzilaminopurina) + 340 mg.L⁻¹ de KH₂PO₄ e 2,0

g.L⁻¹ de Phytigelâ. Scalize (2003), em busca do metabólito azadiractina, que é produzido pela planta *Azadirachta indica* (Meliaceae), obteve melhores resultados, quanto a produção e acúmulo de azadiractina, em calos cultivados *in vitro* em meio MS contendo 2,0 mg.L⁻¹ de AIA em associação com 1,0 mg.L⁻¹ de BAP. André e colaboradores (2003) também obtiveram sucesso na produção de metabólitos de interesse *in vitro* com a espécie *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae), utilizando meio MS com 1 mg.L⁻¹ de 2,4-D e 1 mg.L⁻¹ de CIN.

Muitas estratégias podem ser utilizadas para induzir ou aumentar a produção de metabólitos secundários. Uma das maneiras mais efetivas, em muitos casos, é a adição de moléculas precursoras ou intermediárias ao meio de cultivo celular (SILVESTRINI et al., 2002). Outra estratégia interessante é a elicitação que representa usualmente uma das técnicas de maior sucesso, esta técnica consiste na aplicação de um estresse químico ou físico nas células em suspensão para induzir a produção de metabólitos secundários que frequentemente não são produzidos. Isto é feito geralmente com elicitores bióticos (quitosanas, micélios de fungos patogênicos, vários extratos de proteínas) ou fatores abióticos (temperatura, luz, metais pesados, pH, etc.) (FUMAGALI et al., 2008).

5.2.4. Análise dos testes antioxidante, antibacteriano e de toxicidade

Foram utilizados para os testes antioxidante, antibacteriano e de toxicidade cinco extratos de calos de *Duroia macrophylla*. O primeiro extrato, DMCH, foi formado da junção dos quatro extratos hexânicos gerados dos quatro grupos de calos (figura 44), onde a junção dos mesmos foi realizada a partir dos resultados de RMN, que apresentaram grande similaridade entre os grupos; o segundo extrato, DMCMS-1, foi formado da junção dos extratos metanólicos, porção sobrenadante, provindos dos calos dos grupos 1 e 2; o terceiro extrato, DMCMp-1, foi formado da junção dos extratos metanólicos, porção precipitada, provindos dos calos dos grupos 1 e 2; o quarto extrato, DMCMS-2, foi formado da junção dos extratos metanólicos, porção sobrenadante, provindos dos calos dos grupos 3 e 4; e o quinto extrato, DMCMp-2, foi formado da junção dos extratos metanólicos, porção precipitada, provindos dos calos dos grupos 3 e 4.

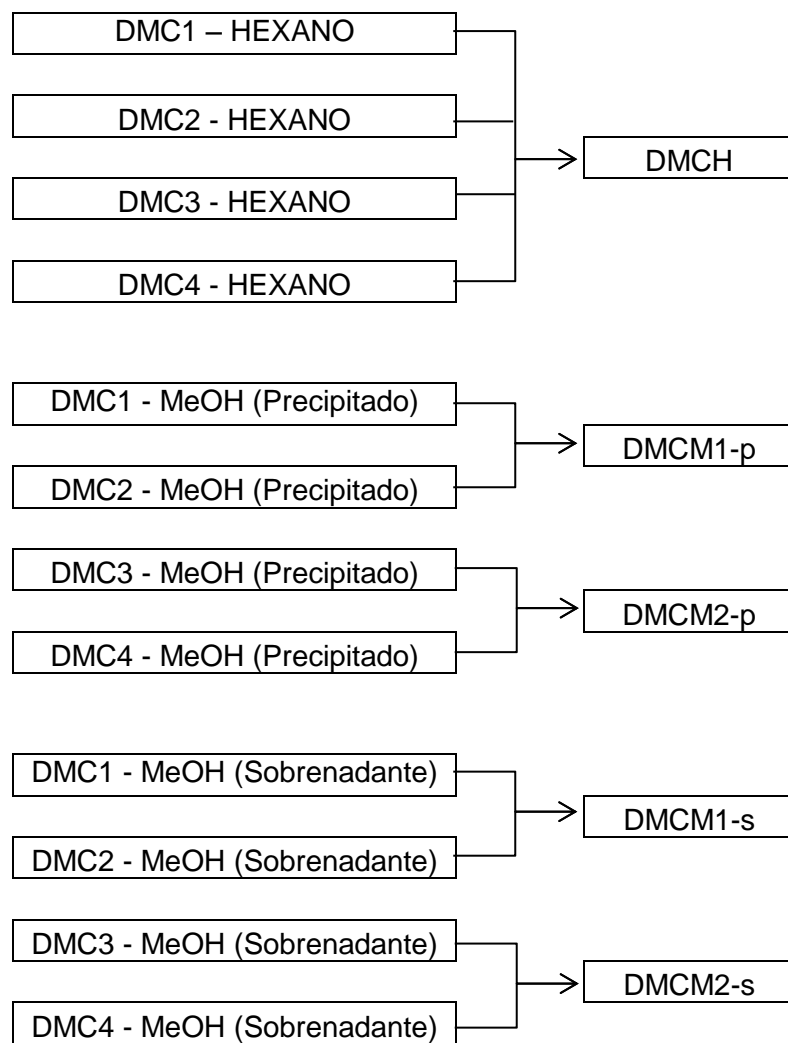


Figura 44 – Esquema da reunião dos extratos de calos conduzidos aos testes biológicos.

Os extratos de calos de *Duroia macrophylla* não apresentaram atividade antioxidante (ferro/fenantrolina e DPPH), citotóxica para *Artemia salina* (tabela 10) e bactericida/bacteriostática para nenhuma das bactérias testadas. Embora na concentração de 500 µg/mL de extrato de calos o teste de toxicidade tenha apresentado alguma porcentagem de mortalidade de larvas de *Artemia salina*, a expressão ainda é considerada muito baixa para um potencial bioativo.

Tabela 10 – Toxicidade de extratos de calos de *Duroia macrophylla* frente a larvas de *Artemia salina*, nas concentrações de 500 a 15 µg/mL de extrato.

Extratos	Concentrações dos extratos dos calos (µg/mL)					
	500	250	120	60	30	15
	Mortalidade (%)					
DMCH	17	10	0	0	0	0
DMCMs-1	10	0	0	0	0	0
DMCMs-2	3	0	0	0	0	0
DMCMp-1	23	0	0	0	0	0
DMCMp-2	7	0	0	0	0	0

Os resultados negativos podem estar associados à ausência de alguns metabólitos específicos nos extratos dos calos, que, conforme visto neste trabalho, não apresentaram os mesmos sinais de deslocamento que foram evidenciados nos extratos das folhas da planta. Martins (2014), através de avaliações antibacterianas com extratos de folhas e galhos de *Duroia macrophylla*, obteve resultados positivos em testes antioxidantes, testes de toxicidade frente *Artemia salina* e em testes antibacterianos (bacteriostáticos) contra as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Flavobacterium corumnare*, *Nocardia brasiliensis*, *Salmonella enteritidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que foram identificados alcaloides e terpenos através de RMN, os mesmos encontrados nos espectros de RMN de folhas neste trabalho, mas não nos extratos dos calos.

As atividades químicas e biológicas, apresentadas em extratos e metabólitos da espécie *Duroia macrophylla in natura*, pode ser expressa em extratos de calos, uma vez que seja induzida a produção dos metabólitos bioativos *in vitro*, o que não foi evidenciado neste trabalho.

6. CONCLUSÃO

Os dois indivíduos de *Duroia macrophylla* estudados apresentaram indícios da presença de alcaloides e terpenos em todos os meses, durante um ano, tanto nos extratos hexânicos como nos extratos metanólicos, apresentando variação apenas na intensidade dos sinais de RMN, provavelmente relacionado à quantidade dos metabólitos presentes.

A análise de componentes principais demonstrou variação sazonal na composição química dos extratos hexânicos de folhas de *Duroia macrophylla*, relacionada à intensidade relativa dos metabólitos de interesse, principalmente os alcaloides, onde a produção de alcaloides aumentou de acordo com a intensidade de chuvas. Em relação aos extratos metanólicos das folhas, houve diferenças na composição química que devem estar associadas a outras substâncias que não sejam as de interesse para este trabalho. Para estes extratos, o mês de novembro apresentou significativo menor teor de alcaloides em relação aos outros meses, para os dois indivíduos estudados. Como no extrato hexânicos houve um aumento do teor de alcaloides, pode-se inferir que a planta está redirecionando a sua rota biossintética para a produção de alcaloides menos polares ou ainda outros metabólitos, principalmente durante o mês de novembro, período em que ocorre a floração da espécie.

O estabelecimento *in vitro* de calos de *Duroia macrophylla*, a partir de explantes foliares jovens, foi possível com a combinação de uma pré-desinfestação com imersão em fungicida, atingindo 50% de eficiência. Ainda é preciso adequar o protocolo de desinfestação para um rendimento maior de explantes assépticos.

A indução de calos *in vitro* de *Duroia macrophylla* é possível a partir da combinação de 2,4-D e CIN, apresentando calos multiformes. Calos de *D. macrophylla*, sob esta condição, produzem terpenos, mas não produzem alcaloides, e não apresentam atividade tóxica, antioxidante e antibacteriana para as bactérias testadas.

Algumas substâncias encontradas em extratos da planta não foram constatadas nos extratos dos calos. Com isso, outros estudos são necessários para induzir a produção de alcaloides em calos de *D. macrophylla*; onde o uso de

elicitores ou outros métodos, como a alteração na composição do meio de cultura, possam induzir a produção destes metabólitos de interesse nos calos.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.L.; DINIZ, J.D.N.; OLIVEIRA, A.B.; HERNANDEZ, F.F.F. Propagação *in vitro* de *Mussaenda* (*Mussaenda erythrophylla* cv. Rosea). **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 40, n. 2, p. 206-212, abr./jun., 2010.
- ANDRADE, S.R.M.de; PINTO, A.C.Q.; FALEIRO, F.G.; CORDEIRO, M.C.R.; RAMOS, V.H.V.; TEIXEIRA, J.B. Desenvolvimento e avaliação de protocolos para descontaminação de explantes de mangueira visando à micropropagação. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 153**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 1 ed., 2005.
- ANDRE, A.C.G.M.; DIAS, D.A.; PEREIRA, P.S.; ABREU, L.C.P.; FRANÇA, S.C. Estudo comparativo da produção de metabólitos secundários em cultura de células e na planta *in natura* de *Gomphrena globosa* (Amaranthaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, supl. 2, p. 22-24, 2003.
- AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; TAPIA, M.; LAURO, M.R.; RASTRELLI, L. New 3-Methoxyflavones, and Iridoid Lactone and a Flavonol from *Duroia hirsuta*. **Journal of Natural Products**, vol. 62, n. 4, 1999.
- BARBOSA, M.R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, C.; CABRAL, E.; JARDIM, J.G.; PEREIRA, M.S.; CALIÓ, M.F.; PESSOA, M.C.R.; SALAS, R.; SOUZA, E.B.; DiMAIO, F.R.; MACIAS, L.; ANUNCIAÇÃO, E.A.; GERMANO FILHO, P.; OLIVEIRA, J.A. *et al.* Rubiaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210>>. Acesso em: 14 Abr. 2015.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29(1), p.113-23, 2006.
- BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.daS. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, vol. 32, n. 3, 2009.
- BATISTA, J.C.; SANTIN, S.M.deO.; SCHUQUEL, I.T.A.; ARRUDA, L.L.M.de; BERSANI-AMADO, C.A.; OLIVEIRA, C.M.A.de; KATO, L.; FERREIRA, H.D.; SILVA, C.C.da. Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Quim. Nova**, v. 37, n. 4, p.638-642, 2014.
- BESSE, I.; VERDEIL, J.L.; DUVAL, Y.; SOTA, B.; MALDNEY, R.; MIGIRIAC, E. Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) clonal fidelity: endogenous cytokinins and indolacetic acid in embryogenic callus cultures. **Journal of Experimental Botany**, v. 43, 1992.

- BHOJWANI, S.S.; DANTU, P.K. **Plant Tissue Culture: An Introductory Text.** Springer India, 2013
- BREMER, B.; JANSEN, R.K.; OXELMAN, B.; BACKLUND, M.; LANTZ, H.; KIM, K.J. More characters and more taxa for a robust phylogeny-case study from the coffee family (Rubiaceae). **Syst Biol.**, v. 48, 1999.
- BROWN, G.; EDE, R.M.; SIMOLA, L.K.; LEMMETYENEN, J. Lignins released from *Picea abies* suspension cultures – true native spruce lignina? **Phytochem.**, v. 29, p. 2535-2538, 1990.
- CALIXTO, J.B. **Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais.** In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Editora Argós, 2001. 523p.
- CAMPOS, M.T.V.; BRITO, J.M. Rubiaceae. In: RIBEIRO, J.E.L.S.; et al. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.** Manaus: INPA, 1999. 798p.
- CANHOTO, J.M. **Biotechnology Vegetal: da Clonagem de Plantas à Transformação Genética.** Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.
- CASTRO, H.G.; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais Metabólitos Secundários.** Visconde do Rio Branco: Suprema, 2. ed., 2004. 113 p.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21 (1), 1998.
- CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.
- CHAKRABORTY, N.; BANERJEE, D.; GHOSH, M.; PRADHAN, P.; GUPTA, N.S.; ACHARYA, K.; BANERJEE, M. Influence of plant growth regulators on callus mediated regeneration and secondary metabolites synthesis in *Withania somnifera* (L.) Dunal. **Physiol Mol Biol Plants**, v. 19, January–March, 2013.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard.** Franklin Lakes, NJ: CLSI; 8 ed., 2003. (CLSI document M2-A8 CLSI).
- COELHO, V.P.M.; AGRA, M.F.; BARBOSA, M.R.V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlttdl.) K. Schum. (Rubiaceae). **Ver Bras Farmacogn.**, v. 16 (2), 2006.

- CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug Discovery. **Phytoter. Res.**, v. 15, p.183-205, 2001.
- COSTA, A.S. Micropropagação de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. **Anais: III Ciclo de Palestras sobre Cultivo *in vitro* de Plantas**, Aracaju: Embrapa, 2012.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.
- CUI, X.; CHAKRABARTY, D.; LEE, E.; PAEK, K. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 101 (12), p. 4708–4716, 2010.
- CUNHA, A.P.; SALGUEIRO, I.; ROQUE, O.R. Alcaloides – Aspectos gerais. In: **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.
- DELPRETE, P.G. **Flora dos Estados de Goiás e Tocantins**: Parte 1: Introdução, Gênero AH. Goiânia: Coleção Rizzo, p.1-580, 2010.
- DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation – Technology and application**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991.
- DELBONI, C.A.C; LANDO, R.L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. IN: Congresso de Educação do norte pioneiro, Jacarezinho, 2010. **Anais...** UENP – Universidade Estadual do Norte do Paraná, p. 396-404, 2010.
- DEWICK, P.M. **Medicinal natural products : a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 2002.
- DICOSMO, F.; TOWERS, G.H.N. Stress and secondary metabolism. **Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1085-1097, 1995.
- DUDIENAS, C.; CASTRO, J.L.; ITO, M.F.; SOAVE, J.; MAEDA, J.A. Efeito de fungicidas na produção, sanidade e qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.15, n.1, p.20-24, 1990.
- ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1998.
- ESTEVES, D.; SOARES, N.R.; SANTOS, M.P. dos; OKI, Y.; FERNANDES, G.W. Fungos endofíticos como mediadores na relação entre *Baccharis dracunculifolia* e herbívoros no Parque Nacional da Serra do Cipó, MG. **Anais: VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, 2007.

- EVANS, W.C. **Trease & Evan's pharmacognosy**. London: W. B. Saunders, 14 ed., 1996.
- FEHE'R, A.; PASTERNAK, T.P.; DUDITS, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 74, 2003.
- FERNANDES, R.S.; LOURENÇO, M.V.; MIRANDA, C.E.S.; FRANÇA, S.deC.; JANUÁRIO, A.H. Validação do método de extração e quantificação de 7-hidróxi- 4',6-dimetóxi-isoflavona em culturas de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata*. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v.34, n.1, 2009.
- FERRI, M.; DIPALO, S.C.F.; BAGNI, N.; TASSONI, A. Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. **Food Chemistry**, v. 124, n. 4, p. 1473-1479, 2011.
- FIGUEIREDO, A.S.G. **Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos**. Dissertação de mestrado, Ribeirão Preto: USP, 2010.
- FLICK, C.E.; EVANS, D.A.; SHARP, W.R. Organogenesis. In: EVANS, D.A.; SHARP, W.R.; AMMIRATO, P.V.; YAMADA, Y. **Handbook of Plant Cell Culture**. New York, Mac Millan, 1: 13-81, 1983.
- FORBES, V.E.; FORBES, T.L. **Ecotoxicology in theory and practice**. Londres: Chapman and Hall, 1994.
- FREITAS NETO, O.G.S. **Micropropagação e anatomia foliar de canela-de-ema (*Vellozia flavicans* Mart. ex Schult f.-Velloziaceae) em diferentes condições ambientais**. Dissertação de mestrado - Universidade de Brasília, Departamento de Botânica. Disponível em <<http://hdl.handle.net/10482/4450>> . 2009.
- FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 18(4), Out./Dez., 2008.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Mediciniais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.374-381, 2007.
- GOLLE, D.P.; REINIGER, L.R.S.; BELLÉ, R.A.; CURTI, A.R. Desinfestação superficial de explantes isolados de ramos semilenhosos e herbáceos de *Eugenia involucrata* (Myrtaceae). **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 77-82, jan./mar., 2013.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RUHSAM, M.; BRIDSON, D.M.; DAVIS, A.P. World checklist of Rubiaceae. The Trustees of the Royal Botanic Gardens. In:

- MARINERO, F. E. C., RODRIGUES, W. A., CERVI, A. C. *Manettia* (Rubiaceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 3, 2012.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (ed.). **Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas**. Brasília: ABCTP/EMBRAPA-CNPH, 99-169, 1990.
- GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M.A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, DF: Embrapa-SPI/Embrapa- CNPH, v. 1, p.183-260, 1998.
- GUEYE, B.; SAID-AHMED, H.; MORCILLO, F.; BORGEL, A.; SANÉ, D.; HILBERT, J.-L.; VERDEIL, J.-L.; BLERVACQ, A.-S. Callogenesis and rhizogenesis in date palm leaf segments: are there similarities between the two auxininduced pathways? **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 98, n.1, p. 47-58, 2009.
- GUR, S.; TURGUT-BALIK, D.; GUR, N. Antimicrobial activities and some fatty acids of turmeric, ginger root and linseed used in the treatment of infectious diseases. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 2, p. 439-442, 2006.
- HARIDASS, S.; SEKAR, S.; VIJAVAN, R.; JAYAKUMAR, S.; THTMIZHARASU, S.; KRISHNAMURTHY, V.; CHIDAMBARAM, S.B. Relative antioxidant and cytotoxic activities of *Ixora coccinea* flower extracts. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5 (3), p. 1403-1408, 2012.
- HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, 6 ed., 2007.
- HERRMANN, K.M. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. **Plant Cell**, v. 7, p.907-919,1995.
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Índice pluviométrico. Disponível em <<http://www.inpe.br/>>. Acesso em dezembro de 2014.
- KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses, **Antiviral Research**, v. 67, n. 2, p.107–119, 2005.
- KHANAM, N.; KHOO, C.; CLOSE, R.; KHAN, A.G. Tropane alkaloid production by shoot culture of *Duboisia myoporoides* R. Br. **Phytochemistry**, v. 56(1), p. 59-65, 2001.
- KOKOTKIEWICZ, A.; LUCZKIEWICZ, M.; SOWINSKI, P.; GLOD, D.; GORYNSKI, K.; BUCINSKI, A. Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and *in vitro* cultures. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1373-1382, 2012.

- LLOYD, G., McCOWN, B. Commercially feasible micropropagation of montain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **Com. Proc. Int. Plant Prop. Soc.**, v.30, p.421-327,1981.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2-3, p.189–196, 2001.
- MACIEL, A.L.R.; PASQUAL, M.; PEREIRA, A.R.; REZENDE, J.C. de; SILVA, A.B. da; DUTRA, L.F. Embriogênese somática indireta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. CV. Obatã. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.27, n.1, 2003.
- MAHANTHESH, M.C.; MANJAPPA, A.S.; SHINDHE, M.V.; JAMKHANDI, C.M.; JALAPURE, S.S.; PATIL, S.S. *Morinda citrifolia* Linn: a medicinal plant with diverse phytochemicals and its medicinal relevance. **Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3 (1), p. 215-232, 2014.
- MAHENDRAN, G. **Micropropagation, phytochemistry and pharmacological screening of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. Clarke – A traditional folklore medicinal plant.** Tese de doutorado. Bharathiar University: Tamil Nadu, India, 2013.
- MANTELL, S.H.; MATTHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução à engenharia genética em plantas.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994.
- MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P.; SICA, A.; BALKWILL, F. Cancer related inflammation. **Nature**, v. 454, p. 436–444, 2008.
- MARTINS, D. Estudo químico e biológico de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). Tese de doutorado, Manaus: UFAM, 2014.
- MARTINS, D.; CARRION, L.L.; RAMOS, D.F.; SALOMÉ, K.S.; SILVA, P.E.A.da; BARISON, A.; NUNEZ, C.V. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **BioMed Research International**, v. 2013.
- MARTINS, D.; FACHIN-ESPINAR, M.T.; OLIVEIRA, T.A.; LIMA, K.C.S.; CAVALCANTI, R.M.; TELES, B.R.; NUNEZ, C.V. Estudio químico y biológico de *Duroia macrophylla*. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research**, v. 2 (6), p. 158-171, 2014.
- McCUCHEON, T.L.; CARROLL, G.C.; SCHWAB, S. Genotypic diversity in populations of a fungal endophytic from douglas fir. **Mycologia**, v. 85, p. 180-186, 1993.
- MEDINA, A.M.; CASAS, J.L. *In vitro* multiplication and essential oil composition of *Thymus moroderi* Pau ex. Martinez, an endemic Spanish plant. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 120, p.99–108, 2014.

- MELLO, M.O.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Bauhinia forficata link shoot regeneration: histological analysis of organogenesis pathway. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43 (4), 2000.
- MEYER, B.N.; FERRIGINI, N.R.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n.8, p. 31 – 34, 1982.
- MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAN, J.E., JACOBSEN, L.B., NICHOLS, D.E., MCLAUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
- MIURA, Y.; HIRATA, K. An organ culture of *Catharanthus roseus* capable of producing substantial amount of indole alkaloids. **Eur. Pat. Appl.**, 1986.
- MIZUKAMI, H.; TABIRA, Y.; ELLIS, B.E. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. **Plant Cell Rep.**, v. 12, p. 706–709, 1993.
- MORAIS, F.L. **Cultivo celular in vitro de *Minuartia guianensis***. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia –INPA, 2015. (Comunicação oral)
- MORENO, P.R.H.; VAN DER HEIJDEN, R.; VEERPORTE, R. Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*. **Plant Cell Tiss. Org. Cult.**, v. 42, p.1-25, 1995.
- MORENO, B.P.; FIORUCCI, R.; LOPES, L.; BARROTT DO CARMO, M.R.; SARRAGIOTTO, M.H.; BALDOQUI, D.C. Terpenoids and a coumarin from aerial parts of *Psychotria vellosiana* Benth. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 56, p. 80-82, 2014.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, n.15, p.473- 497, 1962.
- NASCIMENTO, J.M. ***Duroia* L.f. (Gardenieae-Rubiaceae) na Amazônia brasileira**. Dissertação de mestrado, Belém: UFRA, 2013.
- NASCIMENTO, J.M.; SANTOS, J.U.M.; CARDOSO, E.A.; HARADA, A.Y. *Duroia* L. F.(Rubiaceae Juss.) mimercófitas na Amazônia brasileira. IN: **Anais...** 64º Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2013. Disponível em <<http://www.botanica.org.br/trabalhos-cientificos/64CNBot/resumo-ins19888-id6529.pdf>> , acesso em julho de 2015.
- NARANJO, E.J.; URREA, A.I.; ATEHORTUA, L. Avances en la propagación vía embriogénesis somática de *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes, planta medicinal en peligro crítico. **Rev. colomb. Biotecnol** , Bogotá, v.16, n.1, 2014.

- NARAYANASWAMY, S. Regeneration of plants from tissue cultures. In: REINERT, J.; BAJAJ, Y.P.S. **Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture**. Berlin: Springer-Verlag, Cap. 10, p.179-206, 1977.
- NOVAES, J.A. **Desenvolvimento e validação de método para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais secos**. Dissertação de Mestrado - Universidade do Estado do Amazonas, 2007.
- NUNEZ, C.V.; ROUMY, V.; MESQUITA, D.W.O.; MESQUITA, A.S.S.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; HENNEBELLE, T. Indole alkaloids from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Med.**, v. 78, 2012.
- NUNEZ, C.V.; VASCONCELOS, M.C. Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*. **Patente**: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2012.
- OLIVEIRA, A.J.B.; KOIKE, L.; SHEPHERD, S.K.L.; REIS, F.A.M. Callus culture of *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg.: growth and alkaloid production. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 609-612, 2002.
- OLIVEIRA, P.L.de. **Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* Aubl.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química. Goiânia, 2009.
- OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.
- PARANHOS, A. Cultura de células e tecidos vegetais in vitro: uma fonte alternativa de metabólitos secundários. In: **Farmacognosia e fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, cap. 5, 2005.
- PAREKH, J.; CHANDA, S.V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turk J. Biol.**, v. 31, p. 53-58, 2007.
- PASQUAL, M. **Textos acadêmicos**: meios de cultura. Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127p.
- PELCZAR, J.J.M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. São Paulo: MAKRON books, v.1, 2 ed., 1996.
- PELLETIER, S.W. **Alkaloids chemical and biological perspectives**. V. 1-6. New York: Willey, 1988.
- PEREIRA, R.C.A. **Micropropagação, indução de calos, características anatômicas e monitoramento dos biomarcadores de *Uncaria romentosa***

Willdenow Ex. Roemer & Schultes DC e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmelin (Unha de Gato). Tese de doutorado, Lavras: UFLA, 2004.

- PEREIRA, R.C.A.; PINTO, J.E.B.P.; REIS, E.S.; CORRÊA, R.M.; BERTOLLUCI, S.K.V. Influência de diferentes auxinas na indução e cinética de crescimento de calos de *Uncaria guianensis* J. F. GMel. (Unha de gato). **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.3, n.2, p. 69-77, 2007.
- PHILLIPSON, G.W.; ANDERSON, A.C. **J. Ethnopharmacol.**, vol. 25, p. 61, 1998.
- PIERIK, R.L.M. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Martins: Nijoff, 1990.
- PIMENTEL, I.C.; KUCZKOWSKI, F.R.; CHIME, M.A.; AUER, C.G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-marte (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hill.). **Floresta**, Curitiba, v. 36, n. 1, jan./abr., 2006.
- PIMENTEL, F.A.; ALMEIDA, M.F.L.de. Fitoquímica. In: **Química verde no Brasil: 2010-2030.** Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2010.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, supl. 1, 2002.
- PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K.J. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.
- RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n.1, p.522-531, 2002.
- REGALADO, J.J.; CARMONA-MARTIN, E.; CASTRO, P.; MORENO, R.; GIL, J.; ENCINA, C.L. Micropropagation of wild species of the genus *Asparagus* L. and their interspecific hybrids with cultivated *A. officinalis* L., and verification of genetic stability using EST-SSRs. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.**, v. 120, jan., 2015.
- ROCA, W.; MROGINSK, L.A. **Cultivo de tecidos em la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, 1991.
- SÁ, P.G.S.de; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.de; SIQUEIRA FILHO, J.A.de; FONTANA, A.P.; DAMASCENO, P.K.F.; BRANCO, C.R.C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 33(4), p.561-566, 2012.

- SANTOS, A.S.; ARAÚJO, S.F.; GOULART, H.F.; CAETANO, L.C.; ARRUDA, M.S.P.; SANTOS, L.S.; SANTA´ANA, A.E.G. A dehydrorotenoid produced by callus tissue culture and wild plant roots of *Boerhaavia coccinea*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, p. 538-541, 2007.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 6 ed., 2007.
- SARAIVA, R.M.C. **Atividade antibacteriana de plantas medicinais frente à bactérias multirresistentes e a sua interação com drogas antimicrobianas**. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia. Belém, 2012.
- SCALIZE, F.E. **Indução e detecção de azadiractina em calos de *Azadirachta indica* Adr. Juss. (Nim)**. Dissertação de mestrado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003.
- SEN, S.; ROY, B.; FAROOQUI, N.A. Pharmacological evaluation of ethanolic extract of *Rubia cardifolia*. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 3 (2), p. 247-250, 2012.
- SIERRA, M.I. **Aspects if índole alkaloid accumulation in *Tabernae montana* tissue cultures: differentiation, peroxidases and stability**. Tese de doutorado. Leiden: Leiden Universiteit, 1991.
- SILVA, F.G.; JANUÁRIO, A.H.; PINTO, J.E.B.P.; NASCIMENTO, V.E.; BARIZAN, W.S.; FRANÇA, S.C. Teor de flavonas e de ácido 3,5-o-dicafeoilquínico em calos e em plantas in vitro e in vivo de carqueja [*Baccharis trimera* (Less) DC.]. **Plant Cell Cult. Micropropag.**, Lavras, v.5, n.1, p. 42-49, 2009.
- SILVESTRINI, A.; PASQUA, G.; BOTTA, B.; MONACELLI, B.; VAN DER HEIJDEN, R.; VERPOORTE, R. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p. 749-753, 2002.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v. 15(1), p.71-81, 2002.
- SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L.R. **Tecnologia de Aplicação de Fungicidas**. Bento Gonçalves: EMBRAPA Uva e Vinho. 2014. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/viticultura/fungici.html>> . Acesso em 19 de março de 2015.
- STELLA, A.; BRAGA, M.R. Callus and cell suspension cultures of *Rudgea jasminoides*, a tropical woody Rubiaceae. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 68, p.271–276, 2002.
- TAYLOR, C.M. **Rubiaceae Neotropical: um agrupamento diverso**. Manaus, AM: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2014. (Comunicação oral).

- TAYLOR, C.M.; STEYERMARK, J.A.; DELPRETE, P.; PERSSON, C.; COSTA, C.; VICENTINI, A.; CORTÉS, R. **Rubiaceae**. In: STEYERMARK, J. A.; et al. Flora of the Venezuelan Guayana . 8 ed: 497-847, 2004.
- TAYLOR, C.M.; CAMPOS, M.T.V.A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v. 58 (3), p.549-616, 2007.
- TORRES, C.T.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA/CNPH, v. 1, 1998.
- TRÓPICOS. Missouri Botanical Garden – MOBOT. **Família Rubiaceae**. Disponível em <<http://www.tropicos.org/name/42000315>>. Acesso em 13 de março de 2015.
- WAGNER, H.M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. New York: Springer-Verlag, 1984. 320p.
- WERNER, E.T.; CUZZUOL, G.R.F.; PESSOTTI, K.V.; LOPES, F.P.; ROGER, J.A. Controle da calogênese do pau-brasil *in vitro*. **Revista Árvore**, v. 33, n. 6, p. 987-996, 2009.
- YOSHIMATSU, K. Tissue culture of medicinal plants: micropropagation, transformation and production fo useful secondary metabolites. **Elsevier**, v. 34, p.647-752, 2008.
- ZAPPI, D. *Duroia*. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB024436>>, acesso em dezembro de 2013.

8. ANEXOS

Anexo 01. Tabela de sinais (intensidade x deslocamento) das ressonâncias magnéticas nucleares dos extratos hexânicos das folhas de dois indivíduos (A e B) de *Duroia macrophylla*, dos meses de fevereiro/2014 (2), maio/2013 (5), agosto/2013 (8) e novembro/2013 (11).

Anexo 02. Tabela de sinais (intensidade x deslocamento) das ressonâncias magnéticas nucleares dos extratos metanólicos das folhas de dois indivíduos (A e B) de *Duroia macrophylla*, dos meses de fevereiro/2014 (2), maio/2013 (5), agosto/2013 (8) e novembro/2013 (11).

Anexo 01

	12,66	12,64	9,77	9,76	9,62	9,60	9,53	9,49	9,46	9,39	9,35	9,32	8,63	8,61	8,56	8,49	8,10	8,07	8,05	8,02
2AH-1	0,0008	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0006	0,0010	0,0000	0,0000
2AH-2	0,0010	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0018	0,0006	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0012	0,0013	0,0000	0,0000
2AH-3	0,0011	0,0000	0,0006	0,0010	0,0000	0,0000	0,0018	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0013	0,0013	0,0000	0,0000
2BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0028	0,0006	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0007
2BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0005	0,0030	0,0008	0,0000	0,0027	0,0005	0,0000	0,0006	0,0000	0,0025	0,0006	0,0000	0,0000	0,0008	0,0008
5AH-1	0,0010	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0010	0,0011	0,0000	0,0000
5AH-2	0,0012	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0012	0,0014	0,0000	0,0000
5AH-3	0,0019	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0016	0,0016	0,0000	0,0000
5BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0030	0,0007	0,0000	0,0030	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0027	0,0007	0,0000	0,0000	0,0010	0,0010
5BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0029	0,0009	0,0000	0,0030	0,0006	0,0005	0,0000	0,0000	0,0026	0,0008	0,0000	0,0000	0,0010	0,0011
5BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0028	0,0007	0,0000	0,0029	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0025	0,0006	0,0000	0,0000	0,0008	0,0008
8AH-1	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0017	0,0000	0,0000
8AH-2	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0014	0,0000	0,0000
8AH-3	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0017	0,0000	0,0000
8BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0007	0,0008	0,0000	0,0000
8BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0006	0,0007	0,0000	0,0000
11AH-1	0,0038	0,0006	0,0009	0,0014	0,0008	0,0008	0,0019	0,0010	0,0007	0,0018	0,0005	0,0000	0,0007	0,0007	0,0015	0,0005	0,0027	0,0030	0,0000	0,0006
11AH-2	0,0031	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0019	0,0022	0,0000	0,0000
11AH-3	0,0033	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0014	0,0006	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0019	0,0023	0,0000	0,0000
11BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0013	0,0007	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010
11BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000
11BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	6,79	6,65	6,63	6,61	6,47	6,46	6,45	6,44	6,37	6,36	6,35	6,33	6,32	6,27	6,21	6,20	6,17	6,16	6,15	6,07
2AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0006	0,0000	0,0008	0,0009	0,0000	0,0006	0,0024	0,0000	0,0005	0,0000	0,0008	0,0013	0,0000
2AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0010	0,0011	0,0000	0,0014	0,0000	0,0011	0,0000	0,0026	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0008
2AH-3	0,0000	0,0006	0,0000	0,0007	0,0007	0,0000	0,0009	0,0011	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0011	0,0027	0,0010	0,0000	0,0012	0,0000	0,0014	0,0006
2BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0038	0,0010	0,0000	0,0000	0,0012	0,0016	0,0000
2BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0043	0,0015	0,0000	0,0000	0,0018	0,0022	0,0000
2BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0008	0,0000	0,0017	0,0043	0,0015	0,0000	0,0000	0,0019	0,0022	0,0000
5AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0008	0,0009	0,0010	0,0012	0,0000	0,0000	0,0004	0,0018	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0011	0,0000
5AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0009	0,0010	0,0011	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0007	0,0021	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0006
5AH-3	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0011	0,0000	0,0013	0,0013	0,0014	0,0016	0,0000	0,0009	0,0000	0,0023	0,0009	0,0000	0,0012	0,0000	0,0014	0,0007
5BH-1	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	0,0047	0,0019	0,0000	0,0000	0,0022	0,0021	0,0000
5BH-2	0,0012	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0021	0,0000	0,0047	0,0019	0,0000	0,0000	0,0025	0,0024	0,0000
5BH-3	0,0010	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0019	0,0045	0,0017	0,0000	0,0000	0,0022	0,0023	0,0000
8AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0013	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000
8AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0009	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0012	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0007	0,0000	0,0019	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0005
8BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0006	0,0017	0,0006	0,0000	0,0007	0,0000	0,0008	0,0000
11AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0024	0,0024	0,0000	0,0026	0,0019	0,0000	0,0012	0,0027	0,0000	0,0011	0,0000	0,0013	0,0017	0,0000
11AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0016	0,0000	0,0015	0,0011	0,0000	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0009	0,0000
11AH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0018	0,0000	0,0019	0,0015	0,0000	0,0007	0,0022	0,0000	0,0007	0,0000	0,0009	0,0014	0,0000
11BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0021	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000
11BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0019	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000
11BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	5,88	5,84	5,79	5,72	5,61	5,56	5,53	5,48	5,44	5,40	5,39	5,38	5,37	5,36	5,35	5,34	5,33	5,30	5,27	5,24
2AH-1	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0028	0,0000	0,0000	0,0000	0,0025	0,0064	0,0080	0,0133	0,0109	0,0107	0,0052	0,0014	0,0000	0,0007
2AH-2	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0037	0,0000	0,0000	0,0040	0,0000	0,0083	0,0098	0,0150	0,0125	0,0000	0,0067	0,0000	0,0000	0,0021
2AH-3	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0019	0,0040	0,0000	0,0000	0,0042	0,0000	0,0099	0,0000	0,0151	0,0120	0,0000	0,0061	0,0021	0,0000	0,0024
2BH-1	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000	0,0034	0,0000	0,0083	0,0102	0,0173	0,0151	0,0000	0,0074	0,0018	0,0000	0,0008
2BH-2	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0038	0,0000	0,0000	0,0000	0,0051	0,0101	0,0121	0,0190	0,0164	0,0000	0,0089	0,0000	0,0000	0,0021
2BH-3	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0038	0,0000	0,0000	0,0045	0,0000	0,0092	0,0112	0,0181	0,0150	0,0159	0,0083	0,0023	0,0000	0,0022
5AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0000	0,0058	0,0099	0,0080	0,0079	0,0037	0,0008	0,0000	0,0005
5AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0067	0,0105	0,0086	0,0083	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014
5AH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0014	0,0027	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0073	0,0111	0,0089	0,0086	0,0044	0,0000	0,0000	0,0018
5BH-1	0,0000	0,0012	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0032	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0134	0,0161	0,0236	0,0200	0,0000	0,0103	0,0039	0,0000	0,0036
5BH-2	0,0000	0,0013	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0030	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0239	0,0211	0,0000	0,0110	0,0040	0,0000	0,0037
5BH-3	0,0000	0,0010	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0224	0,0197	0,0186	0,0102	0,0037	0,0000	0,0031
8AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042	0,0071	0,0060	0,0000	0,0028	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0067	0,0056	0,0057	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0043	0,0070	0,0057	0,0057	0,0026	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0020	0,0057	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0052	0,0062	0,0108	0,0096	0,0000	0,0051	0,0000	0,0009	0,0013
8BH-2	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000	0,0051	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0073	0,0119	0,0101	0,0101	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022
8BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0054	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0111	0,0095	0,0000	0,0050	0,0000	0,0000	0,0020
11AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0017	0,0032	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0064	0,0098	0,0082	0,0084	0,0045	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0046	0,0083	0,0068	0,0070	0,0032	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0050	0,0086	0,0075	0,0079	0,0040	0,0000	0,0000	0,0006
11BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0026	0,0000	0,0066	0,0020	0,0030	0,0000	0,0000	0,0000	0,0089	0,0139	0,0118	0,0114	0,0064	0,0000	0,0000	0,0033
11BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0026	0,0000	0,0068	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0130	0,0115	0,0107	0,0000	0,0000	0,0000	0,0032
11BH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0058	0,0008	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0066	0,0111	0,0097	0,0095	0,0050	0,0000	0,0000	0,0014

	5,13	5,12	5,10	5,01	4,97	4,96	4,94	4,87	4,82	4,77	4,60	4,57	4,54	4,51	4,49	4,48	4,47	4,46	4,45	4,42
2AH-1	0,0000	0,1252	0,0710	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0004	0,0024	0,0018	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000
2AH-2	0,1311	0,1255	0,0745	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0027	0,0021	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AH-3	0,1310	0,1300	0,0715	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0027	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000
2BH-1	0,1245	0,1234	0,0710	0,0027	0,0000	0,0018	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0015	0,0031	0,0028	0,0000	0,0015	0,0000	0,0016	0,0000	0,0017	0,0008
2BH-2	0,1308	0,1286	0,0743	0,0024	0,0000	0,0016	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0017	0,0036	0,0031	0,0000	0,0019	0,0000	0,0000	0,0020	0,0020	0,0010
2BH-3	0,1260	0,1241	0,0708	0,0021	0,0000	0,0015	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0017	0,0035	0,0031	0,0000	0,0018	0,0000	0,0019	0,0000	0,0018	0,0010
5AH-1	0,1257	0,1279	0,0734	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0007	0,0030	0,0023	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000
5AH-2	0,1282	0,1262	0,0725	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0008	0,0030	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000
5AH-3	0,1328	0,1316	0,0733	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0010	0,0032	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000
5BH-1	0,0858	0,0845	0,0485	0,0057	0,0047	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0013	0,0017	0,0032	0,0025	0,0000	0,0022	0,0000	0,0024	0,0000	0,0000	0,0013
5BH-2	0,0889	0,0000	0,0504	0,0059	0,0000	0,0044	0,0000	0,0015	0,0000	0,0013	0,0018	0,0033	0,0027	0,0000	0,0024	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000	0,0014
5BH-3	0,0828	0,0826	0,0482	0,0057	0,0000	0,0048	0,0000	0,0013	0,0000	0,0013	0,0015	0,0031	0,0024	0,0000	0,0021	0,0000	0,0000	0,0024	0,0000	0,0013
8AH-1	0,1229	0,1219	0,0695	0,0029	0,0023	0,0016	0,0000	0,0012	0,0000	0,0007	0,0005	0,0022	0,0019	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-2	0,1232	0,1236	0,0743	0,0038	0,0000	0,0023	0,0000	0,0012	0,0000	0,0006	0,0000	0,0022	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000
8AH-3	0,1240	0,1240	0,0705	0,0031	0,0018	0,0024	0,0000	0,0012	0,0000	0,0007	0,0005	0,0022	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-1	0,0951	0,0952	0,0595	0,0085	0,0053	0,0067	0,0000	0,0017	0,0000	0,0011	0,0011	0,0030	0,0024	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-2	0,0977	0,0959	0,0552	0,0077	0,0051	0,0065	0,0000	0,0018	0,0000	0,0016	0,0015	0,0033	0,0026	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-3	0,0932	0,0000	0,0531	0,0072	0,0045	0,0057	0,0000	0,0016	0,0000	0,0013	0,0013	0,0030	0,0025	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-1	0,1206	0,1193	0,0662	0,0016	0,0009	0,0011	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0009	0,0027	0,0026	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-2	0,1179	0,1163	0,0670	0,0022	0,0000	0,0014	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0005	0,0024	0,0023	0,0000	0,0011	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-3	0,1172	0,1209	0,0712	0,0020	0,0000	0,0013	0,0000	0,0012	0,0078	0,0000	0,0006	0,0025	0,0025	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0013	0,0011	0,0000
11BH-1	0,1154	0,1148	0,0654	0,0055	0,0038	0,0048	0,0012	0,0021	0,0000	0,0011	0,0019	0,0041	0,0036	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-2	0,1133	0,1106	0,0637	0,0050	0,0000	0,0039	0,0012	0,0020	0,0000	0,0009	0,0019	0,0039	0,0034	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-3	0,1069	0,1065	0,0656	0,0054	0,0032	0,0040	0,0000	0,0018	0,0000	0,0006	0,0013	0,0034	0,0029	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	4,31	4,28	4,27	4,22	4,21	4,17	4,16	4,14	4,11	4,10	4,09	4,08	4,07	4,05	4,03	4,02	3,99	3,98	3,97	3,95
2AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0010	0,0000	0,0000	0,0012	0,0009	0,0013	0,0006	0,0026	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0010	0,0000	0,0000	0,0013	0,0014	0,0000	0,0000	0,0014	0,0014	0,0015	0,0000	0,0028	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000
2AH-3	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0014	0,0015	0,0000	0,0000	0,0015	0,0013	0,0017	0,0010	0,0036	0,0007	0,0007	0,0000	0,0000
2BH-1	0,0000	0,0005	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0006	0,0012	0,0012	0,0000	0,0007	0,0011	0,0008	0,0015	0,0007	0,0022	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-2	0,0000	0,0009	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016	0,0015	0,0000	0,0000	0,0014	0,0012	0,0019	0,0011	0,0024	0,0007	0,0007	0,0000	0,0000
2BH-3	0,0000	0,0009	0,0008	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0016	0,0015	0,0000	0,0011	0,0015	0,0011	0,0020	0,0011	0,0027	0,0008	0,0008	0,0000	0,0000
5AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0010	0,0009	0,0000	0,0013	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0004	0,0005	0,0000	0,0000
5AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0012	0,0011	0,0000	0,0015	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0007	0,0007	0,0000	0,0000
5AH-3	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0015	0,0012	0,0000	0,0016	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0008	0,0009	0,0000	0,0000
5BH-1	0,0000	0,0014	0,0013	0,0000	0,0000	0,0019	0,0018	0,0035	0,0037	0,0000	0,0020	0,0028	0,0000	0,0044	0,0024	0,0000	0,0010	0,0010	0,0000	0,0011
5BH-2	0,0000	0,0014	0,0014	0,0000	0,0000	0,0020	0,0021	0,0034	0,0036	0,0000	0,0020	0,0028	0,0000	0,0043	0,0026	0,0000	0,0011	0,0010	0,0000	0,0012
5BH-3	0,0000	0,0012	0,0012	0,0000	0,0000	0,0016	0,0017	0,0032	0,0035	0,0000	0,0019	0,0026	0,0000	0,0042	0,0023	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0010
8AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0018	0,0020	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0013	0,0006	0,0000	0,0000	0,0008	0,0007	0,0000
8AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0016	0,0018	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0012	0,0005	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000
8AH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0018	0,0019	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0012	0,0006	0,0000	0,0000	0,0007	0,0007	0,0000
8BH-1	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0048	0,0049	0,0000	0,0020	0,0016	0,0000	0,0024	0,0012	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000
8BH-2	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	0,0050	0,0053	0,0000	0,0022	0,0018	0,0000	0,0026	0,0015	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000
8BH-3	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0019	0,0047	0,0047	0,0000	0,0020	0,0017	0,0000	0,0024	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0108	0,0328	0,0330	0,0000	0,0112	0,0000	0,0000	0,0020	0,0011	0,0000	0,0007	0,0000	0,0017	0,0000
11AH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0099	0,0311	0,0320	0,0000	0,0110	0,0017	0,0000	0,0016	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000
11AH-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0097	0,0309	0,0317	0,0000	0,0109	0,0000	0,0000	0,0017	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000
11BH-1	0,0014	0,0017	0,0015	0,0000	0,0000	0,0019	0,0021	0,0043	0,0043	0,0000	0,0021	0,0022	0,0000	0,0026	0,0017	0,0000	0,0012	0,0013	0,0000	0,0010
11BH-2	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0020	0,0037	0,0038	0,0000	0,0020	0,0021	0,0000	0,0024	0,0017	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000
11BH-3	0,0009	0,0012	0,0010	0,0000	0,0000	0,0012	0,0014	0,0033	0,0032	0,0000	0,0014	0,0015	0,0000	0,0019	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	3,90	3,88	3,87	3,86	3,81	3,75	3,74	3,73	3,72	3,71	3,70	3,69	3,67	3,64	3,63	3,62	3,61	3,55	3,54	3,53
2AH-1	0,0050	0,0056	0,0052	0,0051	0,0009	0,0028	0,0000	0,0009	0,0000	0,0008	0,0000	0,0053	0,0046	0,0028	0,0011	0,0013	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000
2AH-2	0,0051	0,0059	0,0051	0,0053	0,0012	0,0031	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0053	0,0050	0,0031	0,0015	0,0018	0,0000	0,0011	0,0000	0,0013
2AH-3	0,0058	0,0064	0,0056	0,0060	0,0013	0,0037	0,0014	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0058	0,0052	0,0032	0,0014	0,0016	0,0011	0,0011	0,0000	0,0014
2BH-1	0,0000	0,0091	0,0000	0,0000	0,0014	0,0026	0,0021	0,0000	0,0016	0,0015	0,0000	0,0089	0,0071	0,0017	0,0017	0,0000	0,0017	0,0005	0,0000	0,0008
2BH-2	0,0000	0,0094	0,0000	0,0000	0,0018	0,0029	0,0024	0,0000	0,0022	0,0020	0,0000	0,0094	0,0076	0,0027	0,0022	0,0015	0,0021	0,0000	0,0000	0,0011
2BH-3	0,0000	0,0095	0,0000	0,0000	0,0018	0,0032	0,0026	0,0000	0,0020	0,0019	0,0000	0,0094	0,0077	0,0026	0,0021	0,0015	0,0022	0,0009	0,0000	0,0012
5AH-1	0,0064	0,0047	0,0064	0,0066	0,0008	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0041	0,0216	0,0015	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AH-2	0,0063	0,0049	0,0061	0,0063	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0043	0,0200	0,0017	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AH-3	0,0073	0,0056	0,0068	0,0073	0,0010	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0049	0,0228	0,0020	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007
5BH-1	0,0020	0,0098	0,0000	0,0015	0,0021	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0103	0,0380	0,0058	0,0000	0,0031	0,0000	0,0000	0,0014	0,0014
5BH-2	0,0021	0,0089	0,0000	0,0015	0,0022	0,0000	0,0023	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0099	0,0335	0,0059	0,0000	0,0033	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015
5BH-3	0,0017	0,0094	0,0000	0,0015	0,0020	0,0000	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0023	0,0095	0,0364	0,0059	0,0000	0,0033	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-1	0,0085	0,0000	0,0085	0,0092	0,0005	0,0000	0,0009	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0022	0,0019	0,0026	0,0008	0,0012	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-2	0,0078	0,0000	0,0079	0,0082	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0020	0,0017	0,0024	0,0007	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-3	0,0090	0,0000	0,0088	0,0100	0,0004	0,0000	0,0008	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0022	0,0018	0,0025	0,0008	0,0012	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-1	0,0030	0,0038	0,0031	0,0031	0,0009	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0039	0,0038	0,0061	0,0000	0,0032	0,0000	0,0008	0,0000	0,0009
8BH-2	0,0035	0,0045	0,0035	0,0032	0,0013	0,0000	0,0015	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0045	0,0041	0,0061	0,0000	0,0034	0,0000	0,0000	0,0012	0,0012
8BH-3	0,0031	0,0040	0,0031	0,0028	0,0012	0,0000	0,0013	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0041	0,0039	0,0061	0,0000	0,0031	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000
11AH-1	0,0125	0,0081	0,0117	0,0132	0,0016	0,0009	0,0029	0,0000	0,0027	0,0015	0,0000	0,0058	0,0030	0,0029	0,0026	0,0000	0,0029	0,0000	0,0006	0,0000
11AH-2	0,0114	0,0072	0,0109	0,0124	0,0012	0,0000	0,0023	0,0000	0,0020	0,0009	0,0000	0,0054	0,0025	0,0024	0,0022	0,0000	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-3	0,0111	0,0072	0,0108	0,0119	0,0014	0,0000	0,0024	0,0000	0,0023	0,0012	0,0000	0,0056	0,0029	0,0026	0,0024	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-1	0,0021	0,0043	0,0000	0,0018	0,0015	0,0000	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0045	0,0040	0,0053	0,0000	0,0030	0,0018	0,0014	0,0000	0,0016
11BH-2	0,0019	0,0036	0,0000	0,0016	0,0013	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0040	0,0039	0,0053	0,0000	0,0030	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-3	0,0012	0,0032	0,0000	0,0010	0,0007	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0034	0,0033	0,0049	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008

	3,52	3,49	3,43	3,42	3,40	3,39	3,32	3,28	3,27	3,26	3,25	3,24	3,23	3,21	3,13	3,11	2,99	2,93	2,86	2,83
2AH-1	0,0010	0,0005	0,0000	0,0000	0,0038	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0034
2AH-2	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0040	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0044	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0042
2AH-3	0,0000	0,0045	0,0007	0,0000	0,0043	0,0011	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0047	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0044
2BH-1	0,0000	0,0009	0,0011	0,0010	0,0068	0,0000	0,0000	0,0012	0,0014	0,0010	0,0000	0,0073	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0043
2BH-2	0,0000	0,0011	0,0016	0,0015	0,0070	0,0016	0,0000	0,0000	0,0017	0,0015	0,0000	0,0078	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0052
2BH-3	0,0000	0,0011	0,0016	0,0014	0,0071	0,0017	0,0005	0,0000	0,0017	0,0015	0,0000	0,0077	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0048
5AH-1	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0028	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0032	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021
5AH-2	0,0005	0,0008	0,0000	0,0000	0,0029	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0033	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0026
5AH-3	0,0000	0,0038	0,0000	0,0000	0,0033	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0037	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0028
5BH-1	0,0000	0,0034	0,0000	0,0000	0,0076	0,0020	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0084	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0075
5BH-2	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0074	0,0022	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0081	0,0000	0,0000	0,0010	0,0010	0,0008	0,0009	0,0000	0,0080
5BH-3	0,0013	0,0013	0,0000	0,0000	0,0072	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0081	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0069
8AH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0015	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0018	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017
8AH-2	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015
8AH-3	0,0000	0,0000	0,0004	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0016
8BH-1	0,0000	0,0035	0,0005	0,0000	0,0028	0,0007	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0033	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0026
8BH-2	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0032	0,0012	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0039	0,0000	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0037
8BH-3	0,0010	0,0012	0,0000	0,0000	0,0030	0,0010	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0035	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0031
11AH-1	0,0000	0,0008	0,0019	0,0018	0,0043	0,0013	0,0000	0,0000	0,0022	0,0020	0,0000	0,0047	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-2	0,0000	0,0000	0,0014	0,0013	0,0038	0,0009	0,0000	0,0000	0,0017	0,0013	0,0000	0,0042	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013
11AH-3	0,0000	0,0006	0,0015	0,0015	0,0041	0,0012	0,0000	0,0000	0,0018	0,0017	0,0000	0,0044	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015
11BH-1	0,0000	0,0014	0,0013	0,0000	0,0030	0,0013	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0038	0,0000	0,0018	0,0015	0,0011	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0041
11BH-2	0,0015	0,0014	0,0000	0,0000	0,0029	0,0013	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0034	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0041
11BH-3	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0029

	2,81	2,79	2,77	2,75	2,74	2,72	2,71	2,70	2,69	2,68	2,67	2,64	2,60	2,57	2,55	2,54	2,53	2,52	2,51	2,48
2AH-1	0,0078	0,0061	0,0034	0,0025	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0015	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AH-2	0,0085	0,0070	0,0044	0,0033	0,0000	0,0000	0,0017	0,0021	0,0000	0,0000	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
2AH-3	0,0088	0,0072	0,0045	0,0032	0,0000	0,0018	0,0000	0,0020	0,0000	0,0019	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-1	0,0092	0,0073	0,0047	0,0033	0,0000	0,0000	0,0028	0,0000	0,0034	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-2	0,0101	0,0085	0,0056	0,0039	0,0000	0,0034	0,0000	0,0000	0,0038	0,0000	0,0031	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-3	0,0098	0,0082	0,0052	0,0038	0,0000	0,0000	0,0034	0,0000	0,0037	0,0000	0,0030	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007
5AH-1	0,0050	0,0038	0,0025	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AH-2	0,0052	0,0042	0,0029	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0021	0,0000	0,0006	0,0007	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AH-3	0,0055	0,0047	0,0034	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000	0,0021	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000
5BH-1	0,0138	0,0105	0,0067	0,0042	0,0000	0,0032	0,0000	0,0000	0,0034	0,0029	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000
5BH-2	0,0144	0,0108	0,0067	0,0045	0,0000	0,0000	0,0032	0,0000	0,0035	0,0000	0,0031	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017
5BH-3	0,0135	0,0101	0,0063	0,0042	0,0000	0,0000	0,0029	0,0000	0,0033	0,0000	0,0030	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000
8AH-1	0,0034	0,0029	0,0022	0,0021	0,0018	0,0000	0,0028	0,0000	0,0033	0,0000	0,0028	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-2	0,0035	0,0033	0,0026	0,0022	0,0019	0,0000	0,0028	0,0000	0,0033	0,0000	0,0026	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-3	0,0035	0,0030	0,0022	0,0020	0,0017	0,0000	0,0028	0,0000	0,0032	0,0000	0,0027	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-1	0,0058	0,0062	0,0057	0,0046	0,0044	0,0052	0,0000	0,0050	0,0000	0,0036	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000
8BH-2	0,0068	0,0067	0,0057	0,0052	0,0049	0,0061	0,0000	0,0000	0,0060	0,0047	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0022	0,0000
8BH-3	0,0060	0,0060	0,0052	0,0046	0,0041	0,0051	0,0000	0,0052	0,0000	0,0039	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-1	0,0043	0,0038	0,0029	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-2	0,0036	0,0034	0,0024	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-3	0,0038	0,0035	0,0026	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-1	0,0076	0,0072	0,0060	0,0052	0,0052	0,0071	0,0000	0,0000	0,0072	0,0000	0,0053	0,0019	0,0000	0,0019	0,0000	0,0018	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-2	0,0076	0,0075	0,0064	0,0054	0,0052	0,0000	0,0068	0,0000	0,0068	0,0000	0,0051	0,0000	0,0000	0,0019	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-3	0,0064	0,0065	0,0056	0,0045	0,0043	0,0061	0,0000	0,0000	0,0059	0,0000	0,0042	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	2,44	2,42	2,41	2,39	2,37	2,34	2,33	2,32	2,31	2,30	2,29	2,28	2,26	2,24	2,23	2,21	2,19	2,18	2,17	2,16
2AH-1	0,0005	0,0008	0,0011	0,0007	0,0158	0,0309	0,0000	0,0210	0,0000	0,0061	0,0079	0,0000	0,0056	0,0030	0,0000	0,0020	0,0033	0,0000	0,0000	0,0028
2AH-2	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0151	0,0296	0,0000	0,0212	0,0000	0,0000	0,0092	0,0000	0,0070	0,0041	0,0000	0,0000	0,0045	0,0000	0,0000	0,0044
2AH-3	0,0000	0,0020	0,0000	0,0000	0,0175	0,0330	0,0000	0,0222	0,0077	0,0000	0,0091	0,0000	0,0071	0,0042	0,0000	0,0000	0,0057	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0204	0,0402	0,0000	0,0267	0,0000	0,0088	0,0108	0,0000	0,0086	0,0036	0,0000	0,0035	0,0058	0,0000	0,0000	0,0057
2BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0216	0,0410	0,0000	0,0299	0,0000	0,0105	0,0122	0,0000	0,0096	0,0048	0,0000	0,0000	0,0071	0,0000	0,0000	0,0074
2BH-3	0,0009	0,0011	0,0000	0,0000	0,0210	0,0404	0,0000	0,0293	0,0000	0,0097	0,0116	0,0000	0,0094	0,0042	0,0000	0,0041	0,0065	0,0000	0,0000	0,0068
5AH-1	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0048	0,0103	0,0059	0,0091	0,0000	0,0094	0,0081	0,0077	0,0057	0,0027	0,0000	0,0019	0,0028	0,0027	0,0028	0,0036
5AH-2	0,0000	0,0012	0,0000	0,0009	0,0053	0,0107	0,0066	0,0097	0,0000	0,0099	0,0086	0,0082	0,0063	0,0034	0,0000	0,0025	0,0038	0,0000	0,0037	0,0046
5AH-3	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0059	0,0117	0,0070	0,0104	0,0000	0,0104	0,0090	0,0087	0,0066	0,0037	0,0000	0,0030	0,0044	0,0049	0,0000	0,0055
5BH-1	0,0000	0,0030	0,0000	0,0000	0,0104	0,0193	0,0154	0,0196	0,0187	0,0000	0,0151	0,0143	0,0127	0,0054	0,0000	0,0000	0,0000	0,0086	0,0000	0,0093
5BH-2	0,0000	0,0000	0,0029	0,0000	0,0112	0,0211	0,0158	0,0000	0,0208	0,0191	0,0159	0,0146	0,0128	0,0056	0,0000	0,0000	0,0080	0,0000	0,0000	0,0085
5BH-3	0,0000	0,0027	0,0000	0,0000	0,0101	0,0197	0,0141	0,0000	0,0193	0,0179	0,0148	0,0138	0,0124	0,0051	0,0000	0,0000	0,0072	0,0000	0,0000	0,0075
8AH-1	0,0000	0,0013	0,0000	0,0000	0,0077	0,0147	0,0000	0,0111	0,0000	0,0000	0,0083	0,0000	0,0067	0,0040	0,0000	0,0038	0,0054	0,0000	0,0064	0,0061
8AH-2	0,0000	0,0011	0,0000	0,0009	0,0074	0,0146	0,0000	0,0112	0,0000	0,0000	0,0085	0,0000	0,0067	0,0040	0,0000	0,0038	0,0054	0,0000	0,0062	0,0059
8AH-3	0,0000	0,0012	0,0000	0,0011	0,0077	0,0149	0,0000	0,0108	0,0000	0,0000	0,0083	0,0000	0,0065	0,0039	0,0000	0,0039	0,0055	0,0000	0,0069	0,0063
8BH-1	0,0011	0,0016	0,0000	0,0000	0,0147	0,0288	0,0000	0,0227	0,0000	0,0000	0,0146	0,0000	0,0108	0,0053	0,0000	0,0000	0,0078	0,0079	0,0000	0,0084
8BH-2	0,0029	0,0033	0,0000	0,0000	0,0164	0,0310	0,0000	0,0000	0,0240	0,0000	0,0158	0,0000	0,0117	0,0064	0,0000	0,0065	0,0094	0,0000	0,0090	0,0099
8BH-3	0,0018	0,0022	0,0000	0,0021	0,0147	0,0280	0,0000	0,0000	0,0218	0,0000	0,0142	0,0000	0,0102	0,0053	0,0000	0,0000	0,0085	0,0000	0,0080	0,0089
11AH-1	0,0009	0,0014	0,0000	0,0010	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0208	0,0000	0,0340	0,0000	0,0239	0,0000	0,0000	0,0034	0,0048	0,0000	0,0051	0,0000
11AH-2	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0197	0,0000	0,0336	0,0000	0,0230	0,0029	0,0000	0,0022	0,0032	0,0000	0,0000	0,0027
11AH-3	0,0005	0,0010	0,0000	0,0005	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0201	0,0000	0,0335	0,0000	0,0241	0,0040	0,0000	0,0025	0,0000	0,0035	0,0000	0,0032
11BH-1	0,0000	0,0034	0,0000	0,0000	0,0191	0,0358	0,0000	0,0271	0,0000	0,0000	0,0168	0,0000	0,0134	0,0070	0,0066	0,0076	0,0116	0,0115	0,0000	0,0121
11BH-2	0,0000	0,0034	0,0000	0,0000	0,0178	0,0332	0,0000	0,0000	0,0273	0,0000	0,0166	0,0000	0,0128	0,0070	0,0000	0,0000	0,0119	0,0000	0,0000	0,0124
11BH-3	0,0018	0,0021	0,0000	0,0019	0,0165	0,0320	0,0000	0,0000	0,0261	0,0000	0,0148	0,0000	0,0112	0,0054	0,0000	0,0061	0,0098	0,0000	0,0000	0,0101

	2,14	2,13	2,09	2,04	2,01	1,91	1,89	1,86	1,84	1,82	1,81	1,79	1,78	1,76	1,74	1,72	1,68	1,63	1,60	1,54
2AH-1	0,0000	0,0065	0,0365	0,7809	0,0742	0,0061	0,0099	0,0056	0,0000	0,0000	0,0065	0,0043	0,0000	0,0060	0,0000	0,0061	1,0000	0,0299	0,1355	0,0116
2AH-2	0,0000	0,0090	0,0411	0,7682	0,0912	0,0069	0,0108	0,0065	0,0000	0,0000	0,0073	0,0049	0,0000	0,0076	0,0000	0,0000	1,0000	0,0390	0,1378	0,0000
2AH-3	0,0000	0,0144	0,0540	0,7869	0,0772	0,0066	0,0106	0,0065	0,0000	0,0000	0,0083	0,0068	0,0000	0,0124	0,0000	0,0000	1,0000	0,0361	0,1370	0,0126
2BH-1	0,0000	0,0099	0,0428	0,7475	0,0831	0,0069	0,0107	0,0066	0,0000	0,0000	0,0129	0,0062	0,0000	0,0093	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,1698	0,0000
2BH-2	0,0000	0,0137	0,0000	0,7660	0,0941	0,0079	0,0117	0,0073	0,0000	0,0000	0,0140	0,0070	0,0000	0,0114	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,1716	0,0000
2BH-3	0,0000	0,0103	0,0433	0,7574	0,0848	0,0067	0,0108	0,0066	0,0000	0,0000	0,0131	0,0066	0,0000	0,0096	0,0000	0,0000	1,0000	0,0381	0,1692	0,0000
5AH-1	0,0000	0,0069	0,0398	0,7701	0,0847	0,0065	0,0103	0,0058	0,0000	0,0000	0,0074	0,0046	0,0000	0,0081	0,0000	0,0053	1,0000	0,0000	0,2067	0,0118
5AH-2	0,0000	0,0081	0,0427	0,7596	0,0848	0,0063	0,0103	0,0058	0,0000	0,0000	0,0077	0,0050	0,0000	0,0088	0,0000	0,0066	1,0000	0,0000	0,2048	0,0116
5AH-3	0,0000	0,0118	0,0000	0,7766	0,0890	0,0073	0,0108	0,0066	0,0061	0,0000	0,0083	0,0061	0,0000	0,0118	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,2036	0,0133
5BH-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,4884	0,0665	0,0093	0,0113	0,0092	0,0000	0,0258	0,0000	0,0104	0,0000	0,0131	0,0000	0,0000	0,6419	0,0000	0,1434	0,0000
5BH-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,4960	0,0715	0,0098	0,0117	0,0094	0,0000	0,0269	0,0000	0,0098	0,0000	0,0116	0,0000	0,0000	0,6529	0,0000	0,1506	0,0000
5BH-3	0,0000	0,0110	0,0000	0,4819	0,0658	0,0085	0,0106	0,0083	0,0000	0,0000	0,0259	0,0087	0,0000	0,0089	0,0000	0,0115	0,6295	0,0000	0,1438	0,0000
8AH-1	0,0000	0,0091	0,0413	0,7472	0,0684	0,0041	0,0089	0,0046	0,0044	0,0000	0,0131	0,0045	0,0000	0,0084	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,1446	0,0094
8AH-2	0,0000	0,0097	0,0417	0,7556	0,0878	0,0000	0,0095	0,0052	0,0049	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000	0,0082	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,1476	0,0000
8AH-3	0,0000	0,0107	0,0448	0,7524	0,0702	0,0042	0,0088	0,0048	0,0048	0,0131	0,0142	0,0045	0,0000	0,0088	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,1447	0,0095
8BH-1	0,0100	0,0000	0,0377	0,5574	0,0824	0,0000	0,0118	0,0082	0,0075	0,0272	0,0262	0,0000	0,0000	0,0099	0,0000	0,0000	0,7533	0,0526	0,1368	0,0000
8BH-2	0,0124	0,0129	0,0392	0,5754	0,0657	0,0000	0,0105	0,0075	0,0068	0,0294	0,0287	0,0078	0,0000	0,0097	0,0000	0,0099	0,7940	0,0000	0,1393	0,0180
8BH-3	0,0111	0,0116	0,0369	0,5503	0,0628	0,0000	0,0095	0,0069	0,0064	0,0278	0,0272	0,0070	0,0000	0,0093	0,0000	0,0000	0,7696	0,0386	0,1320	0,0171
11AH-1	0,0000	0,0097	0,0470	0,7225	0,0809	0,0070	0,0108	0,0075	0,0073	0,0127	0,0127	0,0088	0,0000	0,0144	0,0000	0,0000	0,9240	0,0000	0,1621	0,0000
11AH-2	0,0000	0,0065	0,0373	0,7215	0,0757	0,0064	0,0106	0,0070	0,0066	0,0119	0,0000	0,0077	0,0000	0,0121	0,0101	0,0000	0,9640	0,0000	0,1629	0,0000
11AH-3	0,0000	0,0056	0,0358	0,7361	0,0858	0,0066	0,0111	0,0077	0,0074	0,0000	0,0135	0,0098	0,0000	0,0153	0,0000	0,0132	0,9390	0,0000	0,1620	0,0000
11BH-1	0,0150	0,0152	0,0479	0,6786	0,0787	0,0000	0,0126	0,0000	0,0000	0,0258	0,0275	0,0116	0,0124	0,0132	0,0000	0,0123	0,9251	0,0000	0,1782	0,0000
11BH-2	0,0159	0,0165	0,0496	0,6444	0,0788	0,0000	0,0121	0,0000	0,0000	0,0247	0,0253	0,0000	0,0120	0,0129	0,0000	0,0134	0,8889	0,0000	0,1705	0,0000
11BH-3	0,0124	0,0127	0,0425	0,6298	0,0813	0,0000	0,0113	0,0000	0,0000	0,0000	0,0233	0,0104	0,0106	0,0120	0,0000	0,0102	0,8632	0,0000	0,1629	0,0000

	1,52	1,50	1,47	1,42	1,41	1,39	1,37	1,36	1,35	1,31	1,30	1,29	1,28	1,25	1,23	1,21	1,18	1,17	1,16	1,14
2AH-1	0,0107	0,0099	0,0136	0,0075	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0210	0,0635	0,0650	0,0719	0,0000	0,8851	0,0000	0,0000	0,0104	0,0000	0,0103	0,0103
2AH-2	0,0000	0,0114	0,0149	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0688	0,0709	0,0791	0,0000	0,8129	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0116
2AH-3	0,0119	0,0114	0,0152	0,0092	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0752	0,0790	0,0867	0,0000	0,8743	0,0000	0,0000	0,0115	0,0000	0,0112	0,0113
2BH-1	0,0129	0,0126	0,0161	0,0094	0,0000	0,0000	0,0382	0,0000	0,0299	0,0000	0,0875	0,1049	0,0000	0,8257	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0119
2BH-2	0,0147	0,0144	0,0173	0,0105	0,0000	0,0000	0,0409	0,0000	0,0337	0,0000	0,0999	0,1210	0,0000	0,8763	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0144	0,0138
2BH-3	0,0132	0,0128	0,0164	0,0093	0,0000	0,0000	0,0400	0,0000	0,0301	0,0000	0,0877	0,1041	0,0000	0,8778	0,0000	0,0000	0,0126	0,0000	0,0000	0,0123
5AH-1	0,0112	0,0106	0,0139	0,0092	0,0000	0,0000	0,0148	0,0000	0,0164	0,0000	0,0491	0,0508	0,0000	0,4856	0,0000	0,0000	0,0000	0,0094	0,0000	0,0098
5AH-2	0,0110	0,0108	0,0139	0,0094	0,0000	0,0000	0,0150	0,0000	0,0172	0,0000	0,0501	0,0522	0,0000	0,4762	0,0000	0,0000	0,0000	0,0095	0,0000	0,0100
5AH-3	0,0122	0,0119	0,0150	0,0102	0,0000	0,0000	0,0174	0,0000	0,0000	0,0000	0,0570	0,0000	0,0000	0,5074	0,0000	0,0000	0,0000	0,0104	0,0106	0,0111
5BH-1	0,0174	0,0170	0,0189	0,0150	0,0000	0,0000	0,0932	0,0000	0,0569	0,0000	0,1210	0,1351	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0180	0,0000	0,0173	0,0179
5BH-2	0,0184	0,0179	0,0194	0,0143	0,0000	0,0000	0,0826	0,0000	0,0544	0,0000	0,1230	0,1405	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0190
5BH-3	0,0000	0,0158	0,0176	0,0126	0,0128	0,0000	0,0871	0,0000	0,0503	0,0000	0,1057	0,1161	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0165
8AH-1	0,0086	0,0084	0,0117	0,0099	0,0000	0,0074	0,0423	0,0000	0,0288	0,0000	0,0458	0,0695	0,0000	0,6172	0,0000	0,0000	0,0000	0,0061	0,0000	0,0061
8AH-2	0,0107	0,0095	0,0126	0,0096	0,0000	0,0079	0,0391	0,0000	0,0279	0,0429	0,0480	0,0720	0,0000	0,6199	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0076
8AH-3	0,0089	0,0085	0,0119	0,0103	0,0000	0,0081	0,0464	0,0000	0,0313	0,0000	0,0484	0,0735	0,0000	0,6104	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0057	0,0063
8BH-1	0,0209	0,0180	0,0185	0,0125	0,0138	0,0145	0,1205	0,0000	0,0505	0,0777	0,0000	0,1147	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0175
8BH-2	0,0167	0,0154	0,0168	0,0118	0,0132	0,0141	0,1213	0,0000	0,0498	0,0749	0,0822	0,1135	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0138	0,0138
8BH-3	0,0158	0,0148	0,0160	0,0112	0,0126	0,0134	0,1045	0,0000	0,0445	0,0731	0,0783	0,1086	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0129	0,0000	0,0129	0,0130
11AH-1	0,0131	0,0120	0,0156	0,0096	0,0000	0,0000	0,0332	0,0000	0,0000	0,0000	0,0686	0,0835	0,1312	1,0000	0,0769	0,0000	0,0000	0,0000	0,0127	0,0123
11AH-2	0,0119	0,0110	0,0148	0,0086	0,0000	0,0000	0,0314	0,0000	0,0176	0,0000	0,0611	0,0730	0,1201	1,0000	0,0630	0,0000	0,0109	0,0000	0,0000	0,0106
11AH-3	0,0122	0,0115	0,0150	0,0089	0,0000	0,0000	0,0293	0,0000	0,0166	0,0000	0,0602	0,0695	0,1120	1,0000	0,0828	0,0000	0,0000	0,0000	0,0117	0,0114
11BH-1	0,0206	0,0187	0,0199	0,0134	0,0144	0,0313	0,0930	0,0296	0,0437	0,0816	0,0911	0,1291	0,0000	1,0000	0,0000	0,0337	0,0169	0,0000	0,0190	0,0177
11BH-2	0,0206	0,0185	0,0197	0,0136	0,0147	0,0284	0,0769	0,0000	0,0412	0,0866	0,0947	0,1282	0,0000	1,0000	0,0000	0,0316	0,0168	0,0000	0,0168	0,0173
11BH-3	0,0198	0,0180	0,0190	0,0128	0,0136	0,0278	0,0744	0,0272	0,0387	0,0817	0,0887	0,1220	0,0000	1,0000	0,0000	0,0319	0,0156	0,0000	0,0172	0,0165

	1,12	1,10	1,08	1,07	1,04	1,03	1,02	1,01	1,00	0,99	0,98	0,97	0,95	0,93	0,92	0,90	0,89	0,88	0,86	0,85
2AH-1	0,0086	0,0108	0,0107	0,0000	0,0102	0,0157	0,0127	0,0000	0,0194	0,0130	0,0257	0,0146	0,0181	0,0198	0,0137	0,0333	0,0291	0,0823	0,0602	0,0326
2AH-2	0,0000	0,0120	0,0121	0,0000	0,0115	0,0163	0,0141	0,0198	0,0198	0,0147	0,0264	0,0162	0,0189	0,0213	0,0157	0,0351	0,0326	0,0817	0,0607	0,0350
2AH-3	0,0100	0,0122	0,0119	0,0000	0,0118	0,0169	0,0146	0,0000	0,0227	0,0147	0,0285	0,0167	0,0206	0,0220	0,0171	0,0371	0,0337	0,0868	0,0621	0,0342
2BH-1	0,0108	0,0108	0,0119	0,0000	0,0000	0,0187	0,0146	0,0000	0,0279	0,0135	0,0291	0,0164	0,0180	0,0218	0,0000	0,0385	0,0360	0,0968	0,0812	0,0395
2BH-2	0,0125	0,0125	0,0137	0,0000	0,0000	0,0204	0,0165	0,0000	0,0291	0,0160	0,0306	0,0188	0,0201	0,0242	0,0000	0,0420	0,0402	0,1020	0,0855	0,0447
2BH-3	0,0115	0,0113	0,0125	0,0000	0,0000	0,0191	0,0146	0,0000	0,0280	0,0139	0,0291	0,0171	0,0185	0,0221	0,0000	0,0380	0,0352	0,0992	0,0829	0,0418
5AH-1	0,0085	0,0104	0,0097	0,0095	0,0106	0,0148	0,0134	0,0171	0,0157	0,0117	0,0216	0,0154	0,0156	0,0179	0,0125	0,0243	0,0229	0,0575	0,0535	0,0326
5AH-2	0,0085	0,0104	0,0098	0,0000	0,0107	0,0148	0,0135	0,0171	0,0000	0,0120	0,0213	0,0156	0,0157	0,0184	0,0128	0,0246	0,0230	0,0573	0,0531	0,0325
5AH-3	0,0097	0,0116	0,0109	0,0107	0,0118	0,0161	0,0149	0,0187	0,0172	0,0136	0,0232	0,0168	0,0175	0,0196	0,0149	0,0275	0,0267	0,0615	0,0555	0,0340
5BH-1	0,0161	0,0178	0,0195	0,0000	0,0178	0,0233	0,0218	0,0000	0,0403	0,0243	0,0420	0,0283	0,0309	0,0312	0,0000	0,0499	0,0494	0,0982	0,0843	0,0523
5BH-2	0,0169	0,0186	0,0208	0,0000	0,0186	0,0244	0,0224	0,0000	0,0393	0,0256	0,0402	0,0298	0,0303	0,0327	0,0000	0,0512	0,0509	0,0965	0,0860	0,0554
5BH-3	0,0145	0,0161	0,0182	0,0000	0,0158	0,0217	0,0194	0,0000	0,0369	0,0221	0,0390	0,0000	0,0277	0,0287	0,0000	0,0452	0,0444	0,0931	0,0820	0,0521
8AH-1	0,0051	0,0056	0,0060	0,0000	0,0058	0,0090	0,0092	0,0118	0,0094	0,0071	0,0146	0,0093	0,0087	0,0119	0,0084	0,0222	0,0193	0,0562	0,0426	0,0223
8AH-2	0,0000	0,0060	0,0066	0,0000	0,0064	0,0093	0,0096	0,0122	0,0000	0,0077	0,0142	0,0101	0,0089	0,0126	0,0090	0,0225	0,0199	0,0556	0,0440	0,0239
8AH-3	0,0051	0,0057	0,0062	0,0000	0,0061	0,0094	0,0095	0,0120	0,0096	0,0074	0,0150	0,0096	0,0092	0,0123	0,0090	0,0228	0,0203	0,0566	0,0430	0,0225
8BH-1	0,0149	0,0161	0,0167	0,0000	0,0143	0,0169	0,0179	0,0265	0,0000	0,0197	0,0242	0,0194	0,0187	0,0260	0,0211	0,0411	0,0367	0,0962	0,0742	0,0464
8BH-2	0,0120	0,0137	0,0150	0,0000	0,0133	0,0165	0,0168	0,0256	0,0000	0,0187	0,0242	0,0187	0,0176	0,0254	0,0193	0,0402	0,0352	0,0959	0,0728	0,0441
8BH-3	0,0112	0,0129	0,0145	0,0000	0,0126	0,0157	0,0160	0,0245	0,0000	0,0178	0,0223	0,0175	0,0164	0,0247	0,0183	0,0383	0,0330	0,0914	0,0699	0,0414
11AH-1	0,0112	0,0114	0,0110	0,0000	0,0117	0,0163	0,0154	0,0000	0,0229	0,0130	0,0199	0,0171	0,0147	0,0198	0,0000	0,0348	0,0303	0,0858	0,0706	0,0376
11AH-2	0,0096	0,0101	0,0098	0,0095	0,0102	0,0148	0,0139	0,0000	0,0213	0,0115	0,0187	0,0156	0,0127	0,0182	0,0000	0,0332	0,0275	0,0858	0,0697	0,0337
11AH-3	0,0099	0,0105	0,0102	0,0099	0,0106	0,0151	0,0141	0,0000	0,0224	0,0119	0,0184	0,0162	0,0132	0,0180	0,0000	0,0322	0,0276	0,0822	0,0703	0,0376
11BH-1	0,0143	0,0147	0,0164	0,0000	0,0149	0,0177	0,0176	0,0270	0,0234	0,0192	0,0283	0,0209	0,0201	0,0300	0,0000	0,0450	0,0394	0,1114	0,0828	0,0499
11BH-2	0,0142	0,0144	0,0164	0,0000	0,0149	0,0176	0,0177	0,0260	0,0217	0,0193	0,0262	0,0000	0,0192	0,0295	0,0000	0,0443	0,0402	0,1042	0,0801	0,0480
11BH-3	0,0135	0,0139	0,0158	0,0000	0,0141	0,0168	0,0166	0,0252	0,0205	0,0185	0,0254	0,0200	0,0183	0,0284	0,0000	0,0419	0,0368	0,1032	0,0792	0,0467

	0,84	0,83	0,82	0,80	0,79	0,78	0,77	0,74	0,70	0,68	0,65	0,59	0,58	0,57	0,50	0,20	0,19	0,08	0,07	0,02
2AH-1	0,0000	0,0227	0,0181	0,0165	0,0162	0,0116	0,0138	0,0000	0,0055	0,0105	0,0015	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,0000	0,0000	0,0000
2AH-2	0,0000	0,0253	0,0202	0,0179	0,0174	0,0000	0,0146	0,0000	0,0059	0,0106	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AH-3	0,0000	0,0250	0,0199	0,0177	0,0162	0,0000	0,0140	0,0000	0,0060	0,0110	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-1	0,0000	0,0349	0,0224	0,0213	0,0205	0,0000	0,0161	0,0000	0,0063	0,0122	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BH-2	0,0000	0,0386	0,0258	0,0235	0,0226	0,0000	0,0177	0,0000	0,0072	0,0130	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0008	0,0000	0,0000
2BH-3	0,0000	0,0363	0,0236	0,0221	0,0213	0,0000	0,0171	0,0000	0,0067	0,0127	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000	0,0006	0,0000
5AH-1	0,0000	0,0209	0,0172	0,0146	0,0123	0,0000	0,0124	0,0036	0,0046	0,0104	0,0015	0,0010	0,0000	0,0000	0,0007	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AH-2	0,0000	0,0211	0,0000	0,0147	0,0124	0,0000	0,0124	0,0038	0,0046	0,0102	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AH-3	0,0000	0,0230	0,0188	0,0157	0,0137	0,0000	0,0129	0,0043	0,0054	0,0109	0,0020	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0016	0,0000	0,0000	0,0032
5BH-1	0,0399	0,0000	0,0302	0,0271	0,0259	0,0000	0,0210	0,0000	0,0084	0,0161	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0024	0,0000	0,0000	0,0021	0,0000
5BH-2	0,0000	0,0408	0,0315	0,0289	0,0285	0,0000	0,0225	0,0000	0,0089	0,0164	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000
5BH-3	0,0000	0,0377	0,0292	0,0261	0,0261	0,0000	0,0213	0,0000	0,0078	0,0158	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000
8AH-1	0,0145	0,0000	0,0123	0,0098	0,0076	0,0000	0,0076	0,0000	0,0027	0,0075	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-2	0,0000	0,0161	0,0136	0,0111	0,0083	0,0000	0,0083	0,0000	0,0027	0,0074	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AH-3	0,0000	0,0145	0,0125	0,0099	0,0075	0,0000	0,0076	0,0000	0,0027	0,0075	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BH-1	0,0000	0,0310	0,0292	0,0238	0,0213	0,0177	0,0182	0,0000	0,0079	0,0159	0,0024	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0007	0,0000
8BH-2	0,0000	0,0272	0,0258	0,0218	0,0198	0,0156	0,0172	0,0000	0,0074	0,0159	0,0021	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0010	0,0000
8BH-3	0,0000	0,0259	0,0243	0,0208	0,0190	0,0148	0,0164	0,0041	0,0068	0,0152	0,0020	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0008	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000
11AH-1	0,0000	0,0316	0,0224	0,0200	0,0169	0,0000	0,0149	0,0000	0,0065	0,0127	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0017	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-2	0,0290	0,0196	0,0000	0,0179	0,0152	0,0000	0,0134	0,0000	0,0055	0,0121	0,0013	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AH-3	0,0000	0,0313	0,0217	0,0192	0,0161	0,0000	0,0143	0,0000	0,0057	0,0124	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BH-1	0,0000	0,0310	0,0279	0,0244	0,0200	0,0164	0,0197	0,0056	0,0083	0,0149	0,0029	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0013	0,0000	0,0012	0,0000
11BH-2	0,0000	0,0301	0,0262	0,0238	0,0192	0,0160	0,0188	0,0000	0,0078	0,0135	0,0027	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0012	0,0000	0,0009	0,0000
11BH-3	0,0000	0,0294	0,0256	0,0226	0,0187	0,0153	0,0183	0,0000	0,0072	0,0132	0,0023	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0014	0,0000	0,0000	0,0000

Anexo 02

	12,61	11,19	10,42	9,72	9,71	9,63	9,53	9,49	9,39	8,55	8,09	8,07	8,06	8,01	7,99	7,61	7,46	7,41	7,04	7,01
2AM-1	0,0000	0,0095	0,0093	0,0000	0,0096	0,0000	0,0204	0,0000	0,0185	0,0191	0,0000	0,0000	0,0000	0,0132	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AM-2	0,0000	0,0097	0,0093	0,0000	0,0101	0,0000	0,0213	0,0000	0,0206	0,0214	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0125	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AM-3	0,0000	0,0055	0,0052	0,0000	0,0000	0,0000	0,0153	0,0000	0,0146	0,0141	0,0000	0,0000	0,0000	0,0070	0,0000	0,0000	0,0000	0,0053	0,0000	0,0000
2BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0114	0,0000	0,0104	0,0100	0,0000	0,0000	0,0000	0,0046	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BM-2	0,0000	0,0045	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0141	0,0000	0,0132	0,0131	0,0000	0,0000	0,0000	0,0063	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BM-3	0,0000	0,0130	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0215	0,0000	0,0206	0,0211	0,0000	0,0000	0,0166	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0074	0,0000	0,0070	0,0067	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0113	0,0000	0,0100	0,0095	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0079	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AM-3	0,0000	0,0000	0,0054	0,0055	0,0000	0,0000	0,0156	0,0062	0,0138	0,0126	0,0000	0,0000	0,0000	0,0067	0,0000	0,0066	0,0000	0,0000	0,0098	0,0000
5BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0086	0,0000	0,0086	0,0097	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0117	0,0000	0,0110	0,0115	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0184	0,0000	0,0185	0,0179	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0088	0,0123	0,0000	0,0115	0,0110	0,0000	0,0000	0,0115	0,0000	0,0000	0,0124	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0180	0,0000	0,0168	0,0160	0,0000	0,0175	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0085	0,0000	0,0093	0,0088	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0096	0,0000	0,0095	0,0094	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-3	0,0000	0,0066	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0142	0,0000	0,0127	0,0129	0,0000	0,0000	0,0000	0,0075	0,0000	0,0000	0,0073	0,0000	0,0000	0,0000
11AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0080	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0124	0,0000	0,0000	0,0000	0,0113	0,0000	0,0000	0,0119
11AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0094	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0140	0,0000	0,0000	0,0000	0,0138	0,0000	0,0000	0,0124
11AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0152	0,0000	0,0000	0,0000	0,0194	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-2	0,0066	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0069	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	6,91	6,89	6,88	6,84	6,80	6,62	6,60	6,45	6,32	6,27	6,21	6,17	6,12	5,54	5,35	5,24	5,13	5,12	5,11	5,10
2AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0153	0,0000	0,0147	0,0186	0,0334	0,0195	0,0201	0,0000	0,0000	0,0694	0,0577	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AM-2	0,0143	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0144	0,0000	0,0186	0,0336	0,0202	0,0200	0,0000	0,0225	0,0628	0,0474	0,0000	0,0919	0,0000	0,0000
2AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0083	0,0000	0,0083	0,0000	0,0000	0,0121	0,0251	0,0128	0,0125	0,0000	0,0000	0,0463	0,0355	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0054	0,0000	0,0089	0,0197	0,0102	0,0104	0,0000	0,0000	0,0412	0,0253	0,0000	0,0377	0,0000	0,0000
2BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0059	0,0000	0,0000	0,0066	0,0000	0,0111	0,0242	0,0121	0,0124	0,0089	0,0113	0,0429	0,0238	0,0000	0,0318	0,0000	0,0000
2BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0223	0,0341	0,0000	0,0236	0,0000	0,0000	0,0740	0,0529	0,0000	0,0729	0,0000	0,0000
5AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0067	0,0120	0,0000	0,0071	0,0000	0,0000	0,0280	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0327
5AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0099	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0108	0,0190	0,0000	0,0120	0,0000	0,0000	0,0559	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0090	0,0000	0,0000	0,0078	0,0110	0,0222	0,0113	0,0115	0,0000	0,0129	0,0452	0,0299	0,0000	0,0391	0,0000	0,0000
5BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0110	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0166	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0586	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0159	0,0233	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0805	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0206	0,0289	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0959	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0142	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0142	0,0199	0,0155	0,0000	0,0000	0,0000	0,0477	0,0388	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0107	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0373	0,0265	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0187	0,0000	0,0240	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0550	0,0432	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0195	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0523	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0187	0,0000	0,0131	0,0000	0,0000	0,0369	0,0342	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-3	0,0000	0,0087	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0118	0,0224	0,0124	0,0127	0,0000	0,0132	0,0337	0,0269	0,0000	0,0313	0,0000	0,0000
11AM-1	0,0000	0,0000	0,0119	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0123	0,0000	0,0122	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0422	0,0333	0,0000	0,0000	0,0000	0,0356
11AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0138	0,0000	0,0000	0,0000	0,0129	0,0000	0,0000	0,0459	0,0341	0,0000	0,0405	0,0000	0,0000
11AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0521	0,0000	0,0000	0,0000	0,0511	0,0000
11BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0127	0,0102	0,0104	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0417	0,0354	0,0399	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0189	0,0147	0,0145	0,0000	0,0000	0,0000

	5,09	5,01	4,95	4,80	4,76	4,57	4,48	4,46	4,16	4,13	4,11	4,09	3,90	3,88	3,86	3,81	3,74	3,69	3,67	3,63
2AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1625	0,0000	0,0000	0,0539	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1005	0,1274	0,0000	0,0951	0,0000	0,1515	0,0000	0,0000
2AM-2	0,0000	0,0890	0,0000	0,0976	0,0000	0,0000	0,0000	0,0422	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0901	0,1182	0,0000	0,0832	0,0000	0,1391	0,0000	0,0000
2AM-3	0,0717	0,0874	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0277	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0685	0,0941	0,0000	0,0624	0,0000	0,1085	0,0824	0,0000
2BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0215	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0672	0,0000	0,0410	0,0000	0,0753	0,0000	0,0000
2BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0218	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0743	0,0000	0,0430	0,0478	0,0818	0,0000	0,0000
2BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0395	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0980	0,0000	0,0000	0,0000	0,1119	0,0000	0,0000
5AM-1	0,0000	0,0318	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0155	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0350	0,0468	0,0000	0,0000	0,0000	0,0498	0,0402	0,0000
5AM-2	0,0000	0,0000	0,2421	0,0000	0,0000	0,0000	0,0397	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0921	0,0000	0,0000	0,0000	0,1109	0,0000	0,0000
5AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0213	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0561	0,0796	0,0507	0,0455	0,0488	0,0817	0,0616	0,0000
5BM-1	0,0000	0,1041	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0370	0,0000	0,0509	0,0504	0,0000	0,0000	0,0725	0,0000	0,0000	0,0000	0,0849	0,0000	0,0000
5BM-2	0,0000	0,1621	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0715	0,0711	0,0000	0,0000	0,1018	0,0000	0,0000	0,0000	0,1213	0,0000	0,0000
5BM-3	0,0000	0,1783	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0669	0,0859	0,0845	0,0694	0,0000	0,1193	0,0000	0,0000	0,0000	0,1398	0,1264	0,0000
8AM-1	0,0000	0,0000	0,0918	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0493	0,0754	0,0760	0,0544	0,0930	0,1047	0,0905	0,0000	0,0000	0,1181	0,1285	0,0000
8AM-2	0,0000	0,0000	0,0684	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0635	0,0647	0,0457	0,0000	0,0980	0,0000	0,0000	0,0000	0,1180	0,1292	0,0000
8AM-3	0,0000	0,0000	0,0910	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0558	0,0841	0,0866	0,0603	0,0000	0,1146	0,1014	0,0000	0,0000	0,1281	0,1388	0,0000
8BM-1	0,0000	0,1734	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0427	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1007	0,0000	0,0000	0,0000	0,1170	0,0000	0,0000
8BM-2	0,0000	0,0630	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0274	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0752	0,0000	0,0000	0,0000	0,0830	0,0000	0,0000
8BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0231	0,0000	0,0000	0,0257	0,0000	0,0000	0,0727	0,0000	0,0447	0,0000	0,0756	0,0543	0,0000
11AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0233	0,0000	0,0000	0,0000	0,0360	0,0000	0,0000	0,0902	0,0954	0,0821	0,0000	0,0729	0,0753	0,0000	0,0801
11AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0406	0,0000	0,0000	0,0984	0,1037	0,0884	0,0000	0,0823	0,0852	0,0000	0,0000
11AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0955	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0111	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200	0,0000	0,0000	0,0210	0,0199	0,0000	0,0000
11BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0272	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0565	0,0000	0,0000	0,0589	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0311	0,0000	0,0000	0,0335	0,0000	0,0000	0,0000

	3,61	3,51	3,48	3,44	3,43	3,41	3,39	3,28	3,24	3,21	2,79	2,78	2,68	2,67	2,61	2,58	2,55	2,53	2,51	2,48
2AM-1	0,0000	0,0000	0,2601	0,0000	0,0000	0,1790	0,0000	0,0000	0,1498	0,0000	0,0517	0,0000	0,0287	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0280	0,0000	0,0000
2AM-2	0,0000	0,0000	0,2571	0,0000	0,0000	0,1598	0,0000	0,0000	0,1327	0,0000	0,0489	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2AM-3	0,0000	0,0000	0,2026	0,0000	0,0000	0,1248	0,1091	0,0000	0,1179	0,0000	0,0410	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0200	0,0000	0,0206	0,0196	0,0000
2BM-1	0,0000	0,0000	0,0602	0,0000	0,0000	0,0739	0,0000	0,0446	0,0717	0,0000	0,0336	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
2BM-2	0,0512	0,0000	0,0656	0,0000	0,0000	0,0785	0,0602	0,0468	0,0797	0,0529	0,0376	0,0000	0,0161	0,0000	0,0167	0,0166	0,0000	0,0173	0,0000	0,0171
2BM-3	0,0000	0,0000	0,0910	0,0000	0,0000	0,1035	0,0000	0,0000	0,0977	0,0000	0,0497	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0543	0,0473	0,0000	0,0542	0,0000	0,0244	0,0000	0,0000	0,0142	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1254	0,0000	0,0000	0,1193	0,0000	0,0506	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0275	0,0000
5AM-3	0,0000	0,0000	0,0580	0,0000	0,0000	0,0904	0,0772	0,0000	0,1055	0,0828	0,0470	0,0000	0,0000	0,0256	0,0000	0,0221	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0781	0,0000	0,0000	0,0707	0,0000	0,0460	0,0412	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0247	0,0000	0,0000
5BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1099	0,0000	0,0000	0,0968	0,0000	0,0620	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
5BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1307	0,0000	0,1028	0,1203	0,0000	0,0809	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0427	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-1	0,1197	0,0000	0,1475	0,0000	0,1253	0,1323	0,0000	0,0896	0,0893	0,0000	0,0362	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-2	0,1285	0,0000	0,1552	0,0000	0,0000	0,1432	0,0000	0,0999	0,0978	0,0000	0,0413	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8AM-3	0,1297	0,0000	0,1585	0,0000	0,0000	0,1442	0,0000	0,1008	0,1007	0,0000	0,0412	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1156	0,0000	0,0000	0,1211	0,0000	0,0557	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0865	0,0000	0,0000	0,0962	0,0000	0,0433	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
8BM-3	0,0540	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0781	0,0000	0,0663	0,0928	0,0775	0,0450	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AM-1	0,0835	0,0730	0,0890	0,0000	0,0818	0,0898	0,0000	0,0927	0,0933	0,0000	0,0492	0,0000	0,0000	0,0338	0,0000	0,0000	0,0310	0,0000	0,0000	0,0295
11AM-2	0,0921	0,0000	0,1000	0,0000	0,0942	0,1014	0,0000	0,0989	0,0969	0,0000	0,0477	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11AM-3	0,0853	0,0000	0,0861	0,0000	0,0000	0,0849	0,0000	0,0898	0,0895	0,0000	0,0524	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-1	0,0223	0,0000	0,0000	0,0219	0,0000	0,0209	0,0000	0,0256	0,0000	0,0240	0,0150	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-2	0,0614	0,0000	0,0000	0,0597	0,0000	0,0000	0,0000	0,0669	0,0000	0,0625	0,0398	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0282	0,0000	0,0000	0,0000
11BM-3	0,0361	0,0000	0,0000	0,0350	0,0000	0,0342	0,0000	0,0427	0,0000	0,0411	0,0247	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

	2,47	2,45	2,42	2,38	2,36	2,34	2,31	2,28	2,20	2,18	2,16	2,09	2,05	2,03	2,00	1,97	1,89	1,81	1,79	1,68
2AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0746	0,0709	0,0000	0,0000	0,4049	0,0000	0,0000	0,1118	0,0000	0,1130	0,0000	0,0811	0,0683	0,0648	0,1595
2AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0711	0,0684	0,0000	0,0000	0,4776	0,0000	0,0000	0,1064	0,0000	0,1093	0,1005	0,0749	0,0653	0,0607	0,1536
2AM-3	0,0000	0,0198	0,0199	0,0000	0,0381	0,0619	0,0584	0,0000	0,0000	0,3920	0,0000	0,0000	0,0852	0,0000	0,0897	0,0823	0,0655	0,0529	0,0480	0,1277
2BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0326	0,0507	0,0465	0,0000	0,0000	0,1855	0,0000	0,0000	0,0634	0,0000	0,0634	0,0580	0,0450	0,0399	0,0374	0,0856
2BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0378	0,0624	0,0554	0,0000	0,0000	0,2239	0,0000	0,0000	0,0703	0,0000	0,0699	0,0664	0,0535	0,0447	0,0410	0,0941
2BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0729	0,0687	0,0000	0,0000	0,2083	0,0000	0,0000	0,0984	0,0000	0,0951	0,0000	0,0688	0,0585	0,0000	0,1203
5AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0277	0,0280	0,0000	0,0000	0,2158	0,0000	0,0000	0,0475	0,0000	0,0500	0,0000	0,0325	0,0279	0,0266	0,0785
5AM-2	0,0000	0,0267	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0552	0,0000	0,0000	0,3583	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1027	0,0000	0,0653	0,0558	0,0534	0,1456
5AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0348	0,0555	0,0525	0,0000	0,0271	0,4556	0,0000	0,0000	0,0823	0,0830	0,0902	0,0778	0,0631	0,0450	0,0407	0,1402
5BM-1	0,0245	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0451	0,0000	0,0000	0,0000	0,0964	0,0000	0,0000	0,1057	0,0000	0,0000	0,0000	0,0468	0,0360	0,0000	0,0625
5BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0623	0,0000	0,0000	0,0000	0,1349	0,0000	0,0000	0,1493	0,0000	0,0000	0,0000	0,0657	0,0000	0,0000	0,0000
5BM-3	0,0408	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0773	0,0759	0,0000	0,0000	0,1787	0,0000	0,0000	0,1927	0,0000	0,0000	0,0000	0,0753	0,0585	0,0000	0,0966
8AM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0557	0,0578	0,0571	0,0438	0,2271	0,0000	0,0000	0,2213	0,0000	0,0000	0,0000	0,0646	0,0466	0,0463	0,0922
8AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0604	0,0000	0,0000	0,2061	0,0000	0,0000	0,2123	0,0000	0,0000	0,0000	0,0683	0,0000	0,0000	0,0979
8AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0600	0,0643	0,0606	0,0000	0,2512	0,0000	0,0000	0,2438	0,0000	0,0000	0,0000	0,0680	0,0000	0,0000	0,0963
8BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0669	0,0000	0,0000	0,0000	0,0806	0,0000	0,0000	0,0817	0,0000	0,0000	0,0000	0,0738	0,0589	0,0000	0,1133
8BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0570	0,0545	0,0000	0,0000	0,0711	0,0000	0,0000	0,0664	0,0000	0,0000	0,0000	0,0615	0,0485	0,0000	0,0973
8BM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0384	0,0584	0,0542	0,0000	0,0000	0,0744	0,0000	0,0000	0,0000	0,0637	0,0620	0,0637	0,0595	0,0451	0,0426	0,0952
11AM-1	0,0000	0,0000	0,0294	0,0000	0,0000	0,0684	0,0661	0,0000	0,0000	0,2691	0,0000	0,0786	0,0000	0,0000	0,0927	0,0000	0,0764	0,0000	0,0515	0,1317
11AM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0323	0,0000	0,0712	0,0689	0,0000	0,0000	0,2926	0,0000	0,0838	0,0000	0,0000	0,0992	0,0000	0,0793	0,0000	0,0569	0,1431
11AM-3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0667	0,0000	0,0000	0,1971	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0939	0,0000	0,0761	0,0000	0,0000	0,1316
11BM-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0217	0,0208	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0250	0,0000	0,0218	0,0000	0,0000	0,0361
11BM-2	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0535	0,0531	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0649	0,0000	0,0557	0,0000	0,0000	0,0929
11BM-3	0,0000	0,0000	0,0153	0,0000	0,0243	0,0370	0,0339	0,0000	0,0000	0,0000	0,0214	0,0000	0,0000	0,0000	0,0409	0,0000	0,0363	0,0000	0,0000	0,0584

	1,60	1,57	1,50	1,28	1,25	1,14	1,08	0,98	0,97	0,95	0,94	0,93	0,92	0,90	0,87	0,86	0,83	0,81	0,78	0,77
2AM-1	0,3327	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,1330	0,1507	0,2359	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2194	0,2191	0,2541	0,3013	0,2179	0,0000	0,0000	0,2247
2AM-2	0,3277	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,1297	0,1446	0,2262	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2069	0,2130	0,2466	0,2979	0,2198	0,0000	0,0000	0,2180
2AM-3	0,2823	0,1600	0,0927	0,0000	1,0000	0,1151	0,1423	0,2295	0,0000	0,1620	0,0000	0,0000	0,1937	0,1912	0,2096	0,2537	0,1789	0,0000	0,0000	0,2196
2BM-1	0,1888	0,1174	0,0000	0,0000	0,7606	0,0768	0,0919	0,1473	0,0000	0,0000	0,0000	0,1205	0,0000	0,1263	0,1605	0,2037	0,1399	0,0000	0,1325	0,1317
2BM-2	0,2153	0,0000	0,0748	0,0000	1,0000	0,0898	0,1162	0,1930	0,0000	0,1286	0,1280	0,0000	0,1427	0,1497	0,1798	0,2286	0,1554	0,0949	0,1594	0,1708
2BM-3	0,2543	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,1300	0,1439	0,2202	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2024	0,2402	0,2826	0,2188	0,0000	0,0000	0,2034
5AM-1	0,1579	0,0000	0,0000	0,0000	0,4103	0,0499	0,0573	0,0901	0,0000	0,0000	0,0000	0,0888	0,0000	0,0878	0,1113	0,1263	0,0823	0,0000	0,0000	0,0786
5AM-2	0,2827	0,0000	0,0000	0,0000	0,7020	0,1086	0,1167	0,1800	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2219	0,2402	0,0000	0,0000	0,1540	0,0000
5AM-3	0,3016	0,0000	0,0912	0,0000	1,0000	0,1143	0,1496	0,2328	0,1574	0,1638	0,0000	0,0000	0,2110	0,1964	0,2240	0,2572	0,1620	0,0946	0,0000	0,2226
5BM-1	0,1036	0,0000	0,0000	0,0000	0,5581	0,0657	0,0814	0,1236	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1147	0,0000	0,1380	0,1542	0,0000	0,0000	0,1074	0,0000
5BM-2	0,1438	0,0000	0,0000	0,0000	0,7757	0,0906	0,1137	0,1731	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1582	0,0000	0,1902	0,2140	0,0000	0,0000	0,0000	0,1508
5BM-3	0,1697	0,1509	0,0000	0,0000	1,0000	0,1218	0,1433	0,2094	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1958	0,1917	0,2452	0,2868	0,2027	0,0000	0,0000	0,1994
8AM-1	0,1484	0,0000	0,0000	0,3231	0,9415	0,1008	0,1269	0,1805	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1634	0,1558	0,2275	0,2494	0,1613	0,0000	0,0000	0,1631
8AM-2	0,1763	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,1245	0,1439	0,1986	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1843	0,1857	0,2474	0,2715	0,0000	0,0000	0,0000	0,1880
8AM-3	0,1635	0,0000	0,0000	0,3355	1,0000	0,1275	0,1453	0,1931	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1842	0,1842	0,2571	0,2929	0,2122	0,0000	0,0000	0,1991
8BM-1	0,1951	0,0000	0,0000	0,0000	0,9768	0,1282	0,1467	0,2118	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1899	0,2309	0,2700	0,0000	0,0000	0,0000	0,1957
8BM-2	0,1689	0,0000	0,0000	0,0000	0,8981	0,0997	0,1228	0,1848	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1548	0,1537	0,1912	0,2276	0,0000	0,0000	0,0000	0,1619
8BM-3	0,1696	0,1311	0,0832	0,0000	1,0000	0,1103	0,1393	0,2067	0,0000	0,1433	0,0000	0,0000	0,1675	0,1652	0,2028	0,2485	0,1734	0,0000	0,1833	0,1952
11AM-1	0,2488	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,1351	0,1771	0,2385	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2182	0,2168	0,2679	0,2975	0,0000	0,0000	0,0000	0,2209
11AM-2	0,2660	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,1378	0,1718	0,2285	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2163	0,2181	0,2791	0,3097	0,0000	0,0000	0,0000	0,2042
11AM-3	0,2340	0,0000	0,0000	0,0000	0,8349	0,1389	0,1649	0,2152	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2136	0,0000	0,2579	0,2737	0,0000	0,0000	0,0000	0,1948
11BM-1	0,0613	0,0000	0,0000	0,0000	0,2902	0,0384	0,0426	0,0648	0,0000	0,0000	0,0000	0,0558	0,0000	0,0558	0,0794	0,0942	0,0653	0,0000	0,0000	0,0528
11BM-2	0,1581	0,0000	0,0000	0,0000	0,6748	0,0945	0,1040	0,1537	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1377	0,1895	0,2223	0,0000	0,0000	0,1267	0,0000
11BM-3	0,1073	0,0000	0,0000	0,0000	0,5607	0,0717	0,0834	0,1262	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1026	0,1040	0,1445	0,1714	0,1173	0,0000	0,0000	0,1079

	0,68
2AM-1	0,0000
2AM-2	0,0000
2AM-3	0,0430
2BM-1	0,0000
2BM-2	0,0307
2BM-3	0,0000
5AM-1	0,0184
5AM-2	0,0000
5AM-3	0,0501
5BM-1	0,0000
5BM-2	0,0000
5BM-3	0,0000
8AM-1	0,0000
8AM-2	0,0000
8AM-3	0,0000
8BM-1	0,0000
8BM-2	0,0000
8BM-3	0,0442
11AM-1	0,0532
11AM-2	0,0000
11AM-3	0,0000
11BM-1	0,0000
11BM-2	0,0000
11BM-3	0,0000