

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 246730 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439344**

(22) Data zgłoszenia: **2021.10.28**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.05.02 BUP 18/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.03.03 WUP 09/2025**

(51) MKP:

A61K 36/76 (2006.01)

A61K 36/49 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A23L 33/105 (2016.01)

A61K 8/9783 (2017.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**KATOLICKI UNIWERSYTET LUBELSKI JANA
PAWŁA II, Lublin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**OLEH DEMCHUK, Lublin, PL
MONIKA JANECZKO, Lublin, PL
KONRAD KUBIŃSKI, Lublin, PL
MACIEJ MASŁYK, Górki, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Małgorzata Matyka, Gdańsk, PL

(54) Tytuł:

**Preparat przeciwbakteryjny pochodzenia naturalnego, zastosowanie oraz sposób jego
wytwarzania**

PL 246730 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest preparat przeciwbakteryjny pochodzenia naturalnego z biomasy opadłych liści wybranych gatunków drzew (pochodzenia naturalnego) przeznaczony do zastosowania do leczenia infekcji bakteryjnych, zwłaszcza infekcji bakteryjnych wywołanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, u ludzi i zwierząt, oraz sposób jego wytwarzania.

Przez tysiące lat rośliny lecznicze odgrywały znaczącą rolę w leczeniu wielu schorzeń, w tym chorób zakaźnych. Niektóre naturalnie występujące związki chemiczne służyły jako podstawa do opracowywania dużego odsetka klinicznie sprawdzonych leków. Współczesna medycyna wykorzystuje rośliny, które są bogate w wiele różnych metabolitów wtórnych, takich jak garbniki, terpenoidy, alkaloidy i flawonoidy, o potwierdzonych badaniami właściwościach przeciwdrobnoustrojowych.

Stosowanie i wyszukiwanie leków i suplementów diety pochodzących z roślin do leczenia chorób zakaźnych, czy infekcji jest także obecnie punktem zainteresowania środowiska medycznego. Choroby zakaźne pozostają istotną przyczyną zachorowalności i umieralności na całym świecie. Pomimo znacznych postępów w mikrobiologii i wirusologii tudzież możliwości kontroli drobnoustrojów, epidemii wywołanych przez patogeny lekooporne i nieznane wcześniej patogeny chorobotwórcze stanowią ogromne zagrożenie dla globalnego zdrowia publicznego. Te negatywne tendencje zdrowotne wymagają globalnej inicjatywy na rzecz opracowania nowych strategii zapobiegania i leczenia chorób zakaźnych, w tym przy wykorzystaniu produktów naturalnych.

Od czasu pojawienia się antybiotyków syntetycznych na samym początku XX wieku, stosowanie pochodnych roślinnych jako środków przeciwdrobnoustrojowych stało się mniej popularne. Pojawiają się jednak powody, dla których zainteresowanie przeciwdrobnoustrojową aktywnością ekstraktów roślinnych wzrasta. Istotną kwestią jest zjawisko oporności bakterii na stosowane antybiotyki oraz rosnąca świadomość opinii publicznej dotycząca nadmiernego nadużywania tradycyjnych antybiotyków. Ponadto, wiele osób jest zainteresowanych większą autonomią w zakresie opieki medycznej. Związki roślinne można nabyć bez recepty od dostawców ziół w sklepach z naturalnymi produktami spożywczymi.

Do tej pory przebadano tysiące gatunków roślin pod kątem ich aktywności wobec różnych szczepów bakterii *in vitro*, a wiele roślin leczniczych wykazuje aktywność przeciwko szerokiej gamie bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Rośliny lecznicze oferują znaczny potencjał do opracowania nowych terapii przeciwbakteryjnych i terapii wspomagających antybiotykoterapię.

Znane jest także stosowanie tzw. „naturalnych antybiotyków” ziołowych lub roślinnych, wśród których znajdujemy produkty spożywcze codziennego użytku, którym tradycja ludowa przypisuje właściwości antybakteryjne czy przeciwtleniające. Przed pojawieniem się na rynku antybiotyków to właśnie tego typu produkty były stosowane do zwalczania chorób. Możemy do nich zaliczyć: czosnek, miód, olejek z oregano, imbir, żurawinę, kurkumę, czy chrzan. Obecnie wymienione produkty stosowane są jako środki wspomagające, towarzyszące innym lekom w celu zwiększenia odporności, głównie podczas sezonowych dolegliwości takich jak przeziębienia, katar czy ból gardła.

Infekcje bakteryjne są jednym z poważniejszych problemów ludzkości, który dotyka szczególnie regiony słabo rozwinięte i stanowi istotny czynnik obniżający jakość życia i zwiększający śmiertelność. Powszechne, często nieuzasadnione stosowanie antybiotyków pogłębia ten problem. Pojawiają się coraz to nowe szczepy bakterii odporne na stosowane medykamenty, co dodatkowo komplikuje walkę z infekcjami.

Problem antybiotykoodpornych szczepów bakterii jest aktualnie bardzo szeroko omawiany w środowisku naukowym, instytucjach leczniczych oraz w mediach publicznych. Istnieje dobrze uzasadniona opinia, że na obecnym etapie rozwoju medycyny w krótkim czasie może wyniknąć poważny problem z wynalezieniem skutecznego środka bakteriobójczego pochodzenia syntetycznego pozwalającego na prowadzenie bezpiecznej kuracji pacjentów, odkażania szpitali oraz leczenia zwierząt. Stąd też istnieje nieustające zapotrzebowanie na alternatywne produkty, szczególnie pochodzenia naturalnego.

Bakterie z rodziny *Staphylococcus* są uważane za jedne z najbardziej powszechnych i zarazem niebezpiecznych bakterii. Drobnoustroje te mogą powodować kilkadziesiąt różnych chorób, począwszy od chorób skóry oraz układu oddechowego, kończąc na uszkodzeniu układu nerwowego i sepsie.

Wykorzystanie praktyczne roślin lub też ich części w celach medycznych lub technicznych jest powszechnie znane. Zostało ono również obiektem ochrony własności intelektualnej. Znane jest zastosowanie liści roślin jako naturalnego surowca w różnego rodzaju zastosowaniach, i tak z opisu CN 105668684 A znane jest zastosowanie liści feniksa jako adsorbentu antybiotyku i/lub zanieczyszczeń organicznych w ściekach. Liście te nie wymagają szczególnej obróbki, co powoduje, że łatwo oddziela

się je od zbiornika wodnego, a w procesie adsorpcji nie powstają żadne wtórne zanieczyszczenia. Z innego opisu wynalazku DE 10345343 znany jest ekstrakt z liści bluszczu o działaniu przeciwzapalnym.

Z publikacji Amina Cherif Haouat et al. „Antimycobacterial activity of *Populus alba* leaf extracts”, *Journal of Medicinal Plant Research*, Vol. 7(16), p. 1015–1021, 25 April, 2013, znany jest materiał roślinny w postaci gałęzi z liśćmi, który był zbierany w Maroku w miesiącu marcu. Z przedstawionego materiału jasno wynika, że badany ekstrakt był przygotowany z liści zebranych bezpośrednio z drzewa.

Podobnie w artykule Sabina Dahija et al. „Antimicrobial and cytotoxic activity of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, *A. incana* (L.) Moench, and *A. virdis* (Chaix) DC. Extracts”, *Journal of Health Science* 2016;6(2): 1–5, ujawniono, iż liście były pozyskane również bezpośrednio z drzewa w miesiącu czerwcu.

W obu powyższych publikacjach ujawniono materiał biologiczny w postaci liści, który był zbierany bezpośrednio w drzewa, a więc były to liście zielone. Natomiast przedmiotem naszego wynalazku jest materiał z opadłych liści zbieranych jesienią w Polsce.

We wskazanych publikacjach nie ma żadnej wzmianki ani informacji o preparatach przygotowanych z opadłych liści. Jest to kluczowa różnica, ponieważ nie można porównywać liści (jako tako) tylko dlatego, że pochodzą z tych samych drzew. Stanowią one materiał biologiczny, ich struktura i zawartość chemiczna ulega zmianie, dlatego tak ważne jest kiedy i jak zostaną zebrane. Nasz materiał to naturalnie opadłe liście.

W zależności od pory roku, a więc warunków środowiskowych, w których żyje roślina, jej procesy metaboliczne są zmienne, ponieważ roślina dostosowuje się do warunków życia. W związku z tym, jeśli procesy metaboliczne ulegają dynamicznym zmianom, to również zawartość metabolitów (związków chemicznych) w tkankach roślinnych jest różna w zależności, m.in. od pory roku. Wobec tego liść zebrany bezpośrednio z drzewa cechuje inna zawartość metabolitów w porównaniu z liściem naturalnie opadniętym. W związku z tym w tych dwóch przypadkach liści, za aktywność przeciwbakteryjną odpowiada inny zestaw związków chemicznych. Nie są one tożsame, a ekstrakty pozyskiwane z liści zielonych/opadniętych i zebranych wiosną/jesienią nie mają analogicznych właściwości.

Analogicznie będzie ze stężeniem, gdzie zawarte w powyższym artykule stężenie przeciwbakteryjne wynoszące 160 miligramów/mililitr jest ponad tysiąc razy wyższe od uzyskanych przez twórców niniejszego wynalazku wartości MIC, które wynoszą 62,5–125 mikrogramów/mililitr, a takiej różnicy nie można określić jako "analogicznych właściwości". Dlatego też preparat zgłaszającego przedmiotowy wynalazek jest o wiele aktywniejszy.

Produkt będący przedmiotem niniejszego wynalazku jako preparat z biomasy opadłych liści idealnie wpisuje się w ten aktualny trend, stanowiąc skuteczne narzędzie w walce z infekcjami bakteryjnymi.

Ze względu na unikalne, nietypowe źródło surowca jakim jest odpadowa biomasa opadłych liści, powoduje, że przedmiotowy produkt wykazuje przewagę nad innymi naturalnymi preparatami antybakteryjnymi.

Uzyskane wyniki badań w przedmiotowym wynalazku wskazują na możliwość zastosowania preparatu otrzymanego z biomasy opadłych liści wybranych gatunków drzew jako środka przeciwbakteryjnego. Proponowany środek bakteriobójczy pochodzenia naturalnego cechuje się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną. Istotnym jest zastosowanie do jego produkcji łatwo dostępnych w dużych ilościach surowców naturalnych, które do tej pory nie znalazły szerokiego zastosowania praktycznego i były zwyczajowo traktowane jako odpady.

Badania prowadzone przez zespół twórców koncentrowały się wokół pozyskiwania nowych substancji pochodzenia naturalnego o aktywności przeciwbakteryjnej. Jednym ze źródeł takich substancji okazały się zebrane opadłe liście z drzew dwóch gatunków, *Topoli białej* (*Populus alba*) i *Olchy czarnej* (*Alnus glutinosa*).

Celem przedmiotowego wynalazku jest stworzenie preparatu z biomasy opadłych liści Topoli białej i Olchy czarnej do stosowania przeciw infekcjom bakteryjnym.

Istotą wynalazku jest preparat przeciwbakteryjny pochodzenia naturalnego, który zawiera:

- jako składnik aktywny zawiera ekstrakt z biomasy opadłych liści topoli białej (*Populus alba*) i/lub olchy czarnej (*Alnus glutinosa*),
- jest w postaci suchej pozostałości otrzymanej po ekstrakcji liści topoli białej i/lub olchy czarnej i odparowaniu ekstraktu,
- zawiera suchą pozostałość otrzymaną z ekstraktu z liści Topoli białej w zakresie stężeń MIC od 15–62,5 µg/ml,

- zawiera suchą pozostałość otrzymaną z ekstraktu z liści Olchy czarnej w zakresie stężeń MIC 31–62,5 µg/ml.

Przedmiotem wynalazku jest również preparat przeciwbakteryjny pochodzenia naturalnego zdefiniowany powyżej do zastosowania do infekcji bakteryjnych, zwłaszcza infekcji bakteryjnych wywołanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, u ludzi i zwierząt.

Korzystnie preparat ma zastosowanie do leczenia infekcji bakteryjnych wywołanych przez bakterie *Staphylococcus aureus*.

Korzystnie preparat jest przeznaczony do podawania doustnego.

Korzystnie preparat jest przeznaczony do stosowania topowego w postaci maści lub roztworu w tym roztworów micelarnych, emulsji i suspensji.

Korzystnie preparat ma zastosowanie jako suplement diety.

Korzystnie preparat ma zastosowanie jako kosmeceutyk.

Korzystnie preparat jest w postaci ciekłej.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób otrzymywania preparatu zdefiniowanego powyżej, który obejmuje:

- a) suszenie biomasy zebranych liści topoli białej i/lub olchy czarnej w temperaturze 37°C przez trzy dni,
- b) mielenie suszu do uzyskania drobnego pyłu,
- c) poddanie suszu procesowi ekstrakcji ciągłej serią rozpuszczalników organicznych do uzyskania ekstraktów, wybranych z grupy obejmującej chloroform, metanol,
- d) poddanie poszczególnych ekstraktów procesowi destylacji pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze nieprzekraczającej 50°C aż do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika,
- e) wyizolowanie stałej pozostałości, która stanowi właściwy preparat odpowiedni do stosowania.

Zalety przedmiotowego wynalazku:

- wykazuje specyficzną aktywność przeciwbakteryjną skierowaną na bakterie z rodzaju *Gronkowiec* (*Staphylococcus*), włączając w to szczepy kliniczne tego mikroorganizmu,
- łatwo i w dużych ilościach dostępny surowiec,
- wykorzystanie liści, które są biomasą odpadową,
- wysoka skuteczność, niska toksyczność,
- zgodność z zasadami zrównoważonego rozwoju,
- pochodzenie naturalne.

Określenia stosowane powyżej oraz w opisie i zastrzeżeniach patentowych, mają następujące znaczenie:

MIC – minimalne stężenie powodujące zahamowanie wzrostu bakterii.

Gronkowiec złocisty – zamiennie używana nazwa *Staphylococcus aureus*.

Pochodzenia naturalnego – oznacza z biomasy opadłych liści drzew Topoli białej (*Populus alba*) i/lub Olchy czarnej (*Alnus glutinosa*).

Patogen – zamiennie drobnoustrój

Preparat – oznacza drobny pył, inaczej miął, inaczej suchy ekstrakt.

Opis tabel:

Tabela 1 – przedstawia wartości MIC (µg/ml) testowanych preparatów wobec wybranych gatunków bakterii.

Tabela 2 – przedstawia wartości MIC (µg/ml) testowanych preparatów wobec wybranych gatunków bakterii rodzaju *Staphylococcus*.

Tabela 3 – przedstawia badanie aktywności preparatów z liści na klinicznych izolatach bakterii gronkowca złocistego.

Wynalazek ilustrują następujące przykłady wykonania, nie stanowiące jego ograniczenia.

Przykład 1

Badania były przeprowadzone na liściach zebranych z różnych stanowisk w listopadzie 2014 i 2015 (dwa sezony).

Zebrane liście suszono w 37°C przez trzy dni. Następnie susz zmielono uzyskując drobny pył (miał), z którego w procesie ekstrakcji ciągłej serią (sekwencją) rozpuszczalników organicznych wy-

branych z grupy obejmującej węglowodory, chloropochodne, alkohole, etery, estry, lotne kwasy organiczne uzyskano ekstrakty. Korzystnie, rozpuszczalnik organiczny stanowi heksan (lub frakcja z ropy naftowej o temperaturze wrzenia w zakresie nieprzekraczającym od 30 do 150°C), chloroform, metanol.

Poszczególne ekstrakty zostały poddane procesowi destylacji pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze nieprzekraczającej 50°C aż do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika. Otrzymane pozostałości (preparaty) zostały wykorzystane w dalszych badaniach biologicznych. W celu określenia potencjału antybakteryjnego, dla każdego z dwóch preparatów wyznaczono wartości MIC stosując standardową metodę mikrorozcieńczeń rekomendowaną przez Instytut Standardów Klinicznych i Laboratoryjnych (CLSI). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że uzyskane przez twórców preparaty najsilniej hamują wzrost jednego z przebadanych gatunków bakterii, gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) (Tabela 1).

Z powodu tak silnej wybiórczości preparatów, przeprowadzono dalsze badania, ale ograniczono się tylko do bakterii z rodzaju gronkowiec. Najbardziej podatne na działanie preparatów okazały się dwa gatunki, *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus auricularis* (Tabela 2).

Przykład 2

Analiza toksykologiczna preparatów z liści

Analiza została przeprowadzona na trzech liniach komórek ludzkich (HaCaT, BJ i HepG2) oraz na rybkach z gatunku *Danio rerio* wykorzystanych jako model.

Badania na komórkach wykazały, że testowane preparaty z liści topoli w zakresie stężeń 1–200 µg/ml nie wykazywały toksycznego działania. Preparaty z olchy czarnej nie wykazywały znaczącego toksycznego wpływu na komórki w zakresie stężeń 1 do stężenia 30 µg/ml.

Badania na rybach wykazały, że preparaty z topoli nie wpływają na rozwój ryb w stężeniach nawet do 500 mg/ml. Preparaty z olchy są natomiast bezpieczne dla ryb w stężeniach do 100 µg/ml.

Przykład 3

Badanie aktywności preparatów z liści na klinicznych izolatach bakterii gronkowca złocistego (*staphylococcus aureus*)

Wyniki przedstawiono w tabeli 3

Wartości MIC wyrażone są w µg/ml, – oznacza brak aktywności,

preparaty z liści badano w zakresie stężeń 3,9–1000 µg/ml,

antybiotyki stosowano w stężeniach 1,9–500 µg/ml, 0,19–50 µg/ml, 0,01–5 µg/ml. Antybiotyki zastosowano jako kontrole pozytywne.

Uzyskane wyniki wskazują, że badane preparaty hamują wzrost badanych izolatów klinicznych.

Otrzymany preparat:

- ma zastosowanie do leczenia infekcji bakteryjnych u ludzi i zwierząt. W związku z brakiem toksycznego działania na organizmy żywe, w korzystnym wykonaniu wynalazku preparat jest przeznaczony do podawania doustnego.
- może też być użyty do stosowania topowego w postaci maści lub roztworu w tym roztworów micelarnych, emulsji i suspensji.
- może być użyty jako suplement diety lub kosmeceutyk.
- preparat w postaci suchej pozostałości może być podawany per se, na przykład w kapsułce żelatynowej lub kapsułce z opłatką.
- preparat może też być podawany w postaci tabletki, w połączeniu z dopuszczonymi do stosowania u ludzi substancjami pomocniczymi, takimi jak wypełniacze, substancje wiążące, substancje rozsadzające, konserwanty, substancje poślizgowe, substancje antyadhezyjne i inne, stosowane w technice sporządzania leków i znane specjalistom w tej dziedzinie.
- preparat może też być w postaci ciekłej, na przykład eliksiru, syropu lub zawiesiny, zawierających, oprócz suchej pozostałości, ciekły nośnik taki jak woda, alkohol, lub inny płyn oraz substancje pomocnicze takie jak środki dyspergujące, emulgatory, konserwanty, substancje smakowe i zapachowe oraz inne niezbędne do uzyskania trwałego preparatu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Preparat przeciwbakteryjny pochodzenia naturalnego **znamienny tym**, że
 - jako składnik aktywny zawiera ekstrakt z biomasy opadłych liści topoli białej (*Populus alba*) i/lub olchy czarnej (*Alnus glutinosa*),
 - jest w postaci suchej pozostałości otrzymanej po ekstrakcji liści topoli białej i/lub olchy czarnej i odparowaniu ekstraktu,
 - zawiera suchą pozostałość otrzymaną z ekstraktu z liści Topoli białej w zakresie stężeń MIC od 15–62,5 µg/ml,
 - zawiera suchą pozostałość otrzymaną z ekstraktu z liści Olchy czarnej w zakresie stężeń MIC 31–62,5 µg/ml.
2. Preparat przeciwbakteryjny pochodzenia naturalnego zdefiniowany w zastrz. 1 do zastosowania do infekcji bakteryjnych, zwłaszcza infekcji bakteryjnych wywołanych przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, u ludzi i zwierząt.
3. Preparat według zastrz. 2, **znamienny tym**, że ma zastosowanie do leczenia infekcji bakteryjnych wywołanych przez bakterie *Staphylococcus aureus*.
4. Preparat według zastrz. 2, **znamiennym tym**, że jest przeznaczony do podawania doustnego.
5. Preparat według zastrz. 2, **znamienny tym**, że jest przeznaczony do stosowania topowego w postaci maści lub roztworu w tym roztworów micelarnych, emulsji i suspensji.
6. Preparat według zastrz. 2, **znamienny tym**, że ma zastosowanie jako suplement diety.
7. Preparat według zastrz. 2, **znamienny tym**, że ma zastosowanie jako kosmeceutyk.
8. Preparat według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jest w postaci ciekłej.
9. Sposób otrzymywania preparatu zdefiniowanego w zastrzeżeniu 1, **znamienny tym**, że obejmuje:
 - a) suszenie biomasy zebranych liści topoli białej i/lub olchy czarnej w temperaturze 37°C przez trzy dni,
 - b) mielenie suszu do uzyskania drobnego pyłu,
 - c) poddanie suszu procesowi ekstrakcji ciągłej serią rozpuszczalników organicznych do uzyskania ekstraktów, wybranych z grupy obejmującej chloroform, metanol,
 - d) poddanie poszczególnych ekstraktów procesowi destylacji pod obniżonym ciśnieniem w temperaturze nieprzekraczającej 50°C aż do całkowitego usunięcia rozpuszczalnika,
 - e) wyizolowanie stałej pozostałości, która stanowi właściwy preparat odpowiedni do stosowania.

Rysunki

Tabela 1.

TESTOWANE GATUNKI BAKTERII	Topola biała		Olcha czarna	
	METANOL	CHLOROFORM	METANOL	CHLOROFORM
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	62.5	31	62.5
<i>Escherichia coli</i>	500	500	500	500
<i>Klebsiell apneumoniae</i>	500	500	500	500
<i>Salmonella bongori</i>	500	500	500	500
<i>Enterobacter cloacae</i>	500	500	500	500
<i>Enterococcus faecalis</i>	500	500	500	500
<i>Proteus vulgaris</i>	500	500	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	500	500	500

Tabela 2

TESTOWANE GATUNKI STAPHYLOCOCCUS	Topola biała		Olcha czarna	
	METANOL	CHLOROFORM	METANOL	CHLOROFORM
<i>S. hyicus</i>	-	500	-	125
<i>S. intermedius</i>	62,5	125	62.5	250
<i>S. warneri</i>	62,5	500	500	125
<i>S. caprae</i>	125	250	125	250
<i>S. auricularis</i>	31.2	250	62.5	31.2
<i>S. pasteurii</i>	250	500	250	250
<i>S. schleiferi</i>	250	500	125	250
<i>S. aureus 6538</i>	31.2	62.5	31.2	62.5
<i>S. aureus 6538/1</i>	-	500	-	500
<i>S. aureus 25923</i>	16	250	31.2	250

Numer szerepu	Penicylina	Ampicylina	Chloramfenikol	Tetracyklina	Doksycyklina	Worikonazol	Topola		Oleha	
							Etanol	Metanol	Etanol	Metanol
1.	-	62,5	3,12	0,15	0,15	0,15	-	-	-	-
2.	-	0,15	3,12	0,31	0,31	0,15	125	62,5	62,5	62,5
3.	-	0,62	3,12	3,12	15,6	0,15	125	62,5	62,5	125
4.	-	-	62,5	62,5	-	0,62	-	-	125	-
5.	-	0,31	3,12	1,56	0,31	0,07	125	62,5	62,5	125
6.	-	-	3,12	3,12	15,6	0,15	-	-	-	-
7.	-	0,07	3,12	0,31	0,15	0,15	62,5	62,5	62,5	62,5
8.	-	0,07	3,12	0,15	0,31	0,15	-	125	125	125
9.	-	0,07	15,6	0,62	3,12	0,31	-	-	-	-
10.	-	-	6,25	0,39	0,15	0,19	125	125	62,5	125
11.	-	-	31,2	0,31	0,31	0,19	-	-	125	-
12.	-	-	31,2	3,12	-	-	-	-	125	125
13.	-	-	62,5	3,12	62,5	-	-	-	-	-
14.	-	62,5	3,12	0,31	1,56	-	-	-	125	-
15.	-	-	3,12	0,15	0,15	0,31	-	-	-	-
16.	-	-	6,25	1,56	7,8	-	-	-	125	-
17.	-	-	3,12	1,56	15,6	-	-	-	125	125
18.	-	0,31	3,12	0,31	0,31	0,78	125	125	125	125
19.	-	-	3,12	0,15	0,31	0,78	125	125	125	125
20.	-	-	62,5	0,62	6,25	-	-	-	125	125

Tabela 3