

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE FRAÇÕES  
SEMI-PURIFICADAS OBTIDAS A PARTIR DO RIZOMA *TYPHA DOMINGENSIS*  
PERS (*TYPHACEAE*)**

Marco Antonio Lobo<sup>2</sup>, Walber Toma<sup>1,2,3,4</sup>, Marcos Paulo de Oliveira Silva<sup>2</sup>; Nathália Sayuri Yamamoto<sup>1</sup>; Luciana Lopes Guimarães<sup>1,2</sup>

- 1- Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Marinhos e Costeiros (PPG Ecomar– Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos, SP, Brasil
- 2- Faculdade de Educação Física, Esportes e Farmácia – Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos, SP, Brasil
- 3- Faculdade de Fisioterapia - Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos, SP, Brasil
- 4- Faculdade de Odontologia - Universidade Santa Cecília (UNISANTA), Santos, SP, Brasil

**Resumo**

Nos últimos anos a área da Farmacologia de Produtos Naturais tem revelado diversos compostos bioativos oriundos de amostras vegetais. Tal fato deve-se seguramente à evolução científica e tecnológica, permitindo ampliação dos conhecimentos químicos e farmacológicos acerca dos metabólitos secundários vegetais. Os dados gerados a partir dessas pesquisas vêm ampliando exponencialmente as possibilidades de aplicação das plantas como fonte direta para obtenção de fármacos ou inspirando a síntese de novas substâncias a partir das estruturas moleculares descobertas. Dentro deste contexto, o presente estudo teve por objetivo a realização da análise fitoquímica e a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de 03 frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma de *Typha domingensis* Pers (*Typhaceae*) em culturas de leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*. Os resultados revelaram uma atividade antifúngica da fração semi-purificada de acetato de etila (FrAcE), para as quatro espécies de *Candida* spp testadas, com valores de CFM de 10 mg/mL. As análises fitoquímicas demonstram a presença de flavonóides na FrAcE, sugerindo um possível envolvimento desta classe de metabólitos vegetais secundários para a atividade fungicida observada, uma vez que a atividade antifúngica já foi demonstrada para diferentes flavonóides. Tais dados servem como suporte para sequência de novos estudos que possam em futuro próximo, contribuir para o desenvolvimento de novas terapias farmacológicas com propriedades antifúngicas a partir do rizoma de *Typha domingensis*.

**Palavras-Chave:** *Typha domingensis*; Atividade Antifúngica; *Candida* spp; Flavonóides.

# EVALUATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY IN VITRO OF SEMI-PURIFIED FRACTIONS OBTAINED FROM RHIZOME *TYPHA DOMINGENSIS* PERS (*TYPHACEAE*)

## Abstract

In recent years, the field of Pharmacology of Natural Products has demonstrated several bioactive compounds originating from vegetable samples. This fact is strictly related to scientific and technological developments, allowing the expansion of knowledge in the fields of chemistry and pharmacology applied to plant secondary metabolites. The data originated from these researches is expanding exponentially the possibilities of application of plants as a direct source for obtaining pharmaceuticals or inspiring the synthesis of new drugs from molecular structures discoveries. Within this context, the present study aimed to perform phytochemical analysis and evaluate the potential antifungal activity *in vitro* of 03 semi-purified fractions obtained from the rhizome of *Typha domingensis* Pers (*Typhaceae*) in cultures of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. The results showed antifungal activity of the semi-purified fraction of ethyl acetate (FrAcE) for the four species of *Candida* spp tested, with MFC values of 10 mg/mL. Phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids in FrAcE, class of plant secondary metabolites with antifungal activity previously described. The data generated from this study may serve as support for further studies that might contribute to the development of new antifungal therapies based on the antifungal properties from the rhizome of *Typha domingensis*.

**Keywords:** *Typha domingensis*; Antifungal Activity; *Candida* spp; Flavonoids.

## Introdução

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo. Estimativas apontam que no Brasil esta represente cerca de 20% de tudo o que há de vida no planeta. Em seu território de cerca de 8,5 milhões de km<sup>2</sup> estudos afirmam ser este o país com a flora mais rica do mundo, com mais de 56.000 espécies de plantas o que corresponde a quase 19% da flora mundial. Estimativas atuais indicam a existência de 5-10 espécies de gimnospermas, 55.000-60.000 espécies de angiospermas, 3.100 espécies de briófitas, 1.200-1.300 espécies de pteridófitas e cerca de 525 espécies de algas marinhas. Esses números não incluem os fungos e os líquens, estes últimos com estimativas recentes de 2.800 espécies no país. (GIULIETT *et al.*, 2005).

Dentre as diversas plantas presentes em território nacional, destaca-se no presente trabalho *Typha domingensis* Pers (*Typhaceae*). Nativa da América do Sul é popularmente conhecida como Taboa, Tifa, Bucha e Capim-de-Esteira. Esta, trata-se de espécie comumente encontrada em pântanos, margens de lagos e brejos das regiões temperadas e tropicais do mundo inteiro (USDA, 2006). Do ponto de vista da medicina tradicional muitos são os relatos do uso de *Typha domingensis* para o tratamento de uma série de processos patológicos tais como queimaduras, cálculos renais, inflamações de vias aéreas superiores, e diarreias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Muitas destas indicações populares já foram avaliadas em protocolos de pesquisa básica, demonstrando o êxito terapêutico de *Typha domingensis* (RUKUNGA *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2009; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Tais dados são de grande relevância, uma vez que, demonstram a importância de investimentos em ensaios biológicos envolvendo *Typha domingensis* pressupondo que em futuro próximo tais dados possam contribuir para desenvolvimento de novas propostas terapêuticas para o tratamento das mais variadas patologias. Apesar de variadas indicações terapêuticas de extratos obtidos a partir de *Typha domingensis*, ainda não foram realizados trabalhos propondo avaliação de provável atividade antifúngica desta plantas.

Estudos diversos apontam estimativas de que, atualmente existam cerca de 72.000 espécies de fungos descritas. Destas, aproximadamente 300 são conhecidas como patógenos a homens e animais. Tais fungos podem causar um largo espectro de infecções, variando de infecções sistêmicas e potencialmente fatais, a infecções localizadas cutâneas, subcutâneas ou em mucosas (DROUHET, 2010).

Nas últimas três décadas vêm sendo observado um aumento do risco para infecções fúngicas, principalmente com o crescente número de indivíduos imunossuprimidos ou imunocomprometidos, como pacientes transplantados ou pacientes com HIV. Em adição, também tem sido observado um aumento da resistência destes patógenos contra agentes antifúngicos convencionais, levando a um crescente interesse por um melhor entendimento da biologia dos diferentes fungos. O número restrito de classes de antifúngicos atualmente disponíveis e o aumento observado na resistência a estes antifúngicos levam a um crescente interesse pela pesquisa e desenvolvimento de novas classes que atuem em diferentes alvos dos antifúngicos atualmente em uso.

Dentro deste contexto, ganha destaque no presente trabalho reflexões a cerca de compostos de origem vegetal. Muitos destes compostos têm sido descritos como inibidores de germinação de esporos de fungos fitopatogênicos e também tem demonstrado capacidade potencial como inibidores do crescimento de fungos patogênicos para o homem

(HARBORNE & GRAYER, 1994; HARBORNE & WILLIAMS, 2000). Dentre as mais variadas classes de metabólitos secundários vegetais com potencial atividade antifúngica, encontram-se os compostos fenólicos, com especial destaque aos flavonóides e taninos (RANGARI, 2007; FERREYRA *et al.*, 2012) . É fato que, ambas classes de metabólitos secundários vegetais podem ser encontrados em abundância nas plantas medicinais. Silva *et al.*, 2010, demonstram em seus trabalhos a presença destes compostos fenólicos mediante análise de extrato obtido a partir do rizoma de *Typha domingensis*, fortalecendo portanto a hipótese de potencial atividade antifúngica desta planta.

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo a realização da análise fitoquímica e a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* de 03 frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma de *Typha domingensis* Pers (Typhaceae) em culturas de leveduras *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, agente etiológico da candidíase.

## **Materiais e Métodos**

### **1. Coleta e identificação**

Exemplares de *Typha domingensis* Pers foram coletados na cidade de Guarujá-SP Rodovia SP-061 (km 9) e identificados pela equipe de botânicos da Universidade Santa Cecília, onde foram encaminhados ao Herbário da Universidade Santa Cecília (HUSC) para a realização da exsicata da espécie. Os rizomas de *Typha* sp foram submetidos ao processo de secagem em estufa ventilada à 45°C, por 07 dias consecutivos.

### **2. Obtenção das frações semi-purificadas**

O material seco foi triturado utilizando moinho de facas e, em seguida, submetido à purificação prévia com Hexano (50g de rizoma/300 ml de Hexano) pelo método de maceração por 07 dias. Após o procedimento de pré-purificação, o material foi submetido à extração com acetona: água (7:3; v/v) pelo método de maceração durante 07 dias. Após a extração, o líquido extrator foi seco em rotaevaporador, em temperatura inferior a 45° e quantificado por gravimetria. O extrato seco foi submetido ao fracionamento por partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades, obtendo assim frações semi-purificadas. Resumidamente, o extrato foi re-suspenso em água destilada (20g extrato/150 ml H<sub>2</sub>O) e submetido à partição líquido-líquido, em funil de separação, com acetato de etila (50mL, por 3 vezes) e, em seguida com n-butanol (50mL, por 3 vezes), fornecendo ao final 03 frações semi-purificadas: fração aquosa (FrAq); fração de acetato de etila (FrAcE) e fração butanólica (FrBut). Após o

procedimento de purificação, as frações obtidas foram secas em rotaevaporador e quantificadas por gravimetria (FARIA, 2009).

### **3. Análise Fitoquímica**

As frações semi-purificadas foram submetidas à análise fitoquímica preliminar, através do emprego de ensaios cromáticos e/ou precipitação para a pesquisa de Flavonóides e Taninos, classes de metabólitos vegetais polifenólicos bioativos, aos quais foram atribuídos funções importantes na proteção vegetal contra patógenos e outros agentes agressores, apresentando a propriedade de inibir a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos (SIMÕES *et al.*, 2007). A pesquisa de Flavonóides foi realizada através do emprego das reações: Shinoda ou Cianidina; reação com hidróxido de sódio; reação com cloreto férrico (COSTA, 1970); reação com ácido sulfúrico concentrado (SIMÕES *et al.*, 2007). A pesquisa de Taninos foi realizada através da realização dos ensaios: reação com acetato de chumbo; reação com acetato de cobre; reação com gelatina; reação com sais de ferro (COSTA, 1970).

### **4. Testes de susceptibilidade in vitro de leveduras de *Candida* spp**

Para realização dos testes de susceptibilidade às frações semi-purificadas, foi utilizado o método de macrodiluição em caldo, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo NCCLS (2002) e COLOMBO (1994), com modificações.

#### **4.1 Preparo das soluções-estoque para os testes de susceptibilidade**

As três frações semi-purificadas (FrAq, FrAcE e FrBut) foram re-suspensas em etanol 30% a modo de se obter a concentração final de 100 mg de extrato seco/mL, sendo então esta solução denominada de “solução estoque”.

#### **4.2 Cultivo de fungos e preparação do inóculo**

Culturas de *Candida* spp foram mantidas em caldo Sabouraud-dextrose em temperatura de 35°C, com ao menos três repiques sucessivos de 24 horas previamente ao experimento. As espécies e cepas utilizadas no presente estudo foram: *Candida albicans* ATCC 64548; *Candida tropicalis* ATCC 750; *Candida glabrata* ATCC 80030; *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Para a realização dos ensaios de susceptibilidade, no dia do experimento as leveduras foram contadas e a suspensão do inóculo será ajustada para  $2,5 \times 10^3$  céls/mL com meio Sabouraud-dextrose.

#### **4.3 Diluição em caldo realizada em tubos (Macrodiluição)**

A partir das soluções-estoque as frações semi-purificadas foram diluídas em caldo Sabouraud-dextrose e distribuídas em tubos esterilizados, de modo a obter-se 0,1 mL de 10 vezes as concentrações finais desejadas do extrato. Para essa finalidade, a partir da solução estoque (100 mg/mL), diluições sucessivas foram realizadas para obter-se uma série de cinco

concentrações variando de 100 a 6,25 mg/mL (10 vezes as concentrações finais desejadas das frações). No dia do experimento, a suspensão inicial do inóculo do microrganismo foi preparada de acordo com a metodologia descrita no item 4.2. Terminada a preparação, 0,9 mL do inóculo foi dispensada em cada tubo contendo 0,1mL do extrato de 10 vezes as concentrações desejadas das frações. Ao deste procedimento, o inóculo foi testado em cinco tubos contendo as concentrações finais variando de 10 a 0,625 mg/mL de extrato seco. Adicionalmente, para cada ensaio, foi preparado um tubo-controle negativo contendo apenas o diluente do extrato e a solução meio-inóculo e outro tubo controle positivo contendo fluconazol (1,6 µg/mL). Os tubos foram incubados a 35°C por 48 horas. Decorrido o tempo de incubação, as leveduras foram lavadas em caldo Sabouraud-dextrose estéril (0,1mL do tubo teste + 0,9 mL meio estéril), semeadas em meio semi-solido Ágar Sabouraud-dextrose (0,1 mL do lavado) e incubadas a 35°C por 24 horas.

#### **4.4 Leitura e interpretação dos resultados**

Após 24 horas de incubação, a menor concentração capaz de inibir o crescimento do microrganismo foi definida como a Concentração fungicida mínima (CFM) do extrato para este microrganismo. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos 03 vezes.

### **Resultados e Discussão**

Os avanços científicos na área da Farmacologia de Produtos Naturais têm revelado diversos compostos bioativos presentes em vegetais, oriundos do seu metabolismo secundário, ampliando as possibilidades de aplicação das plantas como fonte direta de medicamentos ou inspirando a síntese de novas substâncias a partir das estruturas moleculares descobertas.

O emprego de medicamentos para o tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. é limitado a um número pequeno de agentes antifúngicos, o que inclui a classe dos poliênicos como a nistatina e a anfotericina B; a classe dos azólicos, dentre eles o itraconazol e o fluconazol (AVRELLA & GOLART, 2008); e a classe das equinocandinas, como a caspofungina. O número restrito de classes de antifúngicos atualmente disponíveis e um aumento observado na resistência a estes fármacos e os seus efeitos adversos levam a um crescente interesse pela pesquisa de novos medicamentos antifúngicos. No presente estudo aliou-se a necessidade da obtenção de alternativas o tratamento da candidíase com o conhecimento prévio da presença de compostos polifenólicos em *Typha domingensis* (SILVA, 2010).

Após o fracionamento do extrato obtido a partir dos rizomas de *Typha domingensis*, observou-se a presença de flavonóides apenas nas frações de acetato de etila e butanólica, pertencentes às classes das flavonas, flavanonas e flavonóis. Taninos do tipo hidrolisáveis foram detectados na fração butanólica e taninos do tipo condensados foram detectados na fração aquosa. Não foram identificados taninos na fração de acetato de etila (Tabela 1).

Os ensaios de susceptibilidade revelaram atividade fungicida nas quatro espécie de *Candida* spp testadas para a fração de acetato de etila (FrAcE), na concentração fungicida mínima (CFM) de 10mg/mL (Tabela 2). As outras duas frações não apresentaram atividade fungicida nas concentrações testadas.

**Tabela 1. Análise fitoquímica das frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma *Typha domingensis***

Frações	Flavonas	Flavanonas	Flavonóis	Taninos Hidrolisáveis	Taninos Condensados
FrAq	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
Fr But	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
Fr AcE	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

Legenda: (+) indica a presença do metabólito secundário vegetal; (-) indica a ausência do metabólito.

**Tabela 2. Atividade antifúngica *in vitro* das frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma *Typha domingensis* em culturas de *Candida* spp**

Frações (10mg/mL)	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>
FrAq	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr But	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr AcE	(+)	(+)	(+)	(+)

Legenda: (+) apresentou atividade fungicida; (-) não apresentou atividade fungicida.

A atividade fungicida observada para a fração de acetato de etila possivelmente está associada a presença de flavonoides, uma vez que já foram atribuídas atividades antimicrobianas a esta classe de compostos polifenólicos (SIMÕES et al., 2007). Durante séculos, preparações contendo flavonóides têm sido empregadas por médicos e curandeiros na tentativa de curar doenças. Por exemplo, o uso de preparações de própolis era prescrito por Hipócrates na antiga Grécia para o tratamento de feridas e ulcerações. As atividades

antimicrobianas do própolis foram atribuídas ao seu alto teor de flavonóides. A Galangina, um flavonol comumente encontrado em preparações de própolis, apresentou atividade inibitória contra *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicilium digitatum* e *P. italicum* (CUSHNIE, 2005).

Vários estudos demonstram o papel dos flavonóides na defesa vegetal contra patógenos, seja como componentes pré-formados ou ainda como fitoalexinas. As classes de flavonoides mais frequentemente associadas com atividade antifúngica são: flavanonas; flavanas; flavonas e flavonóis (HARBORNE & GRAYER, 1994; HARBORNE & WILLIAMS, 2000). As análises fitoquímicas da fração FrAcE demonstraram a presença de flavonóides da classe das flavanonas, flavonas e flavonóis, fato que reforça o possível envolvimento dos flavonóides desta fração para a atividade antifúngica observada nos testes *in vitro*. As mesmas classes de flavonóides também foram observadas na FrBut, porém as concentrações e as estruturas moleculares destes flavonóides podem diferir entre as duas frações (FrAcE e FrBut).

Os resultados obtidos a partir do presente estudo foram promissores, mostrando novas perspectivas de estudos para o desenvolvimento de um novo medicamento antifúngico para tratar a candidíase, através do isolamento dos flavonóides presentes na fração de acetato de etila (FrAcE), podendo também resultar numa diminuição da concentração fungicida mínima (CFM).

## Conclusões

No presente trabalho observou-se atividade antifúngica da fração semi-purificada de acetato de etila, obtida a partir dos rizomas da *Typha domingensis* Pers, para as quatro espécies de *Candida* spp testadas, com valores de CFM de 10 mg/mL. A partir dos resultados obtidos através das análises fitoquímicas, a atividade fungicida observada possivelmente está associada à presença de flavonoides nessa fração (FrAcE).

## Referências Bibliográficas

AVRELLA, D.; GOULART, L.S. (2008). Isolamento de *Candida* spp da mucosa oral de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico. RBAC, v.40(3), p.205-207.

COLOMBO, A.L. (1994). Avaliação *in vitro*, por três métodos, da sensibilidade de leveduras a antifúngicos azólicos [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo.

COSTA, A.F. (1970). **Farmacognosia**. 2ª Edição, Volume III, 1970 [s.n].

CUSHNIE T.P.; LAMB, A.J. (2005). Antimicrobial activity of Flavonoids. **International journal of Antimicrobial Agents**; 26: 343-56.

DE OLIVEIRA, C.; FERREIRA, J.A.; DO AMARAL TOMA, M (2010). Análise Fitoquímica Preliminar do Extrato Etanólico Obtido a Partir do Rizoma da *Typha domingensis* pers. **Revista Ceciliana**. Dez 2(2): 17-19.

DROUHET, E. (2010). Historical Introduction: Evolution of Knowledge of the Fungi and Mycoses from Hippocrates to the Twenty-First Century. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**.

FARIA, F.M.. Determinação dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e antioxidante de *Rhizophora mangle* L. **Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**. Departamento de Biologia Funcional e Molecular. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

FERREYRA, M.L.F.; RIUS, S.P.; CASATI, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**. September. Vol. 3.

GIULIETTI. A.M.; HARLEY, R.M.; DE QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**. Volume 1; nº 1; Julho 2005.

HARBORNE, J.B.; GRAYER, R.J. (1994). A Survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. **Phytochemistry**; 37:19-42.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A.. (2000). Advances in flavonoid research since. **Phytochemistry**, Volume 55, Issue 6, November, p. 481-504.

NCCLS (2002). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada — Segunda Edição. **NCCLS document**. Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.

RANGARI, V.D. (2007). Tannin Containing Drugs. **Pharmacognosy**.

RUKUNGA, G.M.; KOFI-TSEKPO, M.W.; KUROKAWA M., KAGEYAMA, S.; MUNGAI, G.M.; MULI, J.M.; TOLO, F.M.; KIBAYA, R.M.; MUTHAURA, C.N.; KANYARA, J.N.; TUKEI, P.T.; SHIRAKI, K. (2002). Evaluation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitory properties of extracts from some medicinal plants in Kenya . **African Journal of Health Sciences**. 81-90.

SILVA, C.F.; ATHAYDE, A.C.R.; SILVA, W.W.; RODRIGUES, O.G.; VILELA, V.L.R.; MARINHO, P.V.T..(2010). Avaliação da eficácia de taboa (*Typha domingensis* Pers.) e batata-de-purga [*Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples] *in natura* sobre nematoides gastrintestinais de caprinos, naturalmente infectados, em clima semi-árido. **Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu**, v.12, n.4, p.466-471.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS Editora/ Editora da UFSC, 2007. 1104 p.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Disponível em: <[http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs\\_tydo.pdf](http://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_tydo.pdf)>. Acesso em 26 de jun. de 2013.

VASCONCELOS, J.F.; TEIXEIRA, M.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; NUNES, X.P.; GIULIETTI, A.M.; DOS-SANTOS, R.B.; SOARES, M.B.P. (2009). Effects of umbelliferone in a murine model of allergic airway inflammation. **European Journal of Pharmacology**, Volume 609 (1–3), 126-131.