

Estudo fitoquímico e atividade antioxidante de extrato etanólico de *Genipa americana*

Phytochemical study and antioxidant activity of ethanolic extract of *Genipa americana*

Francisco Victor França¹

Resumo: O objetivo deste estudo foi investigar as principais classes de compostos químicos bem como avaliar, in vitro, a atividade antioxidante do extrato bruto das folhas de *Genipa americana*. Para tanto, as folhas foram submetidas à extração a frio, utilizando etanol comercial, para obtenção do extrato bruto que foi submetido à análise Fitoquímica para identificação de fenóis, flavonoides, taninos, alcaloides, triterpenos e esteroides. A determinação da atividade antioxidante do extrato etanólico foi realizada qualitativamente por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), e in vitro, pelo método de captura do radical DPPH e o índice de varredura (%IV) foi calculado utilizando o programa estatístico GraphPad Prism. A prospecção Fitoquímica do extrato bruto revelou a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e alcaloides. A determinação qualitativa por CCD sugeriu a presença de compostos com atividade antioxidante. O extrato bruto demonstrou baixa atividade antioxidante se comparado ao padrão quercetina. Conclui-se que o extrato bruto das folhas de *Genipa americana* apresenta compostos com potencial antioxidante.

Palavras-chave: *Genipa americana*. Fitoquímico. Atividade Antioxidante.

Abstract: The objective of this study was to investigate the main classes of chemical compounds as well as to evaluate, in vitro, the antioxidant activity of the raw extract of *Genipa americana* leaves. The leaves were submitted to cold extraction, using commercial ethanol, to obtain the crude extract that was submitted to Phytochemical analysis to identify phenols, flavonoids, tannins, alkaloids, triterpenes and steroids. The determination of the antioxidant activity of the ethanolic extract was performed qualitatively by Thin Layer Chromatography (CCD), and in vitro by the DPPH radical capture method and the scanning index (% IV) was calculated using the GraphPad Prism statistical program. The Phytochemical prospecting of the crude extract revealed the presence of phenolic compounds, flavonoids, tannins and alkaloids. The qualitative determination by CCD suggested the presence of compounds with antioxidant activity. The crude extract showed low antioxidant activity when compared to the quercetin standard. It is concluded that the raw extract of the leaves of *Genipa americana* presents compounds with antioxidant potential.

Keywords: *Genipa americana*. Phytochemical. Antioxidant activity.

¹ Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Ceará, com a atuação na área de plantas medicinais com ênfase na atividade anticoagulante, antioxidante e atóxica, franciscovictorfranca@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

A *Genipa americana* (Rubiaceae) conhecida popularmente como “Jenipapeiro”, é originária da América Tropical, amplamente distribuída no Brasil, sendo registrado em vários Estados, como Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso e Distrito Federal (CARVALHO, 2003), principalmente em maciços florestais situados nas várzeas úmidas. Sua árvore caracteriza-se por caule reto, copa grande e arredondada com ramos numerosos e fortes, de casca lisa e espessa (CORRÊA, 1984; ESTRELLA, 1995).

Dados quimiotaxonômicos caracterizam esta espécie pela presença de compostos terpênicos como genipacetal, genipamida, e genipaol; manitol, taninos, metil-éteres, hidantoína, ácidos tânicos, iridoides, antraquinonas e alcaloides (REVILLA, 2001; CRONQUIST, 1981; ONO et al., 2007; SOUZA et al., 2013).

Popularmente, a espécie vegetal (cascas, folhas e frutos) tem sido bastante utilizada para o tratamento e/ou cura de diabetes (BESSA et al., 2013), doenças do fígado (AGRA et al., 2008) e febre (DELPRETE; SMITH; KLEINI, 2005). Cientificamente, estudos têm demonstrado que a espécie em estudo tem efeito anti-inflamatório, adstringente, antianêmica, propriedades tônicas e feridas escorbúlicas (CORRÊA, 1984; DELPRETE et al., 2005; VIEIRA, 2006; SOUZA et al., 2013).

Apesar da diversidade de informações presentes na literatura sobre a espécie, poucos estudos utilizando esta espécie vegetal têm sido desenvolvidos sobre a atividade antioxidante. Os antioxidantes são moléculas capazes de inibir a ação oxidante de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A ação oxidante das ROS está entre as casualidades mais recorrentes no que diz respeito ao aparecimento de doenças como o câncer, diabetes, doença de Parkinson e de Alzheimer (GODON et al., 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Com isso, tem crescido o interesse de estudos com o foco nos compostos de origem vegetal que tem potencial antioxidante,

justificado pela baixa possibilidade de toxicidade destas espécies, alto potencial farmacológico, diversidade de ocorrência e ainda o baixo custo.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo investigar as principais classes de compostos químicos, bem como avaliar, *in vitro*, a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Genipa americana*.

2 METODOLOGIA

2.1 Extração dos compostos fenólicos das folhas de *Genipa americana*

Para a obtenção do extrato bruto foi utilizado a metodologia descrita por Turnes et al., (2014, p.464), com adaptações. As folhas de *Genipa americana* foram coletadas no Distrito de Custódio/Quixadá-CE, lavadas com água destilada e secadas a temperatura ambiente. Cerca 200g do material vegetal foi imerso em etanol comercial (1:10, p/v) e macerado durante 15 dias a temperatura ambiente. Após este período quinzenal, o extrato foi mantido em banho-maria ($60 \pm 2^{\circ}\text{C}$) para evaporação total do solvente e obtenção do extrato etanólico.

2.2 Caracterização fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Genipa americana*

Para a realização dos testes fitoquímicos, 100mg do extrato são adicionados em 100mL de solução hidroalcoólica (etanol com 30% de água).

Para a determinação de fenóis totais e taninos, foi utilizado o reagente de cloreto férrico (FeCl_3) (9g de FeCl_3 em 50 mL de água e 2 mL de HCL 3M, completando com álcool etílico até 100 mL) (FOLIN-CIOCALTEU, 1927). Foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 em um tubo de ensaio contendo a solução hidroalcoólica da amostra. Qualquer variação de cor ou formação de precipitado abundante escuro indica teste positivo. O teste em branco utilizado foi somente água e solução alcoólica de FeCl_3 . O aparecimento de coloração variável entre o azul e vermelho é indicativa da presença de fenóis, quando o teste “branco” for negativo. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indica a presença de taninos pirogálicos

(hidrolisáveis) e de tonalidade verde, a presença de taninos flavofênicos (condensados ou catéquicos).

A determinação de esteroides e triterpenos foram baseadas no teste de Liberman Buchard. No béquer, contendo a solução hidroalcoólica da amostra evaporada foi adicionado entre 1-2 mL de clorofórmio e 1 mL de anidrido acético, agitando suavemente, e cuidadosamente, acrescentam-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteroides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

Para a Determinação de Alcaloides a amostra foi dissolvida em HCl 0,1 M e dividida em três tubos de ensaio. A cada tubo foi adicionado respectivamente, três gotas dos reagentes de precipitação de alcaloides: “Hager”, “Mayer” e “Dragendorff”, observando a formação de precipitado característico. Precipitado floculoso, pesado em pelo menos um dos tubos, é indicativo de alcaloides.

2.3 Análise qualitativa de atividade antioxidante

O extrato bruto foi analisado por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) usando rutina como padrão positivo de comparação. A placa foi eluída em CHCl₃/MeOH (9:1) e CHCl₃/MeOH/H₂O (65:30:5) e, após secagem, foi nebulizada com solução a 0,4 mmol/L do radical DPPH em MeOH²¹. A placa foi observada até o aparecimento de manchas amarelas sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antioxidante (SOUSA et. al., 2007).

2.4 Avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Genipa americana*

A Atividade Antioxidante foi determinada utilizando o 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) como descrito por BRAND-WILIAMS (1995). Em um tubo de ensaio, colocou-se 3,9 mL de uma solução metanólica de radical livre DPPH 6,5x10⁻⁵M, em seguida foi adicionado ao tubo 0,1 mL de solução metanólica da amostra do extrato testado. Os extratos foram testados nas concentrações

de 10.000, 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5 ppm. O ensaio foi realizado em triplicata.

As absorvâncias foram determinadas após 60 minutos de incubação na ausência de luz a temperatura ambiente, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm e utilizada para calcular o índice varredor da amostra em percentual (IV%). O IV equivale à quantidade necessária de amostra para inibir o radical livre DPPH. Os valores de IV encontrado foram aplicados no programa estatístico GraphPad Prism versão 5.0 para o cálculo da concentração que inibe 50% dos radicais livres da solução (IC₅₀). Usou-se a quercetina como padrão na mesma concentração do extrato.

2.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e o nível de significância avaliado por análise de variância (ANOVA) utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Extração dos compostos fenólicos das folhas de *Genipa americana*

O processo de extração etanólica resultou em um rendimento de 2%, o que equivale a 4 g do material utilizado, inicialmente, para a obtenção do extrato (Tabela 1). Apesar do baixo rendimento obtido, esta metodologia de extração é amplamente aplicada em estudos já descritos na literatura. Isso está ligado ao baixo custo do processo frente a outros que são utilizados com a mesma finalidade.

Tabela 1 – Rendimento do extrato etanólico obtido das folhas de *Genipa americana*

Parte da planta	Peso de material vegetal (g)	Rendimento do extrato	
		(g)	(%)
Folhas	200 g	4	2

Fonte: Próprio autor

No entanto, o estudo de SOUZA et al., (2015) utilizou uma metodologia semelhante, e foram obtidos rendimentos superiores para as frações do extrato bruto de *Inga edulis* (FI 11,6 g e FII 148,1 g). As espécies vegetais apresentam variações sazonais que podem influenciar diretamente nos resultados dos estudos que utilizam espécies vegetais (HARBORNE, 1994; BORELLA et al., 2001). Além disso, a diferença de rendimento pode está relacionado a fatores como volume de material vegetal utilizado, solvente utilizado e dia de coleta.

3.2 Caracterização fitoquímica do extrato etanólico das folhas *Genipa americana*

O extrato demonstrou a presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e alcaloides. No entanto, não foi verificado neste estudo a presença de compostos do tipo esteroides e triterpenoides. A composição química dos compostos vegetais é dependente de diversos fatores, como as características físico-químicas de solo, metodologia de extração, características fenológicas, variações fisiológicas sazonais e ainda variações climáticas anuais (CORRÊA JUNIOR et al., 2006) (Tabela 2).

Em um estudo diferente, MADEIRA (2014) avaliou a composição química do extrato polissacarídico das folhas de *G. americana*, e foi verificada a presença predominante de compostos do tipo carboidratos, ácido urônico e proteínas totais. Além disso, a análise quantitativa da composição monossacarídica por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS) demonstrou a presença de compostos do tipo arabinose e galactose. Esses resultados demonstram a alta complexidade e variedade química dos compostos presentes nas folhas de *Genipa americana*.

Diferente destes resultados, o estudo de REZENDE (2010), utilizou a polpa dos frutos de *G. americana* para caracterização e avaliação do potencial de bioatividade e atividade antioxidante. O isolamento e identificação estrutural demonstrou a presença de uma mistura de ácido cinâmico e ácido octanóico na

polpa dos frutos de *G. americana*. Essa mistura era composta de β -sitosterol e estigmasterol, do ácido octanóico, do ácido cinâmico e da escopoletina.

A presença de compostos fenólicos e flavonoides, principalmente, são importantes indicativos da presença de atividade antioxidante (CHEN, XIE, NIE, LI, & WANG, 2008; QIAO et al., 2009). A atividade antioxidante de vegetais está diretamente relacionada com a presença de compostos polifenólicos. Nos estudos de MORAES-DE-SOUZA et al., (2008) e SILVA et al., (2016) foram obtidos resultados semelhantes, onde foi verificado a presença predominante de compostos fenólicos, taninos e alcaloides.

Tabela 2 – Caracterização fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *Genipa americana*

Classes de metabolitos						
<i>G. americana</i>						
	Fenóis	Flavonoides	Taninos	Alcaloides	Esteroides	Triterpenoides
Folhas	+	+	+	+	-	-

Presente (+); Ausente (-)

Fonte: Próprio autor

3.3 Análise qualitativa e efeito antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Genipa americana* sobre a atividade antioxidante

A avaliação preliminar qualitativa do extrato bruto por CCD em gel de sílica, revelada com solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH, sugeriu a existência de substâncias com atividade antioxidante, evidenciada na cromatoplaça pela presença de manchas amarelas sobre fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH.

A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH de acordo com o descrito por BRAND-WILIAMS (1995). O método baseia-se na redução da molécula do radical livre DPPH. Após o cálculo do índice de varredura em percentagem (IV%), os resultados foram aplicados ao Programa Microsoft Excel versão 2010, e foi determinada a concentração que inibe cinquenta por cento do radical livre DPPH (IC₅₀).

Dentre as diversas classes de compostos antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos tem recebido muita atenção nos últimos anos. O interesse em estudos sobre a atividade antioxidante, relacionados aos compostos fenólicos e flavonoides, está ligado à estrutura química e a capacidade redutora destas moléculas de origem vegetal (AYRES; CHAVES, 2010).

Estas características tem papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, com mecanismo de ação tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os compostos intermediários formados pela ação dos antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (SOUSA et al., 2007; ROESLER et al., 2007).

Além disso, é sabido que as espécies reativas de oxigênio são extensivamente prejudiciais à saúde humana, que podem gerar doenças degenerativas, envelhecimento precoce e morte celular (ALVES et al., 2007; NEVES et al., 2008).

Diferentes autores vêm empregando o mesmo método para avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais, tendo-se observado resultados semelhantes e significativos (LIMA et al., 2006; SOUSA et al., 2007; ROESLER et al., 2007; IHA et al., 2008; NUNES et al., 2008; AYRES; CHAVES, 2010).

A partir dos resultados obtidos, onde o IC₅₀ foi 896,47 µg/mL, é possível determinar que o extrato etanólico das folhas de *G. americana* demonstrou baixa atividade antioxidante se comparado ao padrão quercetina (IC₅₀ de 62,7 µg/mL). Esse resultado pode estar relacionado com a presença em baixas quantidades, dos compostos fenólicos e flavonoides no extrato utilizado neste estudo. Além disso, a baixa atividade antioxidante pode está relacionada com a interferência de outros compostos presentes na amostra vegetal que não foram identificados.

Esse resultado é semelhante ao obtido por REZENDE (2010) na avaliação da escopoletina isolada da *G. americana*. Quando avaliada no teste de sequestro do radical livre DPPD e no Método da inibição da auto-oxidação do β -caroteno, em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), a substância apresentou baixa atividade quando comparada ao padrão ácido gálico nas mesmas concentrações. No entanto, a capacidade antioxidante avaliada neste estudo não utilizou compostos isolados, mas o extrato, o que influencia a necessidade de novos estudos para investigação mais específica do potencial antioxidante da espécie vegetal *G. americana*.

No entanto, estes resultados são inferiores aos obtidos no estudo de ROESLER et al., (2007), que avaliou a capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH) de frutas típicas do cerrado. O extrato etanólico das cascas e sementes de *Annona crassiflora* (araticum) (30,97 e 49,18 mg/mL^{-1}), do extrato etanólico e aquoso de casca de *Caryocar brasiliense* (pequi) (9,44 e 17,98 mg/mL^{-1}) e extrato etanólico das sementes de *Eugenia dysenterica* (cagaita) (14,15 mg.mL^{-1}), respectivamente.

As diferentes partes das espécies vegetais como cascas, folhas, frutos e sementes, utilizadas para avaliar a capacidade de sequestrar radicais livres podem influenciar diretamente nos resultados. Pois, os compostos com potencial antioxidante podem ser encontrados em diferentes concentrações nas diferentes partes vegetais.

Tabela 2 – Efeito antioxidante do extrato etanólico das folhas de *Genipa americana*, pelo método DPPH

Extrato	Equação da Reta	R ²	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	
			(Média \pm Desvio Padrão)	Atividade Antioxidante
Quercetina	$y = 0,513x + 17,76$	0,988	62,7 \pm 0,03	Alto efeito
Folhas	$y = 0,0884x - 29,248$	0,9531	896,47 \pm 23,4	Baixo efeito

Fonte: Próprio autor

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato bruto demonstrou bom rendimento, sendo constituído de compostos de alto potencial biológico, como fenóis, flavonoides, taninos e alcaloides. No entanto, o extrato bruto demonstrou baixa atividade antioxidante. Sugere-se que os compostos químicos sejam isolados e caracterizados para determinação do mecanismo de ação destas moléculas frente à atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

- BORN, G. V. R. CROSS, M. J. The aggregation of blood platelets. **The Journal of Physiology**, v.168, p.178–195. 1963.
- BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER ME, BERSET C. Use of and free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. **Food Sci Technol**, v.28, p.25-30. 1995.
- BORELLA J.C. FONTOURA A. MENEZES Jr. A., FRANÇA, S.C. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) - Carqueja. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 4, p. 99-102, 2001.
- BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.692-707. 2013.
- CARVALHO, C. C. et al. Biological screening of extracts of Brazilian Asteraceae plants. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.7, n.28, p. 2000-2005. 2013.
- CHEN, Y., XIE, M.-Y., NIE, S.-P., LI, C., & WANG, Y.-X. Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Ganoderma atrum*. **Food Chemistry**, v. 107(1), p.231–241, (2008).
- CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivada. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/IBDF, BR. 4, p.765. 1984.
- CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: **Columbia University**, p.1260. 1981.
- DELPRETE, P. G.; SMITH, L. B.; KLEIN, R. M. Flora ilustrada catarinense: Rubiáceas. Itajaí: **Herbário Barbosa Rodrigues**, v.2, p.842. 2005.
- HARBORNE J.B., The flavonoids – advances in research since 1986. London: Chapman & Hall, 1994.
- MOURÃO, P. A. S. et al. Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm sulfated fucose high anticoagulant action. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 271, p. 23973-23984. 1996.
- MORAES-DE-SOUZA, R. A. et al. Antioxidant activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. **Cien Tecnol Aliment**, v. 6, p. 41-7. 2008.

- MATOS F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. UFC. Fortaleza-Ceará, 45pp. Ed. UFC. 2009.
- MORAIS, S. M. et al. Correlação entre as atividades antiradical, antiacetilcolinesterase e teor de fenóis totais de extratos de plantas medicinais de farmácias vivas. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15(4), p.575-582. 2013.
- MADEIRA, J. C. Polissacarídeos da folha de *Genipa americana*: isolamento, caracterização química e efeitos anticoagulante, antiplaquetário, antitrombótico e anti-inflamatório. **Dissertação de mestrado**, 2014.
- ONO, M. et al. Three new monoterpenoids from the fruit of *Genipa americana*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n.4, p. 632-634. 2007.
- PEREIRA, M. G. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action. **Carbohydr Res**, v. 340, n. 12, p. 2015-2023. 2005.
- QIAO, D. L., et al. Antioxidant activities of polysaccharides from *Hyriopsis cumingii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 78(2), p. 199–204, 2009.
- REVILLA, J. Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis. 2. ed. Manaus: **Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnologia**, p. 405. 2001.
- REZENDE, L. C. Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia. **Tese de Doutorado**, 2010.
- RACQUEL O. S. S. et al. Purified polysaccharides of *Geoffroea spinosa* barks have anticoagulant and antithrombotic activities devoid of hemorrhagic risks. **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 208-215. 2015.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phophomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SOUSA, C. M. M. et al., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, vol. 30, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, J. N. S. et al. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, p. 1276-1280. 2007.
- SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v.18, n.1, p.140-156. 2013.
- SILVA, C. F. G. et al. Parâmetros de qualidade físico-químicos e avaliação da atividade antioxidante de folhas de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae) submetidas a diferentes processos de secagem. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.48-56. 2016.
- YOON, S. J. et al. The medicinal plant *Porana volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. **Thromb Res.**, v. 106, p. 5158. 2002.

YANG, B. et al. Effects of ultrasonic extraction on the physical and chemical properties of polysaccharides from longan fruit pericarp. **Polymer Degradation and Stability**., v.93, p.268–272. 2008.