

## COLEÇÃO FICOLÓGICA E A IMPORTÂNCIA DO REGISTRO HISTÓRICO DE MACROALGAS PARA A BIODIVERSIDADE MARANHENSE

Ana Carolina de Araújo Butarelli<sup>1</sup>, Marlla Maria Barbosa Arouche<sup>1</sup>, Eduardo Bezerra de Almeida Jr.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação (PPGBC). Av. dos Portugueses, 1966 - Vila Bacanga, São Luís - MA, 65080-805

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo (USP). Praça do Oceanográfico, 191 - Cidade Universitária, Butantã, São Paulo - SP, 05508-120

### RESUMO

Os acervos biológicos destacam-se por ser uma fonte de dados sobre os diferentes organismos, apresentando um grande e inestimado valor histórico e cultural. Diante disso, o presente estudo teve o objetivo de registrar a importância histórica do acervo de macroalgas existente no Herbário do Maranhão (MAR) devido à necessidade de conservação desse acervo. A coleção ficológica foi organizada pela Profa. Maria Marlúcia, e teve seu início com a coleta da alga marinha *Catenella caespitosa* (Florideophyceae) em 1985. A partir de então, foi iniciado o levantamento de macroalgas marinhas bentônicas do Maranhão, sendo doada para o Herbário MAR, em 2013. Apesar do litoral maranhense ser o segundo maior litoral do Brasil, os estudos sobre as algas não são proporcionais à extensão litorânea do Estado. Assim, o presente estudo buscou evidenciar a importância histórica do registro das macroalgas e a necessidade de mais estudos para ampliar o conhecimento sobre as macroalgas que compõem o Maranhão.

Palavras-chave: Herbário MAR, algas, inventário, Nordeste do Brasil.

### PHICOLOGICAL COLLECTION AND THE IMPORTANCE OF HISTORICAL RECORD OF BENTHIC MARINE ALGAE FOR THE BIODIVERSITY OF MARANHÃO STATE

### ABSTRACT

Biological collections stand out for being a source of data on different organisms, presenting a great and inestimated historical and cultural value. In addition, the present study aimed to record the historical importance of the existing macroalgae collection in the Herbarium of Maranhão (MAR) due to the need to preserve this collection. The ficological collection was organized by the professor Maria Marlúcia, and started with the collection of seaweed *Catenella caespitosa* (Florideophyceae) in 1985. From that period, it started the survey of marine benthic macroalgae in the state of Maranhão, being donated to Herbarium MAR in 2013. Although the coast of the state of Maranhão is the second largest coast in Brazil, the algae studies are not proportional to the coastal extension of Maranhão state. Thus, the present study sought to highlight the historical importance from the record of macroalgae and the need for further studies to expand knowledge about the macroalgae that compound Maranhão state.

Key Words: Herbarium MAR, algae, inventory, Northeast of Brazil.

### INTRODUÇÃO

As coleções biológicas constituem uma fonte importante de informações sobre aspectos ecológicos, ambientais e biológicos, fornecendo dados para avaliação de impactos ambientais; além de apresentar um grande e inestimado valor histórico e cultural para as ciências naturais (Causay *et al.*, 2004). O Brasil tem o seu registro da diversidade centrado em vegetação terrestre, especialmente angiospermas, tendo maior representatividade nas

coleções botânicas de plantas vasculares (Bicudo & Menezes, 2010). Diante disso, as coleções que compreendem algas recebem menos destaque porque, muitas vezes, ficam “incluídas” no mesmo acervo das plantas vasculares (Maia, 2003).

Com o passar dos anos e aumento dos estudos acerca da diversidade da flora, os herbários se tornaram um alicerce para instituições de pesquisa, por servir como um local para abrigar os registros referentes aos estudos botânicos realizados e também por conter coleções históricas significativas,

incluindo: registros de novas espécies, conjuntos de exsicatas que compõem as bases dos estudos florísticos (Monteiro & Siani, 2009), registros de macroalgas, entre outros. Hoje, o termo “Herbário” é atribuído à uma coleção de plantas desidratadas, ou parte destas que são preparadas para estudos comparativos posteriores, históricos e como documentários da flora de uma região ou país (Resende & Guimarães, 2007; Dias *et al.*, 2019).

Os herbários passaram a ser também reconhecidos como instrumentos essenciais para pesquisas filogenéticas e agrônômicas, a partir da utilização do material genético das exsicatas (Valls, 1998). Apesar deste material ser de difícil obtenção, devido à presença de diversos inibidores (Mazo, 2012), essa abordagem tem sido utilizada como uma ferramenta para resolução de conflitos taxonômicos em diversos grupos vegetais (Kaplan, 2010).

Além de dados genéticos, os herbários destacam-se, especialmente, como apoio para estudos da biodiversidade, fornecendo dados valiosos que podem ser utilizados para enquadrar as espécies vegetais em diferentes categorias, como ameaçadas, vulneráveis, ou mesmo em extinção (Longhi-Wagner, 1998). Os estudos sobre a biodiversidade se apoiam na elaboração correta de listas florísticas que são essenciais para a identificação e conhecimento da flora local (Dias *et al.*, 2019), servindo de base para estudos ecológicos sobre os ecossistemas onde esses organismos estão inseridos (Siani, 2003).

As macroalgas apresentam várias classificações, o que torna sua organização confusa e complexa. Isso ocorre porque esse grupo engloba integrantes que apresentam diferentes substâncias de reserva, presença ou ausência dos flagelos, ciclos de vida diferentes, entre outros. Diante disto, os autores acabam divergindo na sua classificação taxonômica e no número de espécies (De Carvalho & Roque, 2000; Reviere, 2006; El Gamal, 2010). Bicudo & Menezes (2010) estimaram em cerca de 5.614 o número de espécies conhecidas no país; mais recentemente, o BFG - The Brazil Flora Group (2015) atualizaram os dados e relataram que existem cerca de 4.747 espécies de algas reconhecidas para o Brasil. A imprecisão do número de espécies existentes no Brasil demonstra a necessidade de mais estudos com esses grupos para melhor elucidar a diversidade ficológica do Brasil.

Considerando as exsicatas da coleção ficológica do Herbário do Maranhão (MAR), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) (Almeida Jr., 2015), que é composta por macroalgas que são classificadas como organismos

aquáticos fotossintetizantes semelhantes as plantas e por conta disso são comumente confundidas (Sudhakar *et al.*, 2018), mas que diferem das plantas por não apresentarem os tecidos condutores, xilema e floema. Esses organismos contêm clorofila, que junto com os outros tipos de substâncias, como os carotenoides, influenciam nas cores que as macroalgas apresentam (Streit *et al.*, 2005).

Diante desse contexto, a coleção ficológica é uma alternativa para promover o conhecimento dessas espécies e auxiliar em futuros estudos. Isso torna as coleções de macroalgas vitais para a ciência e para a sociedade, no que diz respeito a conservação da biodiversidade (Chavan & Krishnan, 2003). Com isso, o presente estudo teve como objetivo resgatar e registrar a importância histórica do acervo de macroalgas existente no Herbário do Maranhão (MAR) e destacar a necessidade de conservação desse acervo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido a partir da coleção de macroalgas existente no Herbário do Maranhão (MAR). Cabe destacar que o Herbário está vinculado ao projeto do INCT - Herbário Virtual da Flora e dos Fungos, além de fazer parte da Rede Brasileira de Herbários (Almeida Jr., 2015) e no *Index Herbariorum* (<http://sweetgum.nybg.org/science/ih/herbarium-details/?irn=250407>).

A coleção ficológica foi iniciada no Laboratório de Hidrobiologia (LABOHIDRO) da UFMA que fora organizada pela profa. Maria Marlúcia Ferreira Correia, tendo como primeiro registro a alga marinha *Catenella repens* (Lightfoot) Batters 1902, coletada na praia do Vieira, em São José de Ribamar, no dia 6 de maio de 1985 (Correia, 1983). Anos depois, o material ficológico foi cedido pela profa. Maria Marlúcia Ferreira Correia ao Herbário MAR. As exsicatas de macroalgas passaram por um processo inicial de triagem para analisar a viabilidade do material e verificar a possibilidade de restauração do material a ser incorporado no acervo do Herbário do Maranhão (MAR).

Após a etapa de triagem foi realizado um levantamento preliminar das exsicatas e das duplicatas. Em seguida foram divididas de acordo com os filos Rhodophyta, Ochrophyta (Phaeophyceae) e Chlorophyta e separadas por gêneros seguindo a classificação de Wynne (1986). Após organização e separação, as exsicatas receberam o número de tombo, ou seja, o registro necessário para que a amostra fosse incorporada ao banco de dados do

Herbário MAR. As informações das fichas das exsicatas foram digitadas na planilha do banco de dados para serem disponibilizados online na plataforma do SpeciesLink (<http://splink.cria.org.br/manager/detail?resource=MAR>).

As exsicatas registradas (também chamadas de espécimes *voucher*) foram depositadas no Herbário MAR que possui reconhecimento nacional e internacional (Funk, 2003; Monteiro & Siani, 2009), recebendo sempre a manutenção apropriada para se manterem conservadas, tornando-se registros permanentes e disponíveis para consulta de pesquisadores (Bouéres *et al.*, 2019). Cabe reforçar que os dados aqui apresentados se mostram importantes para documentar todo trabalho e dedicação que foram destinados durante a coleta das amostras e preparação das exsicatas. E por considerar que os registros que compõem os acervos dos Herbários, principalmente por serem disponibilizados online, contribuem para a democratização das informações, tornando possível analisá-los sem que sejam necessários altos custos (Dias *et al.*, 2019).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleção ficológica do Herbário MAR possui 1.439 exsicatas de macroalgas que foram organizadas de acordo com seus respectivos grupos taxonômicos, que possuem registros que variam entre os anos de 1964 a 2001. As exsicatas foram divididas em filos (Rhodophyta, Ochrophyta (Phaeophyceae) e Chlorophyta) e separadas por gêneros (Figura 1).

Em relação ao filo Rodophyta, foram listadas 75 espécies e 33 famílias, representando o grupo mais diversos e representativo da coleção. Do filo Chlorophyta foram listadas 34 espécies, distribuídos em 21 famílias; para Cyanophyta foram listadas quatro espécies e quatro famílias e para Ochrophyta

foram compiladas 33 espécies e 12 famílias. A grande maioria, cerca de 70% do material, está identificado até gênero; o que limita maiores comparações e discussões. Apesar disso, o registro mostra-se importante para que especialistas possam visitar o Herbário MAR para identificar o material e assim melhorar a qualidade do acervo, ampliando o conhecimento sobre as macroalgas do litoral maranhense.

De acordo com os registros para o Maranhão, as coletas foram realizadas nos municípios de São Luís, na praia de São Marcos. Em São José de Ribamar, nas praias do Vieira e Itapari do Mar e no Recife do Timbuba. Em Paço do Lumiar na praia do Araçagi.

A dificuldade em estimar o número de espécies de macroalgas reflete no conhecimento que possuímos acerca da biodiversidade destes grupos, o que gera um grande problema, visto que a distribuição da diversidade dessas algas não é a mesma em diferentes partes do mundo (Menezes *et al.*, 2005). As regiões mais ricas em espécies de macroalgas marinhas estão localizadas no Oceano Pacífico, com destaque para as Filipinas, Japão e sul da Austrália (Norton *et al.*, 1996). Além disso, existe a dificuldade de identificação taxonômica desses organismos, pois, apesar de apresentarem características morfológicas simples, exibem uma ampla plasticidade fenotípica e um curto tempo de geração (Norton *et al.*, 1996). Aliado a esses aspectos, existe uma baixa frequência de taxonomistas para esse grupo, o que também dificulta o registro e catalogação das espécies da costa brasileira (Barbosa & Vieira, 2005).

No Maranhão, a profa. Maria Marlúcia deu início ao maior levantamento de algas macrófitas marinhas bentônicas do trecho oriental do Estado. Segundo o “Livro de Registros de Exsicatas”, os espécimes mais antigos que foram catalogados constam de 1964 no Ceará. Para o Maranhão, o espécime mais antigo registrado, data de 1967,

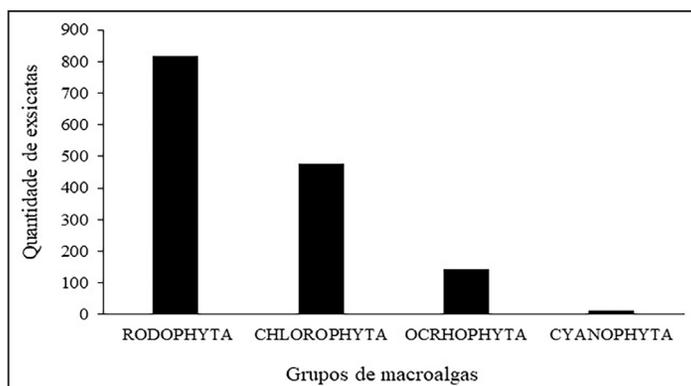


Figura 1. Distribuição das exsicatas de macroalgas que foram incorporadas ao Herbário do Maranhão (MAR), da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA.

coletado em São Luís. A partir da análise e processamento do “Livro de Registros de Exsicatas” foram catalogadas 219 espécies, distribuídas em 149 gêneros, pertencentes a 31 famílias. As famílias mais representativas em número de espécies foram Florideophyceae com 102 espécies, representando 46,5% do total, seguida por Ulvophyceae (47 spp.), com 21,4%, e Phaeophyceae (21 spp.) com 9,5 % do total. Dentre essas, o gênero que mais se destacou foi *Gracilaria* spp. (Florideophyceae).

O litoral maranhense tem mais de 640 km de extensão, sendo o segundo maior litoral do Brasil, e mesmo assim, os estudos sobre as algas não correspondem

à extensão da costa do Estado. Os espécimes datados entre 1971 e 1977 encontram-se listados em um artigo intitulado “Levantamento das algas marinhas bentônicas da Ilha de São Luís, Estado do Maranhão, Brasil”, publicado por Ferreira-Correia *et al.* (1977) e que traz uma breve descrição das macroalgas e os registros de ocorrência (Figura 2). Ainda para o Maranhão, os estudos que apresentam listas de espécies são muito antigos (entre os anos 1970 e 1980). Os estudos mais recentes são relacionados às comunidades de algas em manguezais que foram realizados por Fontes *et al.* (2016) e Freire *et al.* (2020), ambos na praia de Boa Viagem, em São José de Ribamar, MA.

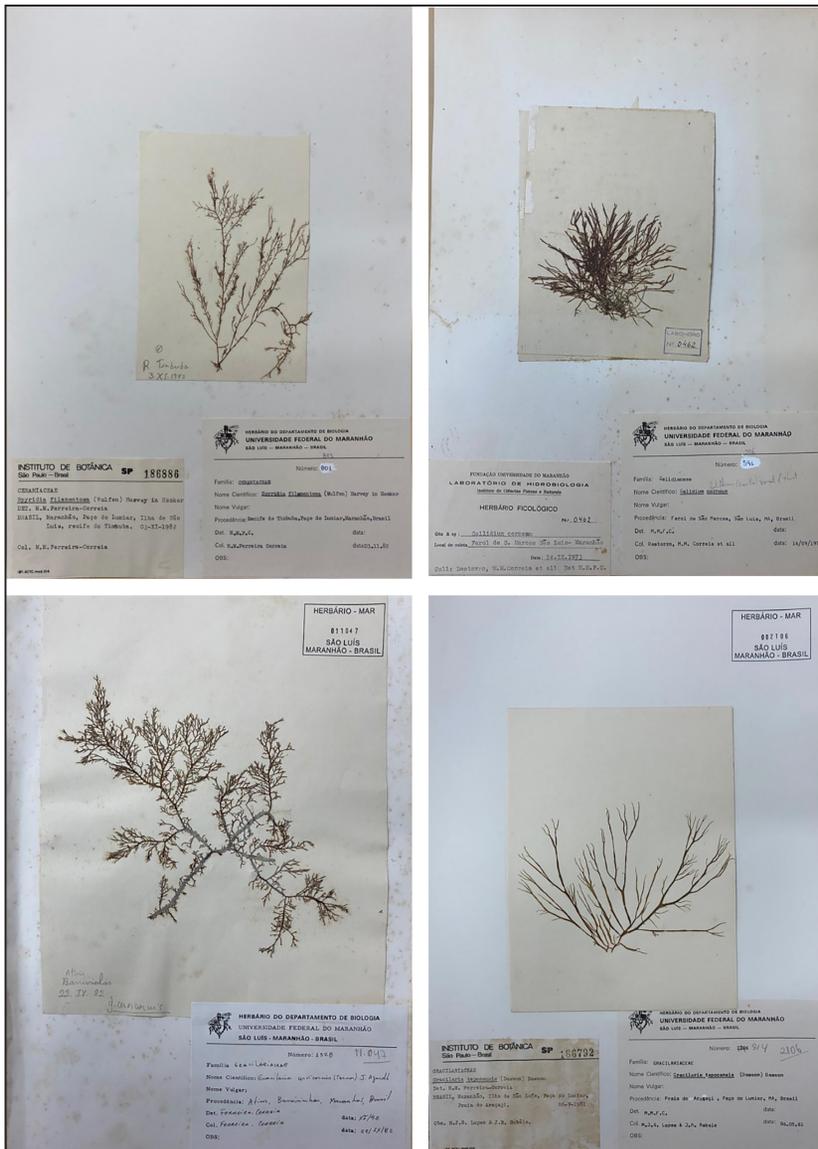


Figura 2. Imagens de exsicatas de macroalgas (coletadas entre 1973 e 1982) que representam o registro histórico e foram incorporadas à coleção ficológica do Herbário do Maranhão (MAR), da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA.

Coleções biológicas são uma das fontes mais importantes no armazenamento de informações básicas da diversidade dos ecossistemas, por servirem como centros de documentação detalhada sobre os componentes da biodiversidade. Além de servir como base para o conhecimento científico, as coleções também apresentam valor histórico e cultural (Bouéres *et al.*, 2019), fornecendo subsídios para estudos de impactos ambientais em determinadas regiões ao longo dos anos.

As macroalgas são importantes não só para o conhecimento da biodiversidade, mas também por serem excelentes produtores primários em ecossistemas aquáticos, tendo um papel importante na cadeia trófica. E sua função ecológica vai além da alimentação. Devido a sua biomassa, acabam formando grandes bancos de algas que protegem os corais, além de formarem recifes de algas calcárias, que contribuem na estruturação ecológica desse ecossistema (Waaland *et al.*, 2004; Salles, 2006; El Gamal, 2010). As macroalgas também possuem grande valor econômico diante dos estudos direcionados para análises dos potenciais que apresentam e seus diversos componentes que permitem seu uso na gastronomia, biorremediação e até como proteção contra a erosão causada pelas ondas dos oceanos nas encostas ameaçadas (Pedrini, 2010).

O acervo do Herbário MAR reúne alguns táxons conhecidos de macroalgas tanto de ambientes costeiros, quanto de alto mar. A organização e o tombamento dessas exsicatas permitem que essas espécies sejam mantidas e preservadas para subsidiar estudos nas áreas onde foram coletadas, bem como tornar público o registro dessas espécies para o Maranhão. A incorporação desses dados à plataforma digital do “SpeciesLink” também é de grande importância pois contribui para a globalização de dados científicos.

Por fim, podemos destacar que o presente estudo constitui uma visita ao passado, ressaltando a importância do registro histórico para se ter um panorama geral da comunidade de macroalgas que foram coletadas na costa maranhenses. Além de ser um incentivo aos profissionais da área para visitarem o Herbário MAR, ou consultarem o acervo virtual, e contribuir com a atualização dos registros que são importantes para a ciência no Estado.

#### AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Maranhão, aos bolsistas, colaboradores e voluntários do Herbário MAR. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

Herbário Virtual da Flora e dos Fungos (INCTHVFF) que conta com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de auxílio técnico. A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pelo financiamento de projetos e bolsas. A professora Maria Marlúcia F. Correia pela dedicação e posterior doação da coleção ficológica que propiciou a realização deste trabalho e a Linair Martins que participou ativamente das coletas junto com a professora Marlúcia Correia.

#### REFERÊNCIAS

- ALMEIDA JR., E.B. Herbário do Maranhão, Maranhão (MAR). 2015. *Unisanta Bioscience*, 4: 129-132. Edição Especial.
- BARBOSA, M.R.V. & VIEIRA, A.O. 2005. *Coleções de plantas vasculares: diagnóstico, desafios e estratégias de desenvolvimento*. Disponível em [www.cria.org.br/cgee/col](http://www.cria.org.br/cgee/col). Acesso em 20/06/2020.
- BFG. 2015. Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil. *Rodriguesia*, 66(4): doi: 10.1590/2175-7860201566411
- BICUDO, C.E.M. & MENEZES, M. 2010. Introdução: As algas do Brasil. In: FORZZA, R.C. (Org). *Catálogo de plantas e fungos do Brasil*. Inst de Pesq Jard Bot. do Rio de Janeiro. Andrea Jakobsson Estúdio: Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, p. 49-60. Vol. 1.
- BOUÉRES, M.U.P.; VALLE, M.G. & ALMEIDA JR., E.B. 2019. Resgate histórico do Herbário do Maranhão (MAR). *Rev Tróp: Ciê. Agr. e Bio*, 11(1): 09-17.
- CAUSAY, D.; JANZEN, D.H.; PETERSON, A. T.; VIEGLAIS, D.; KRISHTALKA, L.; BEACH, J.H. & WILEY, E.O. Museum collections and taxonomy. 2004. *Science*, 305: 1105-1107.
- CHAVAN, V. & KRISHNAN, S. 2003. Natural history collections: a call for national information infrastructure. *Curr. Scien*, 84(1): 34-42.
- CORREIA, M.M.F. 1983. *Rodofíceas Marinhas Bentônicas do Litoral Oriental do Estado do Maranhão* (Dissertação, Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”), São Paulo.
- DE CARVALHO, L.R. & ROQUE, N.F. 2000. Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas. *Química Nova*, 23: 757-764.

- DIAS, K.N.L.; SILVA, A.N.F.; GUTERRES, A.V.F.; LACERDA, D.M.A. & ALMEIDA JR., E.B. 2019. A importância dos Herbários na construção de conhecimentos sobre a diversidade vegetal. *Rev Tróp: Ciên Agr e Biol*, 11(1): 25-35.
- EL GAMAL, A. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm Journal*, 18(1): 1–25.
- FERREIRA-CORREIA, M.M.; LOPES, M.J.S. & BRANDAO, M.D.S. 1977. Levantamento das algas marinhas bentônicas da Ilha de São Luís (estado do Maranhão, Brasil). *Bol. Lab. de Hidrobiol*, 1(1): 23-46.
- FONTES, K.A.A.; LISBOA, A.T. & CASTRO, R.S. 2016. Macroalgas aderidas em pneumatóforos de *Avicennia germinans* (L.) Stearn na praia de Boa Viagem, São José de Ribamar–Maranhão. *Acta Tecnológica*, 11(1): 33-45.
- FREIRE, L.S.S; VIANA, L.S; SILVA, N.J.C. & FONTES, K.A.A. R.S. 2020. Macroalgas aderidas em *Rizophora mangle* L. em Boa Viagem, São José de Ribamar –Maranhão. *Bol. Lab. de Hidrol.*, 30(2): 1-8.
- FUNK, V. 2003. 100 uses for a Herbarium. US National Herbarium. Disponível em: <<http://www.virtualherbarium.org/vh/100UsesASPT.html>> Acesso em 07/04/2020.
- GUIRY, M.D. 2012. How many species of algae are there? *Journ Phyc*, 48: 1057– 1063.
- KAPLAN, Z.T. 2010. *Potamogeton exsiccates*: changes in taxonomy and nomenclature from one-century perspective. In: *Ann. Bot. Fern. Finn. Zoo and Botanical Publishing Board*.
- LONGHI-WAGNER, H.M.A. 1998. *Importância do Herbário para a Pesquisa Botânica*. In: Encontro Estadual de Herbários, FEPAGRO, Porto Alegre, Anais do Encontro. Porto Alegre: FEPAGRO, v.1, p. 28-29.
- MAIA, L.C. 2003. Coleções de fungos nos herbários brasileiros: estudo preliminar. Pp.21-40. In: PEIXOTO, A.L. (Org.). Coleções biológicas de apoio ao inventário, uso sustentável e conservação da biodiversidade. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- MAZO, L.C.; GÓMEZ, A.; QUINTANILLA, S.R.; BERNAL, J.E. & VALDIVIESO, O. P.O. 2012. Extraction and amplification of DNA from orchid exsiccates conserved for more than half a century in a herbarium in Bogotá, Colombia. *Lankesteriana*, 12(2): 121-129.
- MENEZES, M.M.; MAIA, L.C.; COSTA, D.P. & BICUDO, C.E.M. 2005. *Coleções de plantas avasculares e fungos como base de conhecimento para a diversidade biológica brasileira: uma reavaliação*. Disponível em [www.cria.org.br/cgee/](http://www.cria.org.br/cgee/) col). Acesso em 20/06/2020.
- MONTEIRO, S.S. & SIANI, A.C.A. 2009. Conservação de exsiccates em Herbários: contribuição ao manejo e preservação. *Rev Fitos*, 4(2): 24-37.
- NORTON, T.A.; MELKONIAN, M. & ANDERSEN, R.A. 1996. Algal biodiversity. *Phycology*, 35 (4): 308-326.
- PEDRINI, A.G. 2010. *Macroalgas: Uma introdução a taxonomia*. p. 3-10.
- REVIERS, B. 2006. *Biologia e filogenia das algas*. Porto Alegre: Artmed.
- RESENDE, M.L.F. & GUIMARÃES, L.L. 2007. *Inventários da Biodiversidade do Bioma Cerrado: Biogeografia de Plantas*. Rio de Janeiro: Fund Inst Bra Geo e Estat, IBGE. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv95776.pdf>. Acesso em 17/06/2020.
- SALLES, J.P. 2006. *Potencial de cultivo de Gracilaria cornea (Rhodophyta) em módulos submersos afastados da costa*. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Cent. Ciên Agr, Univ Fed de Santa Catarina, Santa Catarina.
- SIANI, A.C. (coord.) 2003. *Desenvolvimento Tecnológico de Fitoterápicos: Plataforma Metodológica*. Rio de Janeiro: Scriptorio, 99 pp.
- STREIT, N.M.; CANTERLE, L.P.; CANTO, M.W. & HECKTHEUER, L.H.H. 2005. As clorofilas. *Cienc. Rural*, 35(3): 748-755.
- SUDHAKAR, K.; MAMAT, R.; SAMYKANO, M.; AZMI, W.H.; ISHAK, W.F.W. & YUSAF, T. 2018. An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91(C): 165-179.
- VALLS, J.F.M. 1998. *Os Herbários e seu papel nas instituições de pesquisa e ensino*. In: Encontro Estadual de Herbários, FEPAGRO, Porto Alegre (Nov 1997), Anais do Encontro. Porto Alegre: FEPAGRO, v.1, p. 17-20.
- WAALAND, J.R.; STILLER, J.W. & CHENEY, D.P. 2004. Macroalgal candidates for genomics. *Journal of Phycology*, 40: 26–33.
- WYNNE, M.J.A. 1986. Checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic. *Canadian Journal of Botany*, 64(10): 2239-2281.