

AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES, ANTICOLINESTERÁSICAS E CITOTÓXICAS DOS FRUTOS DE *Allophylus edulis* (A.ST.-HIL., CAMBESS. & A. JUSS.) RADLK. (SAPINDACEAE)

Suzana Harue Umeo¹
Tânia Mayumi Ito¹
Meire Emiko Yokota¹
Mariza Barion Romagnolo²
Antonio Laverde Junior^{1*}

UMEO, S. H.; ITO, T. M.; YOKOTA, M. E.; ROMAGNOLO, M. B.; LAVERDE-JUNIOR, A. Avaliação das propriedades antioxidantes, anticolinesterásicas e citotóxicas dos frutos de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. (Sapindaceae). **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 167-171, maio/ago. 2011.

RESUMO: O extrato alcoólico dos frutos da espécie nativa *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. (Sapindaceae), popularmente conhecida como “vacum”, “fruto-de-pombo”, “vacunzeiro”, “chal-chal”, “murta vermelha”, foi avaliado no presente trabalho quanto às atividades citotóxicas, antioxidantes e anticolinesterásicas. O extrato dos frutos mostrou baixa toxicidade pelo bioensaio de letalidade frente à náuplios de *Artemia salina* Leach ($CL_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$), não sendo considerado citotóxico. As propriedades antioxidantes foram investigadas *in vitro* pelo método de DPPH e foram consideradas bastante significativas ($CI_{50} = 46,4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Apenas um componente do extrato mostrou atividade anticolinesterásica pelo ensaio enzimático de inibição de acetilcolinesterase. Estes resultados sugerem que os frutos de *Allophylus edulis* apresentem baixa toxicidade e sejam considerados uma fonte de metabólitos bioativos, podendo ser indicados em terapias de doenças relacionadas com a presença de radicais livres. Tanto a atividade antioxidante quanto a atividade anticolinesterásica estão sendo relatadas pela primeira vez para esta espécie.

PALAVRAS-CHAVE: *Allophylus edulis*. Vacum. Fruto-de-pombo. Sapindaceae. Atividade antioxidante. Atividade anticolinesterásica.

EVALUATION OF ANTIOXIDANT, CYTOTOXIC AND ANTICHOLINESTERASE PROPERTIES OF *Allophylus edulis* (A.ST.-HIL., CAMBESS. & A. JUSS.) RADLK. (SAPINDACEAE) FRUITS

ABSTRACT: The alcoholic fruit extract of native species *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. (Sapindaceae), commonly known as “vacum”, “fruto-de-pombo”, “vacunzeiro”, “chal-chal”, “murta vermelha”, was evaluated in this study regarding its cytotoxic, antioxidant and anticholinesterase activities. The fruit extract showed low toxicity to bioassay lethality for *Artemia salina* Leach ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$) and not considered cytotoxic. The antioxidant properties were investigated *in vitro* by DPPH method and were considered highly significant ($IC_{50} = 46.4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Only one component of this extract showed anticholinesterase activity by enzymatic assay of inhibition of acetylcholinesterase. These results suggest that *Allophylus edulis* fruits have low toxicity and are considered a source of bioactive metabolites, may be prescribed in the therapy of diseases related to the presence of free radicals. Both the antioxidant and anticholinesterase activities for this species have been reported for the first in this study.

KEYWORDS: *Allophylus edulis*. “Vacum”. “Fruto-de-pombo”. Sapindaceae. Antioxidant activity. Anticholinesterasic activity.

Introdução

Allophylus edulis (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk., popularmente conhecida como “chal-chal”, “vacum”, “fruto-de-pombo”, “vacunzeiro”, “murta vermelha”, “pau-de-pedreira”, é uma espécie pertencente à família Sapindaceae (LORENZI, 1992). Encontra-se distribuída em boa parte da América do Sul (Guiana, Brasil, Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai). Corresponde a uma árvore de porte médio, sendo muito utilizada na recuperação de ecossistemas degradados. A madeira produzida é de boa qualidade, podendo ser utilizada em diversas áreas (marcenaria, carvão, esteiras, moirões) (SENEME; POSSAMAI; SCHUTA, 2006). Tanto as folhas, quanto os frutos de *A. edulis* possuem propriedades terapêuticas. A infusão das folhas é empregada no tratamento de diabetes (DIAZ et al., 2008), em inflamações de garganta, feridas, pressão alta, problemas

intestinais e digestivos (ABREU et al., 2005). Já os frutos maduros são comestíveis e quando fermentados produzem a bebida “chicha” (ABREU et al., 2005). Alguns estudos relataram que *A. edulis* apresenta propriedades repelentes contra insetos (CASTILHO et al., 2009) e atividade genotóxica (YAJIA et al., 1999).

Outras espécies do gênero *Allophylus* também apresentam propriedades biológicas e medicinais interessantes. A espécie *A. serratus* possui atividades antiosteoporogênica (MANMEET et al., 2010) e antiulcerogênica (DHARMANI et al., 2005). Segundo Marwah et al. (2007), as folhas de *A. rubifolius* apresentam potencial capacidade antioxidante. Outra espécie com propriedades biológicas importantes é a *A. cobbe*, a qual mostrou atividades nematocidas e inseticidas (JAYASINGHE et al., 2003a; 2003b).

¹Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e Geociências, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, s/n, cx. p. 224, CEP 87502-210, Umuarama, PR, Brasil.

²Laboratório de Botânica, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil. (*correspondência: laverdej@unipar.br)

Quanto à composição química das espécies deste gênero, ainda há poucos estudos. Segundo Yajia et al. (1999), a espécie *A. edulis* é constituída por compostos fenólicos, cianoglicosídeos, flavonoides, antraquinonas, naftoquinonas, alcaloides, esteroides e triterpenoides. Diaz et al. (2008), isolaram o *L*-quebrachitol, uma substância com potencial para substituir o açúcar, cujo consumo justificaria o uso popular desta planta em tratamento contra o diabetes. O óleo das sementes de *A. edulis*, *A. dregeanus* e *A. natalensis* mostraram-se ricos em compostos cianolipídicos (AICHHOLZ; SPITZER; LORBEER, 1997; AVATO et al., 2005). Das folhas da espécie *A. caldatus* foram identificados alguns poliprenois (CIEPICHAL et al., 2007). Dos frutos de *A. laevigatus* foram identificados o sesquiterpeno 11-acetoxi-4-alfa-metoxieudesmano e as flavonas carissona e apigenina 8-C-beta-rhamnopiranosídeo (DAVID; SANTOS; DAVID, 2004). E finalmente, da espécie *A. cobbe* foram isoladas algumas amidas ácidas (JOHNS; LAMBERTO, 1969).

Considerando a importância de ampliar o conhecimento a respeito de novas propriedades biológicas de espécies brasileiras nativas, o presente estudo buscou avaliar potenciais atividades da espécie *Allophylus edulis* (Camb.) Radlk. (Sapindaceae). Neste sentido, o extrato dos frutos de *A. edulis* foi avaliado pelo bioensaio de letalidade frente à *Artemia salina* quanto à atividade citotóxica, pelo método *in vitro* de inibição do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) quanto às propriedades antioxidantes, e pelo ensaio enzimático de inibição de acetilcolinesterase quanto à atividade anticolinesterásica.

Material e Métodos

Material Vegetal

Os frutos maduros da espécie *Allophylus edulis* foram coletados em área remanescente de floresta estacional semidecidual do Noroeste do Paraná (coordenadas 52º 52'W e 22º 36'S, Diamante do Norte, PR). A planta foi identificada botanicamente pela Profª. Drª. Mariza Barion Romagnolo, da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Uma exsiccata encontra-se depositada no Herbário Educacional da Universidade Estadual de Maringá, sob o registro nº HUEM 21466.

Reagentes e Soluções

A solução de água do mar artificial empregada no teste de citotoxicidade foi preparada pela dis-

solução de 38,0g de sal marinho em 1,0 L de água deionizada. Uma solução do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH; Sigma-Aldrich®) foi preparada em metanol (4,7mg/200mL) para a avaliação da atividade antioxidante. Acetilcolinesterase de peixe elétrico (EC 3.1.1.7, Sigma-Aldrich®) foi utilizada em todos os ensaios bioautográficos. A enzima liofilizada foi dissolvida em solução tampão (Tris 0,05 M, pH 7,8 contendo 1mg/mL de albumina de soro bovino - BSA, 98%, Sigma-Aldrich®) para obter uma solução 1U/mL. Acetato de α -naftila (Sigma-Aldrich®) foi o substrato utilizado no ensaio (solução 1,5 % em etanol PA/água). O sal *Fast Blue B* (95%, Sigma-Aldrich®) foi utilizado como reagente nos ensaios bioautográficos na concentração de 0,5% em água MilliQ®.

Preparação dos extratos

As polpas dos frutos frescos (400 g) de *A. edulis* foram separadamente submetidas a um processo de extração exaustiva por maceração estática com etanol. O extrato etanólico resultante foi seco por evaporação em evaporador rotativo sob pressão reduzida para total remoção do solvente, seguido de liofilização (48h), originando o extrato alcoólico bruto dos frutos de *A. edulis* (AEB, 11,2 g).

Teste de atividade citotóxica

Para determinar a atividade citotóxica do extrato alcoólico dos frutos de *A. edulis* foi utilizado o teste de letalidade frente a *Artemia salina* Leach (MEYER et al., 1982). Os ovos de *A. salina* foram incubados à temperatura ambiente por 48 horas em água do mar artificial até a eclosão dos mesmos. As larvas, também conhecidas como náuplios, possuem fototropismo positivo, por isso foi utilizada uma fonte de luz artificial para atrair e facilitar a coleta. Dez larvas recém eclodidas de *A. salina* foram transferidas para tubos de ensaio, contendo 5,0 mL água do mar artificial e o extrato dos frutos a ser testado em diferentes concentrações (1000, 500, 250, 125, 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Após 24h foi realizada a contagem das larvas mortas. Esse número foi usado para o cálculo da concentração letal para 50% das larvas (CL_{50}) empregando o método de Probitos. Os extratos com $CL_{50} < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram considerados ativos (MEYER et al., 1982). Como controle negativo utilizou-se água salina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Teste de atividade antioxidante

A atividade sequestradora de radical livre (antioxidante) do extrato alcoólico dos frutos de *A. edulis* foi determinada na presença do radical livre estável DPPH (MOLYNEUX, 2004). Os experimentos foram realizados adicionando-se em cada tubo de ensaio 2,9 mL da solução metanólica de DPPH (4,7mg/200mL) e 100µL da solução metanólica de diferentes concentrações do extrato bruto. O extrato foi avaliado em concentrações decrescentes de 1000, 500, 250, 125, 62,5 e 31,25 µg mL⁻¹. As leituras das absorbâncias (515 nm) foram realizadas em espectrofotômetro (FEMTO, modelo 700 plus). Uma solução de butil hidroxianisol (BHA; 100µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão positivo. Todas as análises foram realizadas em triplicata com repetição (n=6) e apresentadas em porcentagem de inibição (%), calculados em relação à amostra controle (metanol+DPPH 60µM). Os desvios padrões foram dados em porcentagem de inibição. A atividade antioxidante foi calculada através da equação:

$$\%DPPH = [(Abs\ C - Abs\ A) * 100] / (Abs\ C)$$

onde Abs C e Abs A correspondem às absorbâncias do controle e da amostra, respectivamente (MOLYNEUX, 2004).

Avaliação da atividade anticolinesterásica

O ensaio bioautográfico foi conduzido segundo metodologia descrita por Marston, Kissing; Hostettman (2002), com algumas modificações (YANG et al., 2009; SILVEIRA et al., 2011). Diferentes alíquotas do extrato bruto (600, 400, 200, 150, 100, 50 e 25 µg) foram aplicadas em cromatoplaça de alumínio (10X10cm, sílica Gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm de espessura) para a obtenção de uma série decrescente de análises com diferentes quantidades do extrato para uma análise qualitativa do potencial de atividade de cada um dos componentes ativos. A cromatoplaça foi eluída com uma mistura dos solventes diclorometano/metanol (9:1). Após a migração das amostras e secagem para eliminação total dos solventes, a cromatoplaça foi borrifada com uma solução da enzima (AChE em solução tampão tris) e em seguida, com a solução contendo acetato de α-naftila. A placa foi submetida a uma breve secagem parcial, e foi mantida em banho-maria (37 °C) por 20 minutos, para incubação da enzima. Decorrido este período, a cromatoplaça foi borrifada com o reagente colorimétrico sal *Fast Blue B*, promovendo a formação de uma coloração

púrpura em toda a superfície da cromatoplaça após poucos minutos. A atividade anticolinesterásica foi determinada pela ausência da coloração púrpura característica (manchas brancas após 5 minutos) em comparação com outras regiões da placa, demonstrando desta forma a ação inibitória das substâncias avaliadas sobre a atividade da enzima.

Resultados e Discussão

O teste de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach representa um bioensaio rápido, barato e simples para testes de bioatividade em extratos de plantas, correlacionando-se razoavelmente bem com propriedades citotóxicas e anti-tumorais (MEYER et al., 1982). No presente estudo, este teste foi empregado para avaliar a citotoxicidade do extrato bruto dos frutos de *A. edulis*, cujos resultados são apresentados na Figura 1.

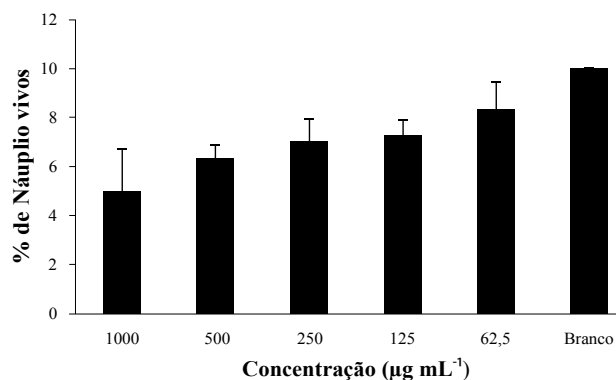


Figura 1: Avaliação da letalidade de extratos de *Allophylus edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. (Sapindaceae) frente a náuplios de *Artemia salina* Leach.

Meyer et al. (1982) classificaram extratos vegetais brutos como tóxico (CL₅₀ < 1000 µg mL⁻¹) ou atóxico (CL₅₀ > 1000 µg mL⁻¹), de acordo com os níveis requeridos para atingir a CL₅₀ nos ensaios de letalidade com *A. salina*. Baseado nesta classificação, o extrato bruto dos frutos de *A. edulis* não foi considerado citotóxico (CL₅₀ > 1000 µg mL⁻¹). Pode-se concluir que esta espécie não apresenta substâncias com características citotóxicas em concentração suficiente. Logo, a ausência de citotoxicidade observada pode ser um indicador de que a planta pode ser bem tolerada pelo sistema biológico. Entretanto, estudos mais detalhados para a avaliação da toxicidade deste extrato se fazem necessários empregando-se outros modelos (*in vitro* e *in vivo*).

A atividade antioxidante do extrato dos frutos de *A. edulis* foi avaliada por meio da quantificação do radical livre DPPH sequestrado. Esta metodologia se baseia na transferência de elétrons de um composto

antioxidante para um oxidante, o DPPH (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Este extrato mostrou alto percentual de inibição do radical DPPH, superior a 90%, para concentrações acima de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 2).

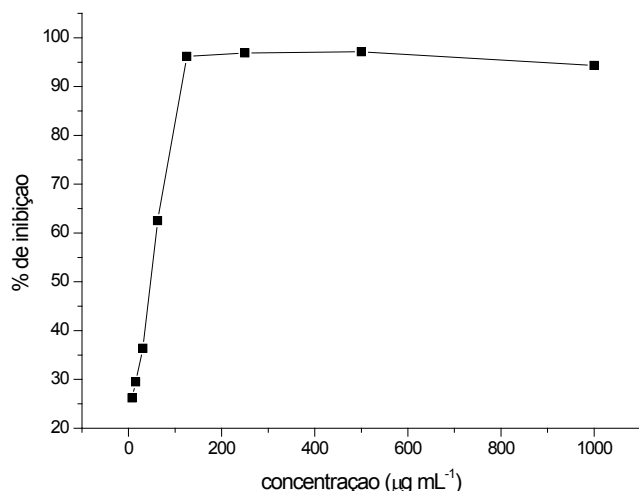


Figura 2: Percentual de inibição do radical livre de DPPH pelo extrato bruto dos frutos de *A. edulis* (A.St.-Hil., Cambess. & A. Juss.) Radlk. (Sapindaceae).

A concentração responsável pela inibição de 50% (CI_{50}) do radical estável de DPPH foi obtida com base na série de experimentos espectrofotométricos, com diferentes concentrações do extrato bruto (Figura 2). O valor de CI_{50} obtido foi de aproximadamente 46,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Desta forma, constatou-se que este extrato apresenta propriedades antioxidantes expressivas, as quais devem estar relacionadas com a composição química dos metabólitos secundários. Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonoides e taninos (DECKER, 1997). Segundo Yajia et al. (1999), a espécie *A. edulis* apresenta composição fitoquímica complexa, com compostos fenólicos, flavonoides, naftoquinonas, antraquinonas, alcaloides, esteroides e triterpenoides. Considerando o perfil fitoquímico conhecido na literatura, poder-se-ia correlacionar a capacidade de sequestrar radicais livres observada no presente trabalho com a presença de compostos fenólicos. Apenas uma espécie deste gênero, *A. rubifolius* (MARWAH et al., 2007), foi avaliada quanto à atividade antioxidante, a qual mostrou excelentes propriedades antioxidantes, com $\text{CI}_{50} = 7,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Outra atividade avaliada no presente estudo foi a capacidade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE). Os inibidores da AChE são utilizados no tratamento da doença de Alzheimer. Esta doença é uma desordem neurodegenerativa do cérebro, res-

ponsável por cerca de metade dos casos de demência dentre pessoas sexagenárias (VIEGAS JR et al., 2004). Dessa forma, a elevação do nível da acetilcolina pode se mostrar útil para amenizar a deficiência da aprendizagem, um dos sinais da doença (TREVISAN; MACEDO, 2003).

Nos ensaios anticolinesterásicos qualitativos, a inibição da enzima acetilcolinesterase foi observada somente para um componente de polaridade média ($R_f = 0,16$), presente no extrato. No ensaio bioautográfico quantitativo preliminar, este composto apresentou atividade nos extratos aplicados a partir de 100 μg . Diante da evidente inibição da atividade anticolinesterásica, observada a partir do extrato dos frutos com 100 μg , este resultado demonstra atividade anticolinesterásica moderada e agrega valor às plantas do gênero *Allophylus*, como fonte de compostos bioativos. Este é o primeiro relato desta atividade para plantas deste gênero.

Conclusão

Os resultados obtidos nesta investigação sugerem que o extrato dos frutos da espécie *A. edulis* possa ser considerado uma fonte de compostos bioativos. Os frutos mostraram baixa toxicidade frente a *Artemia salina*, alta atividade antioxidante e, pelo menos um componente com atividade anticolinesterásica moderada. Desta forma, os frutos desta espécie poderiam ser indicados em tratamentos de doenças relacionadas à presença de radicais livres. Tanto a atividade antioxidante, quanto a atividade anticolinesterásica estão sendo relatadas pela primeira vez para esta espécie.

Agradecimentos

Nossos agradecimentos à Universidade Paranaense (UNIPAR) pelo apoio financeiro recebido. A mestranda S. H. Umeo agradece a concessão da bolsa PROSUP/CAPES e as mestrandas T. M. Ito e M. E. Yokota agradecem pelas bolsas PIT/UNIPAR.

Referências

ABREU, D. C. A. et al. Caracterização morfológica de frutos, sementes e germinação de *Allophylus edulis* (St.-Hil.) Radlk. (Sapindaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 2, p. 59-66, 2005.

AICHHOLZ, R.; SPITZER, V.; LORBEER, E. Analysis of cyanolipids and triacylglycerols from Sapindaceae seed oils with high-temperature

gas chromatography and high-temperature gas chromatography chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 787, n. 1-2, p. 181-194, 1997.

AVATO, P. et al. Cyanolipid-rich seed oils from *Allophylus natalensis* and *A. dregeanus*. **Lipids**, v. 40, n. 10, p. 1051-1056, 2005.

CASTILLO, L. et al. Screening of Uruguayan plants for deterrent activity against insects. **Industrial Crops and Products**, v. 29, n. 1, p. 235-240, 2009.

DAVID, J. P.; SANTOS, I. D.; DAVID, J. M. A new sesquiterpene from the fruits of *Allophylus laevigatus*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 795-798, 2004.

DECKER, A. Phenolics: Prooxidants or Antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396-398, 1997.

DHARMANI, P. et al. *Allophylus serratus*: a plant with potential anti-ulcerogenic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 361-366, 2005.

DIAZ, M. et al. First record of L-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 15, p. 2699-2700, 2008.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais livres DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

CIEPICHAL, E. et al. Alloprenols: novel alpha-trans-polyprenols of *Allophylus caudatus*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, n. 2, p. 103-112, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

JAYASINGHE, U. L. B. et al. Antifeedant activity of some Sri Lankan plants. **Natural Product Research**, v. 17, n. 1, p. 5-8, 2003a.

_____. Nematicidal activity of some Sri Lankan plants. **Natural Product Research**, v. 17, n. 4, p. 259-262, 2003b.

JOHNS, S. R.; LAMBERTO, J. A. Isolation of simple acid amides from *Allophylus cobbe* (Sapindaceae), *Homalium foetidum* (Flacourtiaceae)

and from an *Aglaia* species (Meliaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 1315, 1969.

MANMEET, K. et al. Anti-osteoporotic constituents from Indian medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 993-999, 2010.

MARWAH, R. G. et al. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 465-470, 2007.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 212-219, 2004.

SENEME, A. M.; POSSAMAI, E.; SCHUTA, L. R. Germinação e sanidade de sementes de vacum (*Allophylus edulis*). **Revista Ceres**, v. 53, n. 305, p. 1-6, 2006.

SILVEIRA, S. et al. Atividade anticolinesterásica dos frutos de *Myrcianthes pungens* (O.Berg.) D.Legrand (Myrtaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 15, n. 2, p. 127-133, 2011.

TREVISAN, M. T. S.; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301, 2003.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

YAJIA, M. E. et al. Genotoxicity evaluation of *Allophylus edulis* (Camb.) Radlk. (Sapindaceae) aqueous extract. **Acta Horticulturae**, n. 501, p. 31-35, 1999.

YANG, Z. et al. Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. **Journal Separation Science**, v. 32, p. 3257-3259, 2009.

Recebido em: 15/11/2010

Aceito em: 10/09/2011

Received on: 15/11/2010

Accepted on: 10/09/2011