

Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*

[*Melaleuca alternifolia* activity in nanoformulations and terpinen-4-ol against *Rhodococcus equi* isolates]

L. Sagave, L.T. Gressler, F.C. Flores, C. B. Silva, A.P.C. Vargas, M. Lovato, L.A. Sangioni, L. Pötter, S.A. Botton

Universidade Federal de Santa Maria – UFSM – Santa Maria, RS

RESUMO

Rhodococcus equi é o agente etiológico da rodococose equina, importante doença respiratória de potros. Especialmente na última década, a emergência de cepas resistentes aos antimicrobianos empregados no tratamento da rodococose tem sido relatada. Nesse sentido, há a necessidade de estudos envolvendo terapias alternativas e novas tecnologias, incluindo o uso de plantas medicinais e nanotecnologia. Neste trabalho utilizou-se *Melaleuca alternifolia* nas seguintes formulações: óleo livre, nanocápsula, nanoemulsão e a combinação de óleo livre com nanocápsula e com nanoemulsão, além do seu composto majoritário, terpinen-4-ol, a fim de verificar a atividade antimicrobiana frente a isolados de *R. equi* de diferentes origens. Utilizou-se o método de microdiluição em caldo na determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) das diferentes formulações frente aos isolados (n=24). Verificou-se baixo potencial para atividade antibacteriana de *M. alternifolia* na formulação de óleo livre. Todavia, essa atividade foi potencializada quando se incorporou o óleo essencial às nanoformulações. O composto terpinen-4-ol demonstrou potencial atividade antibacteriana quando incorporado ao óleo essencial e quando utilizado isoladamente. Verificou-se que tanto *M. alternifolia* quanto terpinen-4-ol testados possuem atividade antimicrobiana contra isolados de *R. equi*, sugerindo seu emprego em estudos avaliando seu potencial para o tratamento da rodococose.

Palavras-chave: planta medicinal, nanotecnologia, rodococose, teste de susceptibilidade

ABSTRACT

Rhodococcus equi causes rodococose in horses, characterized by bronchopneumonia in foals. Due to reports of antimicrobial resistance, it is important to develop studies involving alternative therapies and new technologies, including the use of medicinal plants and nanotechnology. In this work, the plant *Melaleuca alternifolia* in oil free formulations, nanocapsule, nanoemulsion and the combination of free and nanocapsule oil nanoemulsion, besides its major compound, terpinen-4-ol, were used in order to verify antimicrobial activity against isolates of *R. equi*. The broth microdilution method was employed to determine the minimum inhibitory (MIC) and minimum bactericidal (MBC) concentrations of different formulations against 24 isolates. There was low antibacterial activity of *M. alternifolia* in oil free formulation; however, it was observed that the activity was enhanced when incorporated as essential oil the nanoformulations. The major compound, terpinen-4-ol, showed bactericidal and bacteriostatic activity when used alone. It is suggested that *M. alternifolia*, in association with nanocarriers systems, as well as terpinen -4-ol, presents potential for future studies concerning the equine rodococosis therapy.

Keywords: medicinal plant, nanotechnology, rodococosis, susceptibility test

INTRODUÇÃO

A rodococose equina é uma enfermidade infecciosa cosmopolita, e no Brasil é relatada como uma das mais importantes enfermidades respiratórias em potros (Ribeiro *et al.*, 2005). O agente etiológico é a bactéria intracelular facultativa *Rhodococcus equi*, habitante do solo e saprófita do trato intestinal de herbívoros (Meijer e Prescott, 2004). A principal manifestação clínica da doença é a broncopneumonia piogranulomatosa, uma vez que a maioria dos animais contaminam-se pela inalação de partículas de poeira contendo *R. equi* (Muscatello *et al.*, 2007).

O tratamento com antimicrobianos macrolídeos em associação com a rifampicina é a principal forma de controle da doença; no entanto, a existência de isolados de *R. equi* resistentes a esses compostos vem sendo relatada (Giguère *et al.*, 2002). Devido à crescente preocupação com a resistência antimicrobiana observada, tanto na medicina humana quanto na veterinária, pesquisas envolvendo terapias alternativas, com plantas medicinais e seus compostos, vêm sendo realizadas, a fim de obter-se uma maior variedade de fármacos com ação antimicrobiana (Bertini *et al.*, 2005). Devido aos inúmeros mecanismos de ação, em diferentes alvos da célula microbiana, manifestações de resistência ou adaptação microbiana aos vegetais medicinais e seus derivados raramente são relatadas (Bakkali *et al.*, 2008). Apesar de todo esse potencial, no Brasil, somente cerca de 1% dos compostos fitoterápicos disponíveis comercialmente são desenvolvidos para uso em medicina veterinária (Ozaki e Duarte, 2006).

Melaleuca alternifolia, também conhecida como “árvore do chá”, é uma planta nativa da Austrália, e o seu óleo essencial (extraído das folhas por hidrodestilação) possui comprovada ação antibacteriana, antifúngica e antiviral (Silva *et al.*, 2002). Na composição do óleo de *M. alternifolia* estão presentes monoterpênicos, sesquiterpênicos e seus alcoóis correspondentes (Carson *et al.*, 2006), sendo os seus principais constituintes: terpinen-4-ol (40%), seguido do γ -terpineno (23%) e α -terpineno (10%), destacando-se mais o efeito antimicrobiano do terpinen-4-ol (Oliva *et al.*, 2003).

Estratégias visando aperfeiçoar as características físico-químicas de substâncias bioativas envolvem, também, inovações tecnológicas, como a nanotecnologia. Atualmente, sistemas coloidais incluindo as nanocápsulas, as nanoesferas, as nanoemulsões e outros sistemas nanoestruturados são alvos de pesquisas sobre novas formas de carrear fármacos para locais específicos e a liberação controlada dessas substâncias (Schaffazick *et al.*, 2003). Nas áreas de produção e sanidade animal, relatos da utilização de nanoestruturas são escassos (Troncarelli *et al.*, 2013). Como exemplo, um estudo experimental em microbiologia veterinária demonstrou a maior eficácia de estreptomicina e doxiciclina quando esses fármacos foram incorporados às nanoestruturas e testados frente a isolados de *Brucella melitensis*. Os autores concluíram que os fármacos livres foram menos eficazes na redução da carga bacteriana presente no fígado e no baço de *Mus musculus* infectados do que na forma de nanocápsulas (Seleem *et al.*, 2009). Mosqueira *et al.* (2010) patentearam nanocarreadores poliméricos do iodo para aplicação intramamária em ruminantes como uma alternativa para o tratamento de mastite, porém ainda se encontra em fase de estudos.

As nanoemulsões são dispersões de óleo em água, com as gotículas do óleo estabilizadas por tensoativos (Anton *et al.*, 2008). As nanocápsulas possuem na sua composição a presença de um núcleo oleoso circundado por um fino invólucro polimérico, e o fármaco encontra-se dissolvido no núcleo, adsorvido ou disperso na parede polimérica (Vauthier e Bouchemal, 2009). Esses sistemas submicrométricos são capazes de promover a diminuição de efeitos tóxicos e aumentar o índice terapêutico de fármacos (Schaffazick *et al.*, 2003).

Devido aos crescentes relatos de resistência antimicrobiana de isolados de *R. equi*, e ao potencial antimicrobiano das plantas medicinais, especialmente em associação à nanotecnologia, este estudo teve como objetivo verificar a atividade antibacteriana de *M. alternifolia*, na forma de óleo livre e em sistemas nanoestruturados, bem como do seu composto majoritário, terpinen-4-ol, contra isolados de *R. equi* de diferentes origens.

MATERIAL E MÉTODOS

O óleo essencial de *M. alternifolia* e o seu componente majoritário, terpinen-4-ol, foram obtidos comercialmente (Laszlo Aromaterapia, Belo Horizonte, Brasil, e Sigma Aldrich, São Paulo, Brasil, respectivamente). As nanoemulsões e nanocápsulas contendo *M. alternifolia* a 1% (10mg/mL) (Flores *et al.*, 2011) foram preparadas pelos métodos de emulsificação espontânea (Bouchemal *et al.*, 2004) e deposição interfacial do polímero pré-formado de poli (ϵ -caprolactona) (Fessi *et al.*, 1989), respectivamente, apresentando tamanho na faixa nanométrica (cerca de 200nm), potencial zeta negativo e índice de polidispersão abaixo de 0,25.

Foram utilizados 24 isolados de *R. equi*, obtidos entre os anos de 1991 e 2012, provenientes de amostras de solo (n=8), fezes de animais hígdos (n=8) e de animais com manifestações clínicas da rodococose (n=8), coletados de 10 estabelecimentos de criação equina localizados na região sul do Brasil. Todos os isolados foram previamente identificados, fenotípica e genotipicamente, quanto ao gênero e espécie (Monego *et al.*, 2009).

O perfil de susceptibilidade dos isolados de *R. equi* frente às diferentes formulações contendo óleo essencial de *M. alternifolia* foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo Müeller-Hinton (MHC) (Himedia[®] Laboratories). Todos os isolados foram cultivados em Müeller-Hinton Ágar (MHA) (Himedia[®] Laboratories), em aerobiose a 37°C, durante 24h. Para cada isolado, preparou-se um inóculo em solução salina 0,9%, ajustado para a escala 0,5 de McFarland, posteriormente diluído em MHC e testado na concentração 1×10^5 UFC/mL. As formulações testadas e suas combinações foram: 1. óleo essencial em dispersão grosseira ou óleo livre (OL), 2. Óleo essencial associado à nanocápsula (NC), 3. Óleo essencial associado à nanoemulsão (NE), 4. OL+NC (na combinação de 50% de cada um) e 5. OL+NE (na combinação de 50% de cada um). Adicionalmente, a atividade antimicrobiana do terpinen-4-ol foi avaliada frente aos isolados de *R. equi*. A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) foram determinadas em conformidade com as diretrizes da Metodologia dos Testes de Sensibilidade a

Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico do *Clinical Laboratory Standards Institute* (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013). As concentrações das formulações de *M. alternifolia* testadas foram de 2.500µg/mL a 1,2 µg/mL, na razão 1:2. As concentrações do terpinen-4-ol variaram de 44.360µg/mL a 21,660µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata, incluindo os controles positivos e negativos.

Os valores de CIM e CBM para *R. equi* frente ao óleo essencial de *M. alternifolia* nas diferentes formulações foram avaliados com auxílio do teste de *Kruskal-Wallis*. Quando identificadas diferenças entre os tratamentos, aplicou-se o teste de *Bonferroni* para comparar as médias. Para avaliação dos resultados dos isolados frente ao terpinen-4-ol utilizou-se o teste do qui-quadrado. As análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico SAS, versão 9.2 (Statistical analysis system user's guide, 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial de *M. alternifolia* na apresentação de OL não apresentou efeito antimicrobiano frente aos isolados clínicos e de solo de *R. equi*. Entretanto, 62,5% (5/8) dos isolados de fezes foram inibidos nas concentrações de 2.500µg/mL até 625µg/mL. Resultados de CIM de compostos de origem vegetal entre 1.500 e 600µg/ml são considerados de efeito moderado; todavia, CIM acima de 1.600 µg/mL são considerados como fraca inibição (Aligianis *et al.*, 2001). Dessa forma, pode-se inferir que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou ação inibitória de fraca a moderada frente a isolados de fezes de *R. equi*. Estudos anteriores comprovaram a atividade bacteriostática e bactericida do óleo essencial de *M. alternifolia* sobre *Porphyromonas gingivalis* (Faria *et al.*, 2012). Banes-Marshall *et al.* (2001) relataram que a maioria das bactérias são sensíveis ao óleo essencial de *M. alternifolia* na concentração de 10mg/mL; no entanto, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* necessitaram de concentrações maiores do óleo para serem inibidos. Neste estudo com *R. equi*, a maior concentração do óleo essencial na formulação de OL (2.500µg/mL) não foi capaz de inibir a maioria (79,2%) dos isolados de *R. equi* (19/24).

As NE e NC contendo óleo essencial de *M. alternifolia* apresentaram efeito de inibição do crescimento de 100% (8/8) dos isolados de solo e isolados de fezes (8/8) de *R. equi* nas concentrações de 2.500µg/mL até 312,5µg/mL, totalizando 16 isolados inibidos. Os isolados clínicos não foram inibidos nas concentrações de óleo essencial testadas. O uso das nanoestruturas contendo óleo essencial de *M. alternifolia*, em comparação ao OL, apresentou atividade inibitória 2,75 vezes maior ($P < 0.05$). A associação de fármacos aos sistemas nanoestruturados, devido ao seu reduzido tamanho, propicia a melhora do índice terapêutico dos mesmos, como observado na atividade antimicrobiana da clorexidina associada à NC sobre *Staphylococcus epidermidis*, apresentando maior atividade em relação ao fármaco livre em um modelo experimental *ex vivo* com pele de orelha de suíno (Lboutounne et al., 2002). Paulo et al. (2010) avaliaram a atividade antifúngica de nanopartículas contendo anfotericina B, obtendo resultados satisfatórios em comparação ao fármaco livre. Melhora da atividade inibitória do óleo essencial de *M. alternifolia*, quando associado a nanocarreadores, também foi demonstrada por Flores et al. (2013) frente ao fungo dermatófito, em modelo experimental de infecção ungueal, quando comparado à atividade do OL. No presente experimento, o OL e as nanoestruturas contendo óleo essencial não apresentaram efeito inibitório do crescimento de *R. equi* após o seu plaqueamento em MHA.

Diante da possibilidade de ocorrer um efeito complementar entre o OL de *M. alternifolia* e as nanoestruturas contendo óleo essencial, avaliou-se a atividade antimicrobiana das combinações de OL+NE e OL+NC. Com isso, observou-se atividade antimicrobiana em 100% (24/24) dos isolados, sem haver diferença estatística entre as associações. Acredita-se que esse resultado esteja relacionado à dose inicial de ataque, oferecida pelo OL, e a manutenção desta pelo controle da liberação do óleo proporcionado pelas nanoestruturas (Flores et al., 2011). O efeito antimicrobiano do óleo ocorreu imediatamente após a sua aplicação, possivelmente devido ao contato direto com a membrana do micro-organismo, provocando alterações na

permeabilidade da membrana e inibição da respiração celular, conforme sugerido por Carson et al. (2006). Além disso, os sistemas nanoestruturados promovem a liberação gradual dos compostos, aumentando o tempo de contato e, por apresentarem reduzido tamanho, proporcionam a deposição de um maior número de partículas na superfície da célula microbiana, expondo maior quantidade da substância ativa (Lboutounne et al., 2002). Dessa forma, concluiu-se que tanto a formulação de NC como de NE, contendo o óleo essencial de *M. alternifolia* em associação ao OL, possuem atividade antibacteriana contra isolados de *R. equi* de diferentes origens.

O terpinen-4-ol é um dos principais responsáveis pela atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia*, representando aproximadamente 40% do óleo essencial (Carson et al., 2006). Com o terpinen-4-ol utilizado isoladamente frente aos isolados de *R. equi*, obteve-se CIM nas concentrações entre 11.090µg/mL e 5.545µg/mL e CBM nas concentrações de 44.360µg/mL a 11.090µg/mL, demonstrando que a atividade antibacteriana do terpinen-4-ol isolado foi 18,02 vezes menos efetiva que na composição do óleo essencial de *M. alternifolia*. Em contrapartida, o terpinen-4-ol demonstrou superior capacidade antibacteriana quando utilizado isoladamente do que quando incorporado ao óleo essencial de *M. alternifolia* frente a isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Cox et al., 2001) Da mesma forma, HAMMER et al. (2003) constataram que o terpinen-4-ol isolado foi mais eficaz que o óleo essencial da planta frente à levedura *Candida albicans*. A estrutura celular e metabolismo específico do *R. equi* podem ter determinado a menor ação do terpinen-4-ol sobre esse agente, quando comparado com os micro-organismos anteriormente descritos.

Considerando a problemática no tratamento da rodococose equina, a resistência antimicrobiana ao tratamento convencional e de posse dos resultados obtidos, o óleo essencial da planta *M. alternifolia*, especialmente associado a sistemas nanoestruturados, possui potencial uso como agente inibitório frente a isolados de *R. equi*.

CONCLUSÃO

O óleo essencial da planta *M. alternifolia* apresenta atividade antibacteriana frente a isolados de *R. equi*, e essa atividade é fortemente potencializada diante da associação com a NC e NE. Terpinen-4-ol apresenta atividade antibacteriana frente a isolados de *R. equi*, porém sua utilização de forma isolada não foi superior ao uso do óleo essencial da planta. Devido aos relatos de resistência antimicrobiana de isolados de *R. equi*, estudos farmacológicos devem ser conduzidos a fim de avaliar a ação terapêutica de compostos contendo óleo essencial de *M. alternifolia* como uma alternativa ao tratamento convencional da rodococose equina.

REFERÊNCIAS

- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S. *et al.* Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, v.49, p.4168-4170, 2001.
- ANTON, N.; BENOIT, J.; SAULNIER, P. *et al.* Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates – A review. *J. Control. Releas.*, v.128, p.185-199, 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. *Food. Chem. Toxicol.*, v.46, p.446-475, 2008.
- BANES-MARSHALL, L.P.; CAWLEY, P.; PHILLIPS, C.A. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. Isolates from clinical specimens. *Br. J. Biomed. Sci.*, v.58, p.139-145, 2001.
- BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.L.L. *et al.* Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. *Infarm.*, v.17, p.80-83, 2005.
- BOUCHEMAL, K.; BRIANCON, S.; PERRIER, E. *et al.* Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *Int. J. Pharm.*, v.51, p.280-241, 2004.
- CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.19, p.50-62, 2006.
- CLINICAL And Laboratory Standards Institute (CLSI). *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico*. Pensilvânia:Wayne, 2013. 53p.
- COX, S.D.; MAN, C.M.; MARKHAM, J.L. *et al.* The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.*, v.88, p.170-175, 2000.
- FARIA, T.P.M.; GRAZIANO, T.S.; CALIL, C.M. *et al.* Atividade do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento e expressão gênica de *Porphyromonas gingivalis*. *J. Clin. Periodonto.*, v.22, p.80-86, 2012.
- FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.*, v.55, p.1-4, 1989.
- FLORES F.C.; LIMA, J.A.; RIBEIRO, R.F. *et al.* Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing Tea Tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol.*, v.175, p.1-2, 2013.
- FLORES F.C.; RIBEIRO, R.F.; OURIQUE, A.F. *et al.* Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. *Quím. Nov.*, v.34, p.968-972, 2011.
- GIGUÈRE, S.; GASKIN, J.M.; MILLER, C. *et al.* Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.220, p.59-63, 2002.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *J. Appl. Microbiol.*, v.95, p.853-860, 2003.
- LBOUTOUNNE, H.; CHAULET, J.; PLOTON, C. *et al.* Sustained *ex vivo* skin antiseptic activity of chlorhexidine in poly (ε-caprolactone) nanocapsule encapsulated form and as a digluconate. *J. Control. Releas.*, v.82, p.319-334, 2002.
- MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. *Vet. Res.*, v.35, p.383-396, 2004.

- MONEGO, F.; MABONI, F.; KREWER, C. *et al.* Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse breeding farms by means of multiplex PCR for the *vap* gene family. *Curren. Microb.*, v.58, p.399-403, 2009.
- MOSQUEIRA, V.C.F.; ARAÚJO, R.S.; BRANDÃO, H.M. *et al.* Composição nanoparticulada contendo antibióticos para administração intramamária de uso animal. Patente nº: WO 2011150481 A1, 2010.
- MUSCATELLO, G.; LEADON, D.P.; KLAY, M. *et al.* *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. *Equine. Vet. J.*, v.39, p.470-478, 2007.
- OLIVA, B.; PICCIRILLI, E.; CEDDIA, T. *et al.* Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.37, p.185-187, 2003.
- OZAKI, A.T.; DUARTE, P.C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária, em cães e gatos. *Infarm.*, v.18, p.17-25, 2006.
- PAULO, C.S.O.; VIDAL, M.; FERREIRA, L.S. Antifungal nanoparticles and surfaces. *Biomacromol.*, v.11, p.2810-2817, 2010.
- RIBEIRO, M.G.; SEKI, I.; YASUOKA, K. *et al.* Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. *Comp. Immunol. Microb.*, v.28, p.53-61, 2005.
- STATISTICAL analysis system user's guide - SAS: statistics. Version 9.2, Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001. 1686p.
- SCHAFFAZICK, R.S.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nov.*, v.26, p.726-737, 2003.
- SELEEM, M.N.; JAIN, N.; POTHAYEE, N. *et al.* Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *FEMS Microbiol.*, v.294, p.24-31, 2009.
- SILVA, R.S.S.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A. *et al.* Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta. Sci. Agron.*, v.24, p.363-368, 2002.
- TRONCARELLI, M.Z.; BRANDÃO, H.M.; GERN, J.C. *et al.* Mastite bovina sob nanocontrole: A própolis nanoestruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. *Vet. Zootec.*, v.20, p.124-136, 2013.
- VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmac. Res.*, v.26, p.726-737, 2009.