

Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos

Daniele Mikovski, Jhonatan Basso,

Paulo da Silva

João Luiz Coelho Ribas

Resumo

O presente artigo tem como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre a Química Medicinal e o planejamento de novos fármacos, buscando entender mais sobre o assunto abordado e definir uma linha de raciocínio para o desenvolvimento do artigo. A Química Medicinal compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica. Posteriormente, diversos pesquisadores se basearam na relação estrutura química e atividade biológica dos fármacos para desenvolver compostos com alta seletividade. Atualmente é denominada como uma ferramenta do planejamento racional de novos compostos bioativos que poderão ser utilizados como medicamentos para combater diversas doenças. A utilização deste método pode ajudar pesquisadores a desenvolverem novos fármacos que possuem uma maior absorção e com menos efeitos adversos para a saúde dos pacientes, sendo uma das principais ferramentas utilizadas em universidades e indústrias, representando uma grande importância para que o Brasil consiga se tornar um país desenvolvido.

Palavras chave: Química medicinal; composto-protótipo; planejamento estrutural; novos fármacos.

Abstract

The present article aims to carry out a bibliographic review on Medicinal Chemistry and the planning of new drugs, seeking to understand more about the subject and to define a train of thought for the development of the article. Medicinal Chemistry comprises the synthesis or isolation of compounds with biological activity. Subsequently, several researchers were based on the relationship between chemical structure and biological activity of the drugs to develop compounds with high selectivity. It is currently referred to as a rational planning tool for new bioactive compounds that can be used as medicines to treat various diseases. The use of this method can help researchers to develop new drugs that have a higher absorption and with fewer adverse effects on patients' health, being one of the main tools used in universities and industries, representing a great importance for Brazil to become a developed country.

INTRODUÇÃO

A história da Química Medicinal é marcada pelo desenvolvimento de diversos conceitos e substâncias bioativas, como por exemplo, a descoberta do

ácido acetilsalicílico (AAS) pelo alemão Felix Hoffmann e o modelo fundamental de “chave e fechadura” no estudo de biorreceptores postulado por Emil Fisher (BARREIRO, 2011). Sendo nos dias de hoje, a química medicinal compreendida desde a fase de isolamento do composto biologicamente ativo, até os estudos dos mecanismos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. Com o avanço da tecnologia e surgimento de novas técnicas a química medicinal agregou novas funcionalidades, sendo essencial para o desenvolvimento e planejamento de novos fármacos (MONTANARI, 1993).

Durante o processo de invenção de novos fármacos através da descoberta ou síntese de compostos bioativos, são realizados os estudos pré-clínicos, para caracterizar e avaliar os efeitos da molécula em modelo animal. Nesta fase, com a química medicinal, podemos analisar o espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (LIMA, 2007; GUIDO et al.,2010).

Na atualidade, a maior parte dos fármacos de uso clínico é de origem natural, biotecnológica ou sintetizados quimicamente. A síntese química consiste em modificações estruturais nos compostos, com a finalidade de gerar um novo composto menos tóxico ou com maior atividade biológica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

No Brasil, os planejamentos de novos fármacos são validados através de modelos matemáticos e estudos quanto estrutura e atividade biológica. Contudo, a introdução da Química Medicinal para planejamento de novos fármacos ainda é muito nova no mercado nacional de produção de substâncias bioativas (AMARAL; MONTANARI, 2002). São realizados estudos com a finalidade de se conhecer as principais instituições e regiões brasileiras que atuam na área da química medicinal (LIMA, 2007).

METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado através da metodologia de revisão literária, sobre química medicinal e sua relação no planejamento e desenvolvimentos de novos fármacos, com objetivo descritivo e procedimento de coleta de fontes de informações bibliográficas, obtida através de artigos e revistas de acesso *online*, alguns através da busca avançada, tomado como referência o Centro Nacional de Informações e Biotecnologia (NCBI) que auxiliou com citações de literatura sobre química médica, por meio do PubMed foi possível acessar resumos de artigos científicos e artigos completos em inglês e português gratuitamente, servindo como guia e roteiro para consultas durante a pesquisa. Assim permitiu-se tomar maiores conhecimentos sobre o estudo e dar mais riqueza de informação ao trabalho. Dessa forma, pode-se delinear novas abordagens sobre o assunto e chegar a conclusões que possam servir de embasamento para pesquisas futuras.

HISTÓRIA DA QUÍMICA MEDICINAL

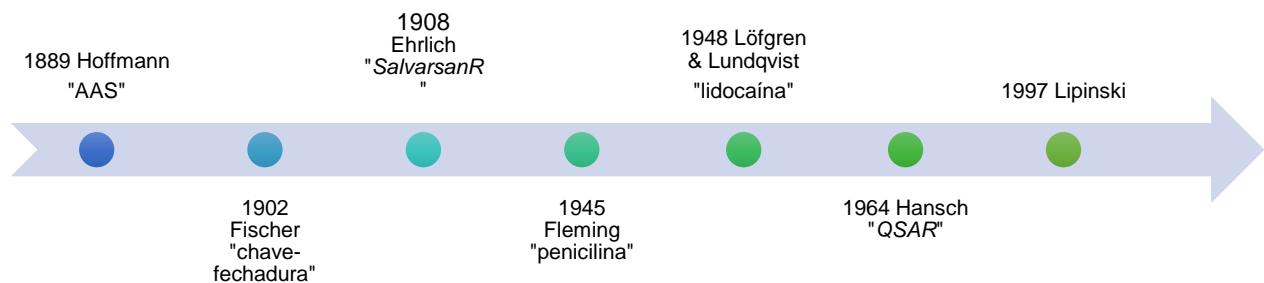


Figura 1: Linha do tempo mostrando os principais marcos que influenciaram no surgimento da Química Medicinal.

Fonte: do Autor.

A linha do tempo da Química Medicinal se inicia a partir da descoberta do ácido acetilsalicílico (AAS) pelo alemão Felix Hoffmann que trabalhava na indústria da Bayer na Alemanha, ao final do século XIX. O AAS foi o primeiro

fármaco desenvolvido sinteticamente na indústria, dando origem ao primeiro planejamento racional de moléculas farmacêuticas e cunhando a linha do tempo da Química Medicinal. Seguindo para o ano de 1902 que marcou a história do Nobel em Química Orgânica postulado por Emil Fischer que cunhou o modelo fundamental de estudo da interação dos fármacos com os biorreceptores, através do conceito de “chave-fechadura”, nascendo a base da Química Medicinal. Em sequência, Paul Ehrlich, que ganhou o Nobel em Medicina, em 1908 estudou o ácido *para-amino* arsênico e criou o fármaco denominado de *SalvarsanR*, que era indicado no tratamento de sífilis e tripanossomíase, conseqüentemente fundamentou a teoria da “bala mágica”, que para cada tipo de doença, haveria um tipo de fármaco específico, onde foi possível correlacionar a estrutura e a atividade farmacológica de cada fármaco em desenvolvimento. No final do século XX, pesquisadores fundamentados nessas teorias, buscam entender mais sobre a atividade destas moléculas em receptores específicos e tentando encontrar uma seletividade pelo alvo-terapêutico. Em 1945 ocorre a descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming, que acarretou o Nobel em Fisiologia e Medicina, onde o pesquisador entrou em férias e deixou algumas placas de cultura com estafilococos e ao voltar percebeu que tinha crescido um bolor em sua cultura, onde as bactérias presentes na placa tinham morrido, e então, foi identificado o fungo *Penicillium chrysogenum* que secretava uma substância bactericida que era a penicilina. A penicilina foi um grande marco para a Química Medicinal, onde foi possível verificar que outros organismos vivos produziam substâncias terapêuticas e por fim podendo ser utilizada para diversas doenças (BARREIRO, 2011).

Seguindo para o ano de 1948, dois pesquisadores farmacêuticos suecos da companhia Astra, Nils Löfgren e Bengt Lundqvist que descobriram a lidocaína, um dos anestésicos locais mais utilizados no mundo. E também descobriram o

importante papel da lipofilia na atividade de agentes anestésicos locais, com discussão sobre a relação entre a estrutura e a atividade biológica e sugerindo a classificação, que leva o seu nome estipulando que anestésicos locais devem ter a estrutura geral: porção lipofílica, cadeia intermediária e porção hidrofílica. Além disso, ele afirma que a porção lipofílica é essencial para a ação do fármaco, pois há maiores potência e biodisponibilidade. A partir disto, a relação de estrutura da substância e a atividade biológica, ganha um novo conceito de atuação dos fármacos, mostrando que se um fármaco é mais lipossolúvel, o que indica uma maior ação do fármaco. Passados 16 anos dos estudos de Löfgren & Lundqvist, em 1964, o pesquisador americano Corwin Hansch, publicou o primeiro artigo demonstrando relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade farmacológica. A partir de Hansch tem-se a primeira comprovação científica da influência da lipofilia (do coeficiente de partição octanol-água (ou $\log P_{oct}$)), no processo de transporte de fármacos. Hansch se tornou então conhecido como o pesquisador pioneiro da nova era na Química Medicinal: a "Era QSAR" ("*Quantitative Structure Activity Relationships*"), na qual o planejamento de fármacos pode ser racionalizado e sistematizado através de estudos sobre a atividade biológica, ou seja, da interação enzima-fármaco, usando-se a expressão quantitativa da relação entre a estrutura química e a atividade biológica, onde foi estipulado que o efeito lipofílico dos substituintes seria realizado pelo cálculo do coeficiente. Após esta descoberta que mudou a história da Química medicinal, em 1997 o pesquisador escocês chamado Christopher Andrew Lipinski estabeleceu uma polêmica regra para o planejamento de novos fármacos, que foi publicada em 1997 denominada como "regra de Lipinski" ("*Lipinski rule*"). Nesta regra o autor postula que, para as centenas de fármacos estudados, a baixa atividade farmacológica é devida à sua baixa absorção e permeabilidade que ocorre quando: I – há mais de cinco centros doadores de ligação de hidrogênio, II – há mais do que 10 aceptores de

ligação de hidrogênio, III – o peso molecular é maior do que 500 unidades e IV – o Log P calculado é maior do que 5. De qualquer forma, esta análise geral feita por Lipinski é considerada de grande relevância e evidencia a importância da lipofilia na atividade farmacológica e no planejamento racional de qualquer fármaco (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

Atualmente, pode-se denominar que a Química Medicinal engloba o planejamento racional de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese ou a modificação molecular de substâncias; o isolamento de princípios ativos naturais (plantas, animais, minerais); a identificação ou elucidação da estrutura; a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica (passando por relações entre a estrutura e propriedades) até suas características estruturais quando da(s) interação(ões) com os diferentes sistemas biofases/biológicos; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos. E, finalmente, a proposição e validação de modelos matemáticos através dos estudos de relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas moléculas de interesse para o planejamento de fármacos, bem como planejamento e mecanismo de ação de agrotóxicos, previsão da toxicidade de compostos, visando sua aplicação tanto terapêutica quanto ambiental (NOGUEIRA; MONTANARI; DONNICI, 2009).

QUÍMICA MEDICINAL: CONCEITOS E IMPORTÂNCIA

A química medicinal, química biomédica ou química biológica, segundo a Sociedade Brasileira de Química (SBQ), compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica (LIMA, 2007). Portanto, a química medicinal tem como objetivo o planejamento, descoberta, invenção, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, estudo do

metabolismo e mecanismo de ação em um nível molecular e a construção da relação estrutura química e atividade biológica, além das diversas interações entre os diferentes sistemas biofases/biológicos; a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos (AMARAL; MONTANARI, 2002; MONTANARI, 1993).

Com bases nesses conceitos pode-se afirmar que é necessária uma equipe qualificada em diversas áreas (química, biologia, farmácia, engenharia, etc) que sejam capazes de compreender e de atuarem conjuntamente para o avanço da química medicinal. O avanço pode ser dividido em quatro fases distintas: (i) Acumulação de conhecimento e uso de medicamentos tradicionais, sendo grande parte derivados de plantas e são catalogados em farmacopeias; (ii) como consequência, princípios ativos são isolados de plantas, fungos, animais, dentre outras fontes; (iii) síntese e modificação de estruturas moleculares de produtos naturais; e (iv) produção de medicamentos através da gênese planejada do fármaco (MONTANARI, 1993).

O processo relacionado à química medicinal não precisa necessariamente ser realizado em laboratórios especializados, pois suas etapas iniciais não requerem tantos recursos, assim podendo ser desenvolvida em universidades. Porém, é de extrema importância a relação indústria/universidade para um maior alcance na identificação dos princípios farmacêuticos (MONTANARI, 1993).

A disciplina Química Medicinal é uma importante aliada no desenvolvimento de fármacos, principalmente no período da descoberta e invenção de compostos biologicamente ativos (MONTANARI, 1993).

Ao contrário do que se imaginava, com o avanço da tecnologia nos últimos tempos a química medicinal não se tornou obsoleta. O surgimento de novas técnicas como a química computacional, Cristalografia e a Ressonância Magnética Nuclear são ferramentas de grande importância para auxiliar na

necessidade que temos nos dias de hoje de produzir novas substâncias químicas (*New chemistry essences* - NCEs) (MONTANARI, 1993).

O desenvolvimento da química medicinal dá-se através de suas importâncias nos processos de idealização, mostrando ser fundamental para o entendimento de doenças em termos de mecanismos fisiológicos e bioquímicos; para a definição de polímeros e substâncias que possam controlar e tratar doenças; determinação da estrutura tridimensional das novas substâncias químicas e também para o desenvolvimento de moléculas inibidoras ou mimetizadoras de sistemas biológicos. Não podemos deixar de fora sua aplicação no isolamento e otimização de novos fármacos, estudo da relação quantitativa e não quantitativa da estrutura química e atividade biológica (QSAR - SAR) e estudos farmacocinéticos, toxicológicos e efeitos colaterais ao otimizar e desenvolver novas drogas (MONTANARI, 1993).

Como a química medicinal auxilia no planejamento e desenvolvimento de novos fármacos

Como vimos, a química medicinal está envolvida desde a invenção e descoberta até a observação do mecanismo de ação de compostos-protótipos, candidatos a fármaco, aplicados no processo. O início desse processo se dá através da descoberta ou da síntese de um composto que apresente um potencial ativo. Posteriormente, são realizados os estudos *in vivo*, para que sejam avaliados os efeitos da molécula em animais, fase essa chamada de testes pré-clínicos, visto que deve ser realizada antes que os estudos clínicos em seres humanos sejam iniciados (GUIDO et al., 2010).

Na fase de descoberta de novos candidatos a fármacos, a química medicinal exerce uma função fundamental, pois através dela podemos analisar o espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização

de moléculas capazes de interagir com alta afinidade e seletividade com o alvo molecular selecionado (por exemplo, enzima x receptor). Para a análise desse espaço químico-biológico, podemos utilizar algumas técnicas desenvolvidas no início da década de 90, tais como: tecnologias analíticas, sintéticas, caracterização estrutural, química combinatorial (QC), triagens biológicas automatizadas em alta escala “high-throughput screening (HTS)”, técnicas de biologia molecular, ciências genômicas, ultra-HTS, organização de bases de dados, aplicação de filtros moleculares e triagem virtual (*vs - virtual screening*) (LIMA, 2007; GUIDO et al., 2010).

Atualmente, a maioria dos fármacos em uso clínico podem ser de origem natural, biotecnológica ou são sintetizados quimicamente a partir de produtos de origem natural. A síntese química especificamente atua em modificações moleculares e são comumente empregadas nas estruturas desses compostos, pela necessidade de fármacos que sejam menos tóxicos, através de alteração na taxa de metabolismo, ou para tornar os fármacos mais ativos que os encontrados na natureza. As modificações moleculares mais comuns efetuadas em estruturas de produtos naturais, visando introduzir mudanças nas propriedades relacionadas às fases farmacodinâmica e farmacocinética, compreendem a homologação linear, homologação ramificada e a introdução de alguns grupos funcionais específicos. Outras estratégias da química medicinal para o desenho molecular, como o emprego do bioisosterismo, também vêm sendo aplicadas com sucesso nas modificações estruturais de compostos biologicamente ativos naturais (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

A escolha da estratégia de planejamento estrutural a ser adotada para o desenho molecular do ligante dependerá se a forma estrutural do alvo terapêutico eleito é conhecida ou não. Quando a estrutura tridimensional do alvo eleito é conhecida, o planejamento molecular do ligante seletivo pode ser realizado pela química computacional. Após a identificação do novo padrão

estrutural, ele deve ser sintetizado e avaliado por meio de bioensaios *in vitro* que, se obtido sucesso, fornecerá um novo ligante do biorreceptor eleito. Este novo ligante é submetido ao processo de validação do conceito terapêutico à origem da eleição do alvo e ao processo de identificação das propriedades farmacocinéticas do ligante, através de bioensaios farmacológicos *in vivo* ou pré-clínicos. Esses estudos pré-clínicos (teste utilizando animais) são necessários para avaliar a toxicidade e eficácia do fármaco. Posteriormente, segue-se para os estudos em humanos que ocorre em quatro etapas, I – avaliar a toxicidade em humanos, II – avaliação de dosagem do medicamento, III- testes finais de segurança em humanos e IV – comercialização e marketing do novo medicamento lançado, sendo requisitado a autorização da agência regulatória nacional e sob os padrões determinados pelas Comissões de Ética (CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, no caso brasileiro). Caso o ligante obtenha sucesso nesta etapa, diz-se que o novo composto-protótipo é descoberto, tornando-se candidato a fármaco que atuará no alvo eleito (BARREIRO; FRAGA, 2005; VIEIRA; OHAYON, 2006).

Por outro lado, quando a estrutura do alvo eleito não é conhecida, o emprego da química medicinal é mais presente no planejamento estrutural do composto-protótipo. As técnicas estratégicas de planejamento podem ser conduzidas a partir da estrutura química de seu substrato natural, inspirando novos análogos ativos. Muitas estratégias se destacam nesse momento, dentre as já citadas acima, bioisosterismo, simplificação molecular e hibridação molecular (BARREIRO, 2009).

O processo de inovação de novos fármacos através da Química Medicinal no Brasil

A partir do mercado crescente de desenvolvimento de novos fármacos, há a necessidade de um processo anterior ao desenvolvimento que é denominado de planejamento, onde permite analisar os riscos e as perdas na produção de um novo fármaco de interesse tecnológicos e também para tentar diminuir o uso excessivo de animais para os testes pré-clínicos, não abolindo por completo. Visando estes parâmetros, para que o processo de produção de um novo fármaco no mercado seja de caráter inovador e que não ocorra perda no desenvolvimento destes fármacos, antes mesmo de lançar a produzir inovações, a empresa ou instituição de pesquisa deve fazer uma série de considerações preliminares, avaliativas. A primeira delas é a definição do portfólio de projetos. Também deverá ter condições de manter a empresa em novos projetos continuamente, simultaneamente aos desenvolvimentos destes, pois não basta apenas entrar no mercado, é preciso criar inovações constantemente para manter-se competitivo (VIEIRA; OHAYON, 2006).

O planejamento de novos fármacos bioativos com potencial terapêutico no Brasil, conta com a Química Medicinal para poder desenvolver este trabalho, na qual modelos matemáticos são validados através de estudos correlacionando a estrutura química de uma substância e a atividade biológica, permitindo então a descoberta de novos fármacos e seus alvos de interesse. Contudo, a introdução da Química Medicinal para planejamento de novos fármacos ainda é muito nova no mercado nacional de produção de substâncias bioativas, onde, por volta de 1991 foi cunhado a Divisão de Estrutura Química e Atividade Biológica (DSA) no Brasil e, passados seis anos decorrentes deste marco, passaria a se chamar Divisão de Química Medicinal (DMD) (AMARAL; MONTANARI, 2002).

Instituições que mais contribuem para o desenvolvimento nacional em Química Medicinal

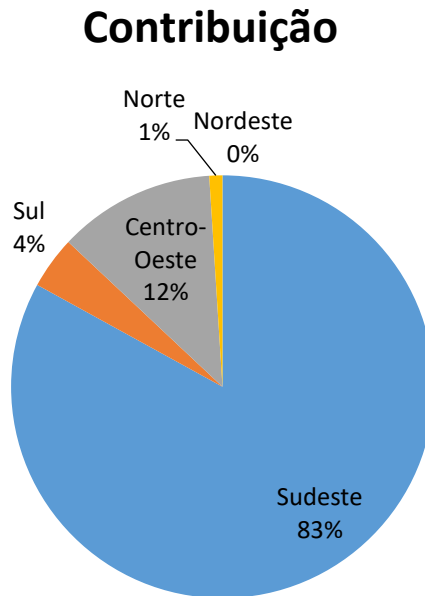
Alguns artigos realizaram estudos e análises estatísticas a fim de se conhecer as principais instituições e a representação destas para o cenário atual da Química Medicinal no Brasil. Todos estes estudos, ilustrados na tabela 1, mostraram que a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) é a instituição que mais contribui para a geração de conhecimento nesta área. Outras universidades como a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Universidade de São Paulo - São Paulo (USP-SP) e Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (USP-RP) também colaboraram com parcelas significativas (LIMA, 2007).

Tabela 1: Contribuição percentual das principais instituições de ensino superior e de pesquisas nacionais.

Instituições	% de contribuição
UFSC	2
UFSM	1,8
USP-SP	8
USP-RP	6,3
UNESP	0,9
UNICAMP	5
UMC	0,9
UFRJ	34
UFF	5
UFMG	4
UFPE	8,9

Também foi realizado um estudo voltado às regiões do Brasil para se saber como estão relacionadas ao percentual total da produção de artigos científicos publicados na área da Química Medicinal. Como é ilustrado na figura 2, 83% desta produção foi realizada na região sudeste, destacando-se o estado do Rio de Janeiro (LIMA, 2007).

Figura 2: Representação percentual das regiões brasileiras para a produção científica.



Fonte: LIMA, 2007.

CONCLUSÕES

Os avanços tecnológicos permitem cada vez mais a aproximação entre a química e a biologia molecular, principalmente na área de planejamento de novos fármacos, na qual a química medicinal exerce um papel fundamental. Sem o auxílio dessa ferramenta, seria impossível realizar a síntese de fármacos estruturalmente modificados a fim de que apresentem farmacocinética e farmacodinâmica melhoradas e, conseqüentemente a toxicidade e atividade aprimoradas.

Apesar de ser relativamente novo o seu uso para o planejamento de novos fármacos por instituições de pesquisa nacionais, a química medicinal vem sendo empregada para esse fim em diversos estudos que visam o tratamento de doenças endêmicas como leishmaniose, esquistossomose, malária e doença de Chagas. A utilização desta ferramenta deve ser cada vez mais ampliada no

Brasil, pois devido ao seu crescimento de forma acentuada, novos investimentos em infraestrutura, qualificação e pesquisa devem ser aplicados e, com isso, o estabelecimento de parcerias entre universidades, indústrias e governo que serão de extrema importância para o seu real desenvolvimento no país.

REFERÊNCIAS

GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

LIMA, L.M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. **Revista Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456-1468, 2007.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Revista Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. A questão da inovação em fármacos no Brasil: proposta de criação do programa nacional de fármacos (PORN FAR). **Revista Química Nova**, v. 28, supl. S56-S63, 2005.

MONTANARI, A.C.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Revista Química Nova**, v.24, n.70, p.105-111, 2001.

MONTANARI, A.C.; AMARAL, T.A. Química medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Revista Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 39-44, 2002.

MONTANARI, A.C. Química medicinal: Contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Revista Química Nova**, v.18, n.1, p. 56-64,1995.

VIEIRA, V.M.M.; OHAYON, P. Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D. **Revista Economia & Gestão da PUC Minas**. v. 6, n. 13, p. 1-23, 2006.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química medicinal**: as bases moleculares da ação dos fármacos, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WERMUTH, C.G. et al. Glossary of terms used in Medicinal Chemistry. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/> >. Acesso em: 11 jul. 2017.

BARREIRO, E.J. Linha do Tempo da Química Medicinal: assim nascem os fármacos. 2011. Disponível em: < <http://ejb-eliezer.blogspot.com.br/2011/10/linha-do-tempo-da-quimica-medicinal.html> > Acesso em: 19 jun. 2017.

NOGUEIRA, L.J.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch. **Revista Virtual Química**. Rio de Janeiro, v.1, n.3, p. 227-240, 2009.