
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DAS FRAÇÕES DA ENTRECASCA DE *Guapira graciliflora* (Mart. ex Schmidt) Lundell (Nyctaginaceae)

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE BARK FRACTIONS OF *Guapira graciliflora* (Mart. ex Schmidt) Lundell (Nyctaginaceae)

COLARES¹ Aracelio Viana; TAVARES, Maria Alice Alves; RIBEIRO, Isadora Maria de Oliveira; FONSECA, Victor Juno Alencar; RODRIGUES, Fábola Fernandes Galvão.
Centro Universitário Doutor Leão Sampaio

Recebido: 19/12/2017; Aceito: 10/01/2018; Publicado: 22/03/2018

RESUMO

A espécie *Guapira graciliflora* é encontrada na caatinga e no semiárido do Brasil e comumente utilizado por comunidades como medicinal no tratamento de tuberculose, como cicatrizante e anti-inflamatório. O objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o potencial antibacteriano das frações da entrecasca de *G. graciliflora*. Na realização da atividade antibacteriana foram utilizadas culturas padrões de *Escherichia coli* (ATCC 10536 e EC 27), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932 e SA358) e *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 15442 e PA 03) reavivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas por 24 horas a 37 ± 2 °C. As frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica da extracasca de *G. graciliflora* foram avaliadas utilizando a metodologia de microdiluição em caldo. A fração hexânica da foi a que apresentou resultado clínico relevante (CIM ≤ 512 µg/mL) frente às cepas de *E.coli* (ATCC 10536), *P. aeruginosas* (ATCC 15442) com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 64 µg/mL, para ambas e *S. aureus* (ATCC 25932) com uma CIM de 32 µg/mL. Para atividade modulatória com os antibióticos Amicacina, Neomicina e Canamicina a fração hexânica, também apresentou melhor resultado, com efeito sinérgico frente a *E. coli* (ATCC 10536) quando modulado com neomicina. Os resultados demonstram que a fração hexânica da entrecasca de *G. graciliflora* foi a que melhor apresentou atividade antibacteriana frente a linhagens Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) quanto Gram-negativas (*Escherichia coli*) quando testada isoladamente, representando potencial atividade moduladora de resistência bacteriana a aminoglicosídeos a partir de uma fonte de produtos naturais.

Palavras-chave: Antibacteriano. Frações. *Guapira graciliflora*.

ABSTRACT

The species *Guapira graciliflora* is found in the caatinga and semi-arid regions of Brazil and is commonly used by communities as medicinal in the treatment of tuberculosis, as cicatrizant and anti-inflammatory. The objective of the present study was to evaluate *in vitro* the antibacterial activity of the bark fractions of *Guapira graciliflora*. In order to perform the antibacterial activity, standard cultures of *Escherichia coli* (ATCC 10536 e EC 27), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932 e SA358) e *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 15442 e PA 03) were used in Brain Heart Infusion medium (BHI) and incubated for 24 hours at 37 ± 2 °C. The hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol fractions of *G. graciliflora* were examined in broth microdilution methodology. The hexane fraction was the that presented clinical relevance results (MIC ≤ 512 µg/mL) against strains of *E.coli* (ATCC 10536) and *P. aeruginosas* (ATCC 15442) with a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 64 µg/mL, for both and *S. aureus* (ATCC 25932) with a MIC of 32 µg/mL. For the modulatory activity with the antibiotics Amikacin, Neomycin and Kanamycin the hexanic fraction also, was presented better result, with synergistic effect against *E. coli* (ATCC 10536) when modulated with neomycin. The results of the inhibitory activity demonstrated that the hexachronic fraction of *G. graciliflora* was found to be anti-bacterial activity against Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) and Gram-negative strains (*Escherichia coli*) when tested alone, representing potential bacterial resistance modulating activity to aminoglycosides from a source of natural products.

Keywords: Antibacterial. Fractions. *Guapira graciliflora*.

¹ Rua Eduardo Ferreira Lima, 43. Mirandão, Crato, Ceará. CEP: 63125-240. E-mail: avcolares@gmail.com. Telefone: (88) 996391064

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a resistência dos microorganismos a novos antibióticos ou drogas modificadas vem aumentando.

Nesse sentido surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas para o combate de infecções (YADAV et al. 2015; SIMONETTI et al, 2016). Esses e outros fatores, como econômicos e sociais, vêm contribuindo para o desenvolvimento de práticas de saúde que incluam cada vez mais a participação de plantas medicinais (FERRAZ FILHA, et al., 2012). As plantas produzem substâncias para sua própria defesa em resposta a um ataque patogênico, essas substâncias podem tornar-se alvo de pesquisas relevantes da ação inibitória do crescimento bacteriano com baixa toxicidade (RASHID et al, 2013).

A família Nyctaginaceae compreende cerca de 300 a 400 espécies, distribuídas em aproximadamente 30 gêneros, incluindo árvores, arbustos e ervas que produzem betalainas, mas não antocianinas (DOUGLAS e MANOS, 2007; LEVIN et al, 2003). A sua distribuição geográfica é essencialmente tropical. No Brasil são encontrados mais de 10 espécies do gênero *Guapira*, *G. opposita*, *G. venosa*, *G. hirsuta*, *G. nítida*, *G. obtusata*, *G. pernambucensis*, *G. tomentosa*, *G. areolata*, *G. campestris*, *G. graciliflora* e *G. noxia*, existentes em todas as regiões, com exceção da região amazônica que apresenta baixa frequência de ocorrência (FURLAN, 1996).

Os poucos estudos referentes à composição química e atividade farmacológica realizados com espécies pertencentes à família Nyctaginaceae evidenciou a presença de uma ampla variedade de classes de metabólitos como ácidos graxos, esteróides, triterpenos, flavonóides e em menor ocorrência alcalóides, saponinas, rotenóides, xantonas, lignanas e lactonas (SEVERI, 2007).

Estudos realizados com o extrato metanólico das folhas da espécie *G.noxia*, conseguiu identificar oito heterosídeos de flavonóides derivados da quercetina, da isorhamnetina e do kaempferol, além de alantofina e de um ciclitol. O estudo farmacológico evidenciou, ainda, atividades antiúlceras, antimicrobiana e imunomodulatória (SEVERI, 2007).

A espécie *G.graciliflora* é conhecida popularmente como pau-piranha e suas cascas são utilizadas por comunidades no interior do Brasil como detentora de efeito antibiótico e cicatrizante, usadas rotineiramente para o tratamento de indivíduos com ferimentos na pele e também para o tratamento de afecções endógenas (COELHO et al., 2005). Contudo, na literatura não há registros de estudos de natureza fitoquímica ou farmacológica com esta espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

A espécie *Guapira graciliflora* encontra-se depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato – CE, Brasil, sob o número de registro 4841.

Obtenção das frações da entrecasca de *Guapira graciliflora*

As frações foram obtidas a partir do extrato etanólico da entrecasca de *G. graciliflora* por filtração à vácuo utilizando funil de Büchner e kitassato acoplado a bomba à vácuo. O extrato etanólico (25,0 g) foi macerado

em sílica gel 60 G até obtenção de uma farofa homogênea, onde posteriormente foi tratado com os solventes hexano, clorofórmio, acetato e metanol em ordem crescente de polaridade.

Microrganismos

Foram utilizadas cinco culturas padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, *Escherichia coli* (ATCC 10536 e EC 27), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932 e SA358) e *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 15442 e PA 03).

Avaliação da atividade antimicrobiana - Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Previamente aos testes, as cepas bacterianas foram reavivadas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI 3,8%) para o crescimento bacteriano (24 h, 37 ± 2°C). Após este subcultivo, o inóculo foi padronizado a partir de uma suspensão bacteriana a uma concentração final de aproximadamente 1 x 10⁸ UFC/mL (0,5 unidades de turbidez nefelométrica - escala McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída a 1 x 10⁶ UFC/mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram adicionados e então homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações das frações de *Guapira graciliflora*, resultando num inóculo final de 5 x 10⁵ UFC/mL (COUTINHO et al., 2008; NCCLS, 2002).

As frações foram diluídas em seus respectivos solventes para se obter a concentração de 1024 µg/mL. Outras diluições seriadas foram realizadas através da adição de caldo BHI para atingir uma concentração final no intervalo de 512 a 8 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as placas de microdiluição foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. A atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico pela adição de 25 µL de solução de resazurina sódica (0,01%) após o período de incubação de uma hora a temperatura ambiente, a leitura dos resultados foi considerada como positivo para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa para os que obtiveram coloração vermelha (COUTINHO et al., 2008).

Atividade moduladora por contato direto

A partir dos dados obtidos nos testes de microdiluição foi iniciado o teste de atividade moduladora por contato direto. A suspensão bacteriana foi diluída a 1 x 10⁶ UFC/ mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram então homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição acrescido de diferentes concentrações dos antibióticos neomicina (NEO), amicacina (AMI) e canamicina (CAN) e das frações utilizando o valor do CIM/8 para os resultados com CIM ≤ 512 µg/mL. Os antibióticos foram solubilizados inicialmente em água de forma a obter-se uma solução estoque de 1024 µg/mL. As concentrações finais dos antibióticos no meio de cultura foram de 512 a 1 µg/mL. Os testes foram efetuados em triplicata. As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C durante 24 horas. Para a revelação dos resultados foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada na concentração de 0,01%. Após a incubação, 25 µL da solução indicadora foi adicionada em cada cavidade e as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. O controle negativo do teste foi realizado com o caldo BHI.

A modulação determina o efeito sinérgico e/ou antagônico das frações frente aos antibióticos aminoglicosídeos. Os antibióticos utilizados possuem perfil de resistência para: *S. aureus* (SA358) (Neomicina, Amicacina e Canamicina), *E. coli* (EC27) (Amicacina e Canamicina) e *P. aeruginosa* (PA03) (Amicacina). A leitura dos resultados para determinação da modulação foi considerada como positivo para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa para os

que obtiveram coloração vermelha (COUTINHO et al., 2008).

Análise estatística

Para a análise estatística os dados foram expressos pela média geométrica e desvio padrão submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de significância Bonferroni, considerando diferença significativa para quando $p < 0,01$, utilizando o software GraphPad Prisma 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As atividades antimicrobianas a partir de produtos naturais têm sido estudadas e comprovadas por meio de diversas pesquisas científicas em diversos países. A eficácia desses produtos, geralmente é confirmada utilizando ensaios biológicos *in vitro* (DUTRA et al., 2016)

Na tabela 1 a partir dos resultados apresentados na obtenção do CIM à fração hexânica da *G. graciliflora*, foi a que apresentou resultado relevante (CIM \leq 512 $\mu\text{g/mL}$) para algumas linhagens testadas. Com isso, realizou-se teste para avaliar o potencial modulador por contato direto (COUTINHO et al, 2009).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das frações do extrato etanólico da entrecasca de *Guapira graciliflora*

Fração	Bactérias					
	<i>E. coli</i> ATCC10536	<i>E. coli</i> EC27	<i>S. aureus</i> ATCC 25932	<i>S. aureus</i> SA 358	<i>P. aeruginosas</i> ATCC 15442	<i>P. aeruginosas</i> PA 03
Hexano	≥ 64	≥ 512	≥ 32	≥ 512	≥ 64	≥ 1024
Clorofórmio	≥ 512	≥ 512	≥ 512	≥ 512	≥ 512	≥ 1024
Acetato de etila	≥ 512	≥ 1024	≥ 512	≥ 1024	≥ 512	≥ 1024
Metanol	≥ 512	≥ 1024	≥ 1024	≥ 512	≥ 1024	≥ 1024

Valores expressos em $\mu\text{g/mL}$.

No teste de modulação com antibióticos aminoglicosídeos, as frações de *G. graciliflora* apresentaram tendência ao antagonismo em quase todas as cepas bacterianas testadas. Entretanto, a fração hexânica do extrato etanólico de *G. graciliflora*

demonstrou potencial sinérgico com redução do CIM frente a *E. coli* ATCC 10536 quando associado ao antibiótico Neomicina (Tabela 2 e 3)

Tabela 2: Atividade moduladora da fração hexânica e clorofórmica de *G. graciliflora*.

Bactérias	Antibiótico			Ant. + FHGg			Ant. + FCGg		
	NEO	AMI	CAN	NEO	AMI	CAN	NEO	AMI	CAN
<i>E. Coli</i> ATCC 10536	64	16	256	32	16	256	>512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25932	32	16	256	64	16	256	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosas</i> ATCC 15442	32	16	256	64	64	256	>512	>512	>512

NEO: Neomicina; AMI: Amicacina; CAN: Canamicina; Ant.: Antibiótico; FHGg: Fração Hexânica de *G. graciliflora*; FCGg: Fração Clorofórmica de *G. graciliflora*. Valores expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3: Atividade moduladora da fração acetato de etila e metanólica de *G. graciliflora*.

Bactérias	Antibiótico			Ant. + FAEGg			Ant. + FMGg		
	NEO	AMI	CAN	NEO	AMI	CAN	NEO	AMI	CAN
<i>E. Coli</i> ATCC 10536	64	16	256	>512	>512	>512	>512	256	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25932	32	16	256	>512	>512	>512	256	64	>512
<i>P. aeruginosas</i> ATCC 15442	32	16	256	>512	>512	>512	>512	256	>512

NEO: Neomicina; **AMI:** Amicacina; **CAN:** Canamicina; **Ant.:** Antibiótico; **FAEGg:** Fração Acetato de Etila de *G. graciliflora*; **FMGg:** Fração Metanólica de *G. graciliflora*. Valores expressos em µg/mL

A prospecção química preliminar da fração hexânica do extrato etanólico da entrecasca de *G. graciliflora* (dados não publicados) revelou a presença de alcalóides, flavonóides e taninos condensados, classes de metabólicos secundários com conhecidos efeitos antimicrobianos (RAUHA et al., 2000). Solventes apolares, como o hexano, possibilitam a extração de diversos metabólitos secundários como esteroides, cumarinas, ésteres do ácido oleanóico, terpenóides, sesquiterpenos, dentre outros (CARVALHO e CARVALHO, 2001). Isso demonstra que, possivelmente, os compostos secundários presentes na fração hexânica estão agindo em microrganismos com grandes diferenças metabólicas e estruturais como a membrana externa e a presença de cápsula (AYRES et al., 2008).

CONCLUSÃO

Os resultados da atividade inibitória indicam que a fração hexânica do extrato etanólico da entrecasca de *G. graciliflora* possui um efeito inibidor clinicamente relevante quando testado tanto em bactérias de linhagens Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) quanto Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). Quando combinado com o antibiótico neomicina, com o objetivo de avaliar a interferência no perfil de resistência bacteriana a aminoglicosídeos, a fração hexânica demonstrou ação sinérgica estatisticamente significativa ($p < 0,001$) frente à cepa de *E. coli* (ATCC 10536). Os resultados apresentados sugerem a possibilidade de continuação da pesquisa a fim de se direcionar a purificação e o isolamento de compostos metabólicos vegetais que estejam atuando diretamente na atividade antibacteriana observada nesses ensaios preliminares.

Reforçando, nesse sentido, a busca de alternativas de terapias que possam subsidiar o aparecimento de novos produtos farmacologicamente e quimicamente ativos a partir de estudos de produtos naturais existentes no Brasil

REFERÊNCIAS

ALVES T.M.A.; SILVA A.F.; BRANDÃO M.; GRANDI T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; JUNIOR, A.S.; ZANI C.L., Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 93, n. 3, p. 367-373, 2000. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>

AYRES, M.C.C.; BRANDÃO, M.S.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S.; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista**

Brasileira de Farmacognosia. v.18, p.90-97,2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000100017>

CARVALHO, G.J.A.; CARVALHO, M.E. Estudo sobre a presença de antibióticos nos vegetais. **Química Nova**. v. 24, p.24-26, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170126>

COELHO, F. B. R.; DAL BELO, C. A.; LOLIS, S. F.; DOS SANTOS, M. G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade Mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento** v. 2 (2), 52-55, 2005.

COLE, M.D.; Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays – a critical review. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 22, p. 837-856, 1994.

COUTINHO, Henrique D. M.; COSTA, José G. M.; SIQUEIRA-JUNIOR, José P. and LIMA, Edeltrudes O. In vitro anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. vol.18,p.670-675, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000500005>.

COUTINHO, H.D.M.; COSTA, J.G.M.; LIMA, E.O.; FALCÃO-SILVA, V.S.; JÚNIOR, J.P.S. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.9, p.1-4, 2009. DOI:

DOUGLAS, N. A. e MANOS, P. S. Molecular Phylogeny of Nyctaginaceae: Taxonomy, Biogeography, and Characters Associated with a Radiation of Xerophytic Genera in North America.

- American Journal of Botany**. v. 94, p.856-872, 2007.
- DUTRA, F.S.G.; CARLOS, L.A.; MOTTA, O.V.; VIANNA, A.P.; PEREIRA, S.M.F. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais frente à bactérias de importância médica. **Perspectivas on-line: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 20, p.1-13, 2016.
- FERRAZ FILHA, Z. S.; LOMBARDI, J.A.; GUZZO, L.S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Brine shrimp (*Artemia salina* Leach) bioassay of extracts from *Lychnophoriopsis candelabrum* and different *Lychnophora* species. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 358-361, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000200016>
- FURLAN, A. **A tribo Pisonieae Meisner (Nyctaginaceae) no Brasil**. São Paulo: IBB/ USP. 1996. 359f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 1996. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2316-9052.v32i2p145-268>
- LEVIN, R. A.; MCDADE, L. A.; RAGUSO, R. A. The Systematic Utility of Floral and Vegetative Fragrance in Two Genera of Nyctaginaceae. **Systematic Biology**. v.52, p.334-351, 2003.
- MATOS, F.J.A.; **Introdução à fitoquímica experimental**. UFC Edições. p. 44-46, 1997.
- NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, 6th ed. NCCLS document M7-A6. NCCLS, Wayne, Pa. 2003. NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement**. NCCLS document M100-S12. NCCLS, Wayne, Pa. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-3-1>
- RASHID, U.; KHAN, M. R.; JAN, S.; BOKHARI, J.; SHAH, N A. Assessment of phytochemicals, antimicrobial and cytotoxic activities of extract and fractions from *Fagonia olivieri* (Zygophyllaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v.13, p. 1-7, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-167>
- RAUHA, J. P.; REMES, S.; HEIMONEN, M.; HOPIA A.; KAHKONEM, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VURUOELA, H. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**. v. 56, p.3-12, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X)
- SEVERI, J.A. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira Prospecção químico-farmacológica de plantas superiores: Guapira noxia (Nyctaginaceae)**. São Paulo: FCF/UNESP. 2007.89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2007.
- SIMONETTI, E.; ETHUR, M.E.; CASTRO, L.C.; KAUFFMANN, C.; GIACOMIN, A.C.; LEDUR, A.; AROSSI, K.; PACHECO, L.A.; GOETTERT, M.I.; FALEIRO, D.; FREITAS, E.M. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.18, p.9-18, 2016. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_005
- VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S.; ERNST, E.; KLEPSE, M.; DEMIRCI, B.; BASER, H.; VAN, W.Y.K.; *Osmitopsis astericoides* (Asteraceae) - the antimicrobial activity and essential oil composition of a Cape-Dutch remedy. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 88, p.137-143, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00191-0)
- YADAV, D.; KUMAR, A.; KUMAR, P.; MISHRA, D. Antimicrobial properties of black grape (*Vitis vinifera* L.) peel extracts against antibiotic-resistant pathogenic bacteria and toxin producing molds. **Indian Journal of Pharmacology**, v.43, p.663-667, 2015. DOI: **10.4103/0253-7613.169591**