

**SOJA TRANSGÊNICA TOLERANTE A IMIDAZOLINONAS: PASSADO,
PRESENTE E FUTURO**

Leandro Paiola Albrecht¹, Alfredo Junior Paiola Albrecht¹, Fábio dos Santos Biazoto²,
Vinicius Gabriel Caneppele Pereira³, Giovane Moreno¹, Juliano Bortoluzzi Lorenzetti¹,
Maikon Tiago Yamada Danilussi¹ e Gabriel Viana de Araujo¹

¹Universidade Federal do Paraná-UFPR, Setor Palotina, Departamento de Ciências Agrônomicas, Palotina-PR,
CEP 85950-000. E-mail: ajpalbrecht@yahoo.com.br.com.br; lpalbrecht@yahoo.com.br;
moreno.giovane@gmail.com; lorenzettijb@gmail.com; maikondanilussi@gmail.com;
gabrielvianaaraujo0@gmail.com

²Universidade Estadual de Maringá-UEM, Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Umuarama-PR,
CEP 87501-970. E-mail: fabio-biazoto@hotmail.com

³Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Programa de Pós-graduação em Agricultura,
Botucatu-SP, CEP 18610-034. E-mail: viniciuscanep@gmail.com

RESUMO: Um dos fatores que limita o potencial produtivo da cultura da soja é a competição com plantas daninhas, tornando o manejo destas espécies invasoras primordial para o bom andamento da safra. O manejo de plantas daninhas dicotiledôneas na cultura da soja está se tornando problema devido ao uso excessivo do glyphosate na soja RR (Roundup Ready®), podendo provocar pressão de seleção destas plantas daninhas, vindo a torná-las resistentes ao herbicida. Entretanto, a soja com tolerância às imidazolinonas, rotaciona mecanismos de herbicidas na cultura da soja e poderia melhorar o manejo integrado de plantas daninhas.

PALAVRAS-CHAVE: Inibidor da ALS, Glycine max, Planta daninha.

**TOLERANT TRANSGENIC SOYBEAN TO IMIDAZOLINONES: PAST, PRESENT
AND FUTURE**

ABSTRACT: One of factors that limit the yield potential of soybean crop is the weed competition, becoming management of this invasive species primordial for a good conduction of the Crop. The management of dicotyledonous weeds in soybean culture is becoming problem due to overuse of glyphosate on soybeans RR (Roundup Ready®), causing selection pressure of these weeds coming to make them resistant to the herbicide. However, soybeans with tolerance to imidazolinones, rotational mechanisms of herbicides in soybean crop and can improve integrated weed management.

KEY WORDS: ALS Inhibitor, Glycine max, Productivity, Weed.

INTRODUÇÃO

A soja RR recebeu um gene que lhe proporcionou tolerância a um herbicida específico, chamado glyphosate, sendo a primeira tecnologia liberada pela CTNBio, isto ocorreu em 1998, mas cultivada legalmente só no século XXI. O que proporcionou aumento das áreas cultivadas com a soja RR, devido à maior facilidade no manejo das plantas daninhas através do uso de glyphosate em pós-emergência sobre a soja (Albrecht et al., 2013). Aumentando assim, a praticidade do controle de plantas daninhas, pelo menos por algum tempo, pois após o uso

continuado e repetido, vem a pressão de seleção e o surgimento de biótipos resistentes ao glyphosate.

A utilização de herbicidas da classe das imidazolinonas é uma alternativa para rotação com glyphosate, mas os produtos deste grupo normalmente produzem sintomas de fitointoxicação nas plantas. São utilizados em doses abaixo de 150 g ha⁻¹, sendo a maior parte seletiva, controlando várias plantas daninhas de folha larga. Quando se realiza a aplicação em plantas suscetíveis, as imidazolinonas inibem a enzima acetolactato sintase (ALS), sendo que enzima atua na síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada a leucina, isoleucina e lisina (Oliveira Jr., 2011).

O sistema denominado Cultivance® foi lançado pela Embrapa e Basf, representando um avanço para a ciência brasileira pelo desenvolvimento da primeira soja geneticamente modificada desenvolvida no Brasil. Esta tecnologia combinava a utilização de cultivares de soja específica, com herbicidas de amplo espectro de ação do grupo das imidazolinonas para o manejo de plantas daninhas de folhas largas e estreitas (Embrapa, 2015).

No entanto, esse sistema Cultivance® de soja tolerante a imidazolinonas foi descontinuado, apesar do seu potencial. Essa revisão tem por objetivo expor o pequeno marco teórico referente à tecnologia transgênica de soja tolerante a imidazolinonas e traçar perspectivas.

MANEJO DE PLANTAS DANINHAS NA SOJA

As espécies de plantas que se desenvolvem onde não são desejadas são consideradas plantas daninhas. Estas competem pela luz, água, nutrientes, espaços, e quando esta competição ocorre no início de desenvolvimento da cultura, as perdas podem ser superiores a 80%, mas, em alguns casos, pode vir até a inviabilizar a colheita (Vargas e Roman, 2006).

Existem relatos, no Brasil, de várias plantas invasoras que causam perdas de produtividade na cultura da soja. Considerando as plantas daninhas dicotiledôneas, pode-se destacar a *Ipomoea* spp. (corda-de-viola), *Conyza* spp. (buva), *Euphorbia heterophylla* (leiteiro) e *Raphanus* spp. (nabo). Todas com características que conferem alta agressividade como rápida germinação, crescimento inicial, sistema radicular agressivo, alta capacidade de absorver nutrientes e água do solo, também grande produção e disseminação de propágulos (Silva, 2011).

O controle químico com herbicidas é o método mais utilizado para o controle das invasoras. Pois, dependendo da espécie, densidade e distribuição destas plantas na área, podem

ocorrer perdas significativas na lavoura, reduzindo o potencial da cultura implantada (Barbosa et al., 2014). As perdas por plantas daninhas, como a buva e o capim-amargoso são extremamente impactantes no sistema produtivo, assim tais plantas devem ser controladas com herbicidas residuais, na dessecação e em pós-emergência da soja (Albrecht et al., 2018; Albrecht et al., 2017).

A tecnologia Cultivance®, de soja tolerante a imidazolinonas, apresentou-se como uma alternativa para os produtores realizarem a rotação de organismos geneticamente modificados. Possibilitando o manejo na resistência de várias plantas invasoras, até as de difícil controle, contribuindo para maior longevidade das tecnologias, uma vez que esta nova ferramenta tem o intuito de auxiliar os produtores a obterem maior produtividade e rentabilidade de forma sustentável (Embrapa, 2015). Tal tecnologia poderia ter sido mais amplamente utilizada, no objetivo de se alcançar um melhor manejo integrado das plantas daninhas.

HERBICIDAS E FITOINTOXICAÇÃO

O desenvolvimento da soja é comprometido devido à presença de plantas daninhas, que provocam redução na produção e, muitas vezes, dificultam ou, até mesmo, impedem a colheita, sendo necessário o emprego de métodos que permitam a eliminação das invasoras. Dentre os métodos disponíveis, o controle químico é o que oferece vantagens em relação aos demais. Mas, paralelamente aos benefícios, os compostos químicos apresentam desvantagens e, entre estas, há a possibilidade de ocorrer fitotoxicidade ou fitointoxicação à cultura (Biazoto, 2017).

Com frequência, verifica-se que aplicações indevidas resultam em danos que, algumas vezes, comprometem a produção, o que, em geral, é consequência da escolha incorreta do produto, dose, sobreposição da regulação do equipamento, aplicação e deriva de produto aplicado em lavoura vizinha. Outro aspecto a considerar é a ação fitotóxica do herbicida, devido à sensibilidade apresentada pelas cultivares. Muitos problemas podem ser evitados, desde que se conheça as especificações e as características do produto com o qual está trabalhando (Gazziero e Neumaier, 1985).

A aplicação de imazethapyr na soja pode prejudicar o cultivo do girassol semeado em sucessão a soja. A persistência no solo de herbicidas que pertencem ao grupo químico das imidazolinonas, como o imazaquin e o imazethapyr, é influenciada por alguns fatores como o pH, umidade, teor de matéria orgânica e a textura do solo (Brighenti et al., 2002).

O cultivo de genótipos de arroz mutagênico tolerante às imidazolinonas é outro sistema bastante utilizado pelos orizicultores no estado do Rio Grande do Sul, sendo viável a utilização

do método químico para o manejo do arroz-vermelho através da tecnologia (Clearfield®). Aproximadamente 50% das lavouras comerciais utilizadas para produção de arroz foram com cultivares Clearfield® na safra 2012/13, compondo uma das maiores áreas do mundo com a utilização da tecnologia. Mas alguns problemas graves surgiram devido ao cultivo contínuo e errôneo desses genótipos, como a resistência às imidazolinonas em biótipos de arroz-vermelho (Meneses et al., 2013; Meneses et al., 2009). Além do arroz, existem os híbridos de milho mutagênico com tolerância às imidazolinonas (Penckowski et al., 2004).

A mistura dos produtos imazethapyr + imazapyr foi desenvolvida para ser utilizada em milho com tolerância a herbicidas do grupo das imidazolinonas, podendo ser aplicado em pós-emergência inicial sobre o milho, uma vez que possui grande espectro de controle das plantas daninhas, sem que haja redução na produtividade. Mas pode ocorrer injúria na cultura, sendo caracterizado por amarelecimento e necrose das folhas, estes sintomas desaparecem quinze dias após a aplicação do herbicida (Pereira e Carmona, 2000).

Em culturas semeadas até um ano após a aplicação de imazethapyr na dose de 200 g i.a. ha⁻¹, foram observadas injúrias e queda na produção em algumas culturas como linho, milho, mostarda, girassol e trigo (Ulbrich et al., 1998). Em solos arenosos com umidade em torno de 150% da capacidade de campo, verificou-se que a utilização de sulfentrazone e S-metolachlor provocaram fitotoxicidade de 30 e 20%, respectivamente, na cultura da soja. Deve-se ter cuidado na aplicação destes produtos em solos arenosos com maior teor de umidade, devido à fitotoxicidade causada a cultura (Gehrke e Shubin, 2016).

A utilização de herbicidas latifolicidas acaba sendo dificultado devido à soja ser uma planta dicotiledônea, desta forma, o herbicida pode causar fitointoxicação, prejudicando o desenvolvimento da cultura. Entretanto, cultivos transgênicos tolerantes a herbicidas, desde que os mesmos sejam bem manejados, podem auxiliar na diminuição das perdas por injúrias.

SISTEMA CULTIVANCE®

A tecnologia Cultivance® foi desenvolvida na parceria entre a Embrapa e Basf, sendo a primeira soja geneticamente modificada com tecnologia desenvolvida totalmente no Brasil, que combina cultivares de soja com herbicidas com elevado espectro de ação para o controle de plantas daninhas de folhas largas e estreitas. O diferencial desta tecnologia está na combinação de variedades modificadas pela genética e também no controle das plantas daninhas utilizando herbicida a base de imidazolinonas (Embrapa, 2015). Infelizmente o sistema foi descontinuado,

não havendo a disponibilidade de novas cultivares com a tecnologia de tolerância as imidazolinonas.

As plantas de soja com a tecnologia Cultivance[®], toleram aplicações em pré e pós-emergência da cultura de herbicidas do grupo químico das imidazolinonas, pertencente ao mecanismo dos inibidores da acetolactato sintase (ALS). O evento transgênico consiste na inserção no genoma da soja, o gene *ahas* oriundo de *Arabidopsis thaliana*. A expressão do gene codifica uma proteína na qual irá conferir tolerância ao herbicida devido à substituição de aminoácido, onde serina é substituído por asparagina na posição 653 (CIB, 2016).

Esse gene, conhecido como *ahas* (síntese de acetohidroxiácido), torna a soja tolerante aos herbicidas da classe das imidazolinonas, que inibem a enzima acetolactato sintase (ALS). Nas plantas, o gene executa o controle na síntese de valina, leucina e da isoleucina que são aminoácidos essenciais. A alteração desse gene não causa impacto nos níveis dos aminoácidos na planta. Assim, a composição do grão final é equivalente ao da soja convencional (Vila-Aiub et al., 2008).

A cada semeadura, a preocupação com o controle de plantas daninhas como a buva (*Conyza* spp.), o azevém (*Lolium multiflorum*) e o capim-amargoso (*Digitaria insularis*) vem aumentando, pois elas competem com a cultura da soja por água, luz e nutrientes, podendo causar redução na produtividade. O objetivo esperado pela Embrapa e Basf era que o Sistema Cultivance[®] poderia vir a ser uma opção tecnológica para se realizar o manejo das áreas com plantas daninhas de difícil controle (Arrabal, 2015).

O sistema Cultivance[®] seria uma oportunidade aos produtores para rotacionarem tecnologias de organismos geneticamente modificados, para auxiliar o manejo da resistência de diversas plantas daninhas, inclusive aquelas de difícil controle, possibilitando, assim, maior longevidade das tecnologias disponíveis. O Cultivance[®] teria vindo para auxiliar os agricultores a obter maior produtividade e rentabilidade de forma sustentável. Para a Embrapa (2005) para reduzir os riscos de resistência de plantas daninhas, deve-se levar em consideração alguns fatores como: o equilíbrio entre rotação de culturas, alternância de tecnologias e uso de defensivos agrícolas com mecanismo de ação diferenciado para reduzir a pressão de seleção das plantas daninhas, reduzindo, assim, os riscos de resistência. Cultivos tolerantes a imidazolinonas seriam uma ferramenta a mais.

RESULTADOS E PERSPECTIVAS

Foram desenvolvidos poucos trabalhos de pesquisa a campo, mas foram suficientes para traçar potenciais e limitações. As pesquisas em geral avaliaram associações de imazapyr e imazapic, posicionados em pré e pós-emergência da cultura e da planta daninha. Em que se diagnosticou a seletividade sobre a cultura e o controle sobre as plantas daninhas. A seguir segue breve relato dos resultados presentes na literatura nacional e em vias de publicação.

Aplicações nos estádios V1, V2 e V3 de imazapyr 175 g kg⁻¹ + imazapic 525 g kg⁻¹ (produto posicionado em pré-emergência da soja e das plantas daninhas), não causaram danos significativos aos componentes analisados, até a dose de 300 g ha⁻¹ do produto comercial (Biazoto, 2017). Portanto, a dose comercial de 150 g ha⁻¹ é segura em pós-emergência inicial da cultura, dependendo da condição ambiental.

A utilização em pós-emergência da soja (estádio V4) de imazapyr + imazapic (525 g Kg⁻¹ + 175 g Kg⁻¹, respectivamente) na cultura da soja com doses acima de 150 g p.c. ha⁻¹ provocou fitotoxicidade nas plantas e potencial de redução na produtividade, dependendo da condição ambiental (Pereira, 2016; Pereira et al., 2016a; Pereira et al., 2016b).

Foi até mesmo avaliado a eficiência energética, em que altas doses do herbicida resultaram na redução da produtividade e da quantidade de óleo. A partir de 4,5 vezes a dose técnica posicionada para esta tecnologia (100 g p.c. ha⁻¹), houve redução na ordem de 23%. No aspecto balanço energético, ao se utilizar doses baixas e recomendadas do herbicida, o balanço foi positivo, sendo que de acordo com o aumento da dose e consequentemente maior dispêndio de energia, o balanço é afetado negativamente (Moreno, 2018; Moreno et al., 2017).

Quanto ao espectro de controle das imidazolinonas, como a associação comercial de Imazapyr + Imazapic, destaca-se o controle de algumas espécies de plantas daninhas como: *Amaranthus viridis*, *Brachiaria plantaginea*, *Commelina benghalensis*, *Digitaria horizontalis*, *Digitaria insularis*, *Ipomoea grandifolia*, entre outras (dados não publicados dos autores do artigo). Existem outros herbicidas nesse grupo químico, que variam espectro e residual, e que poderão ser usados em uma soja tolerante a imidazolinonas. Portanto, permite-se ao futuro a utilização de herbicidas em pré e pós-emergência da soja (e da planta daninha), herbicidas esses que hoje não poder ser utilizados, devido à seletividade.

Diante do exposto, a utilização de eventos transgênicos com tolerância a imidazolinonas poderia ter sido uma alternativa relevante. Relacionado com a quebra na sequência de aplicações de glyphosate durante todo o ciclo da cultura da soja, podendo ser um ponto favorável para evitar o aparecimento de novos biótipos de espécies de plantas daninhas com resistência e também auxiliar no controle das que já possuem biótipos resistência ou que são

tolerantes. Acredita-se que essa transgenia de tolerância a imidazolinonas poderá ser utilizada no futuro, associado a outras tecnologias transgênicas, o que poderá em muito favorecer o manejo integrado de plantas daninhas.

CONSIDERAÇÃO FINAL

A soja com tolerância às imidazolinonas proporcionaria a rotação de mecanismos de ação de herbicidas na cultura e, poderia melhorar substancialmente o manejo integrado de plantas daninhas nos sistemas que envolvem a cultura da soja.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, A.J.P.; ALBRECHT, L.P.; BARROSO, A.A.M.; PELLIZZARO, E.C. Capim-amargoso: uma planta daninha de difícil controle. **Revista Campo & Negócios**, Uberlândia, v. 15, p. 40-45, 2018.
- ALBRECHT, A.J.P.; ALBRECHT, L.P.; PELLIZZARO, E.C. Dessecação antecipada melhora a semeadura de grãos. **Revista Campo & Negócios**, Uberlândia, v. 34, p. 12-15, 2017.
- ALBRECHT, L.P.; ALBRECHT, A.J.P.; VICTORIA FILHO, R. Soja RR e o Glyphosate. In: ALBRECHT, L.P.; MISSIO, R.F. (1ª Ed.). **Manejo de cultivos transgênicos**. Palotina: Editora UFPR, p.25-45, 2013.
- ARRABAL, C.A. **Primeira soja transgênica totalmente brasileira chega ao mercado**. 2015. 2p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/mobile/noticias/-/noticia/4693328/primeira-soja-transgenica-totalmente-brasileira-chega-ao-mercado>. Acesso em: 27 de jul. 2016.
- BARBOSA, K.A.G.; SEII, A.H.; ROCHA, M.R.; TEIXEIRA, R.A.; SANTOS, L.C.; ARAÚJO, F.G. Interação entre herbicidas e cultivares de soja sobre o nematoide de cisto *Heterodera glycines*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.30, n.1, p.154-163, 2014.
- BIAZOTO, F.S. **Desempenho da soja Cultivance® submetida ao herbicida Soyvance pré®**. 2017. 35 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, 2017.
- BRIGHENTI, A.M.; ADEGAS, F.S.; BORTOLUZI, E.S.; ALMEIDA, L.A.; VOLL, E. Tolerância de genótipos de soja aos herbicidas trifluralin e imazaquin. **Planta Daninha**, Viçosa, v.20, n.1, p.63-69, 2002.
- CONSELHO DE INFORMAÇÕES SOBRE BIOTECNOLOGIA - CIB. **Eventos Aprovados**. Online. Disponível em: < <http://cib.org.br/biotecnologia/regulamentacao/ctnbio/eventos-aprovados/bps-cv127-9-cultivance/> >. Acesso em: 28 de outubro de 2016.
- EMBRAPA. **Sistema Cultivance ideal para a rotação de tecnologias na cultura da soja**. Londrina. 2015. 20p. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355202/1529289/>

Publica%C3%A7%C3%A3o_Sistema_Cultivance.pdf/a44c53ae-eab1-4b47-afdf-3c487558338e. Acesso em: 27 de ago. 2016.

GAZZIERO, D.L.P.; NEUMAIER, N. **Sintomas e diagnose de fitotoxidade de herbicidas na cultura da soja**. Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 1985. 56p.

GEHRKE, A.R.; SHUBIN, N.H. Cis-regulatory programs in the development and evolution of vertebrate paired appendages. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Elsevier, v.57, n.1, p.31-39, 2016.

MENESES, V.G.; MARIOT, C.H.P.; KALSING, A.; FREITAS, T.F.S.; GROHS, D.S.; MATZENBACHER, F.O. Associação de glyphosate e imidazolinonas no controle de arroz-vermelho em arroz Clearfield®. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.12, p.2154-2159, 2013.

MENESES, V.G.; MARIOT, C.H.P.; KALSING, A.; GOULART, I.C.G.R. Arroz-vermelho (*Oryza sativa*) resistentes aos herbicidas imidazolinonas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.27, n.05, p.1047-1052, 2009.

MORENO, G. **Comportamento produtivo, energético e econômico da soja Cultivance**. 2018. 30 p. Dissertação (Mestrado em Bioenergia - Programa Stricto Sensu em Rede) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2018.

MORENO, G.; BACCIN, L.C.; PEREIRA, V.G.C.; PERTUZATI, A.; ALBRECHT, A.J.P.; ALBRECHT, L.P.; VICTORIA FILHO, R. Vigor das sementes de soja Cultivance submetidas a diferentes doses e épocas de aplicação de herbicida do grupo das imidazolinonas. In: XX Congresso Brasileiro de Sementes, 2017, Foz do Iguaçu. **Anais**. Londrina: ABRATES, 1p.

OLIVEIRA Jr., R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H.; OLIVEIRA Jr., R.S. (2ª Ed.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Editora Omnipax, p.141-192, 2011.

PENCKOWSKI, L.H.; PODOLAN, M.J.; LÓPES-OVEJERO, R.F. Tolerância de milho tratado com inseticidas e herbicidas do grupo das imidazolinonas. **Planta Daninha**, Viçosa, v.22, n.2, p.307-313, 2004.

PEREIRA, V.G.C. **Desempenho agrônômico da soja Cultivance® submetida a doses de Soyvance® em pós emergência**. 2016. 24 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2016.

PEREIRA, V.G.C.; MATTIUZZI, M.D.; ALBRECHT, L.P.; ALBRECHT, A.J.P.; SOUZA, L.E.; NARDI, R.; BIAZOTO, F.S. Efeito de doses de imazapir + imazapic em pós emergência sobre o desenvolvimento da soja Cultivance®. In: XXX Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2016a, Curitiba. **Anais**. Londrina: SBCPD, 1p.

PEREIRA, V.G.C.; MATTIUZZI, M.D.; ALBRECHT, L.P.; ALBRECHT, A.J.P.; SOUZA, L.E.; BIAZOTO, F.S.; PELIZZARO, E.C. Aplicação de doses do herbicida Soyvance® em pós-emergência sobre o desenvolvimento da soja Cultivance®. XXX Congresso Brasileiro de Ciências das Plantas Daninhas, 2016b, **Anais**. Londrina: SBCPD, 1p..

PEREIRA, R.C.; CARMONA, R. Seletividade e eficácia de misturas de herbicidas do grupo das imidazolinonas em milho tolerante. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Brasília, v.1, n.1, p.45-52, 2000.

SILVA, L. **Manejo de plantas daninhas dicotiledôneas na cultura da soja (*Glycine max* L. Merrill)**. 2011. 94p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2011.

ULBRICH, A.V.; RODRIGUES, B.N.; LIMA, J. Efeito residual dos herbicidas imazaquin e imazetaphyr, aplicados na soja, sobre o milho safrinha. **Planta Daninha**, Viçosa, v.16, n.2, p.137-147, 1998.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Manejo e controle de plantas daninhas na cultura da soja**. Passo Fundo, Embrapa trigo. 2006. 66p. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62.pdf. Acesso em: 20 de ago. de 2016.

VILA-AIUB, M.M.; VIDAL, R.A.; BALBI, M.C.; GUNDEL, P.E.; TRUCCO, F.; GHERSA, C.M. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. **Pest Management Science**, Wiley, v.64, n. 4, p.366-371, 2008.