



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

*SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA REATIVIDADE  
DE UM COMPLEXO BINUCLEAR DE NÍQUEL EM SOLUÇÃO  
E ANCORADO EM  $\beta$ -CICLODEXTRINA MODIFICADA COMO  
MODELO PARA AS HIDROLASES*

**JAQUELINE MARIA RAMOS DA SILVA**

Florianópolis  
Novembro/2009

**Jaqueline Maria Ramos da Silva**

***SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA REATIVIDADE DE UM  
COMPLEXO BINUCLEAR NÍQUEL EM SOLUÇÃO E ANCORADO EM  
 $\beta$ -CICLODEXTRINA MODIFICADA COMO MODELO PARA AS  
HIDROLASES***

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
Como requisito parcial da disciplina de:  
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

**Orientador: Ademir Neves**

Florianópolis  
11/2009

**Jaqueline Maria Ramos da Silva**

***SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA REATIVIDADE DE UM  
COMPLEXO BINUCLEAR NÍQUEL EM SOLUÇÃO E ANCORADO EM  
 $\beta$ -CICLODEXTRINA MODIFICADA COMO MODELO PARA AS  
HIDROLASES***

---

Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente  
Coordenadora de Estágios do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Ademir Neves  
Orientador

---

Prof. Dr. Bruno Szpoganicz

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosely Aparecida Peralta

Florianópolis  
Novembro/2009

**À minha família pelo apoio constante, que  
mesmo distante fêz-se presente.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço aos meus pais José e Dalnei e as minhas irmãs Aline e Karine por todo esforço, compreensão e dedicação.

Aos amigos Ramon, Andressa que tiveram presença marcada nos bons momentos e também nos mais difíceis durante minha graduação. Especialmente ao Ramon, minha eterna dupla, agradeço pelas brigas, pelas vezes que fez eu pesar novamente os reagentes, ou repetir as medidas de volume. O meu respeito, admiração, carinho e amizade.

As “baixa renda” e a galerinha fraudulenta: Miss, Pri, Bianka, Didiones, Micheli, Paty, Andressa Valse, Neto, e Evertato. Afinal, quantas vidas você tem?

As meninas do futsal, Alana, Cláudia, Vanessa, Maressa e os treinadores Cláudio e Tio Viça.

Ao Prof. Dr. Ademir Neves pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos amigos do LABINC pelos anos de trabalho, conversas, brincadeiras e amizade, fazendo do ambiente de trabalho um local agradável e propício a discussões e trocas de experiências.

Ao meu “chefinho” Clóvis, que com toda paciência e dedicação ensinou e ajudou desde a minha primeira extração até as últimas correções do meu tcc. Que teve cuidado de não entregar uma formanda em branco mesmo que esta insistia em arrastar o “sare” pelos corredores do departamento.

A Geovana pelas sugestões, discussões, entusiasmo e ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosely Peralta pela eficiência, liderança, e cuidado tanto com o laboratório, quanto com as pessoas grupo.

Aos amigos do LaCFi, meu segundo laboratório, pelas conversas, brincadeiras, amizade e paciência pois, por muito tempo aturaram minhas brigas com o Ramon.

Vida é boa demais para a gente desperdiçar e complicar. A vida é simples e propicia para a gente degustar as coisas simples da vida. Por isso agradeço a pessoa que me ensinou que dar valor a cada dia, e viver um dia por vez. Que

mostrou a dar valor as pequenas coisas, e amar as pessoas não se importantando com o que ela tem para oferecer. Ao meu amigo, companheiro de fraude, parceiro, técnico de futebol, par de dança, e namorado Alex Latino.

A todos os colegas graduandos e pós-graduandos do Departamento de Química pelo coleguismo.

A Pró-Reitoria de Assuntos Estudantis, pela casa, comida e roupa lavada.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, pela acolhida e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao CNPq e demais órgãos de fomento por viabilizarem a execução deste trabalho.

A todos que estiveram presentes neste período de convívio.

*No final dá tudo certo, se não deu certo é porque  
não chegou o fim. Fernando Sabino*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>13</b>
2.1 ENZIMAS	13
2.2 HIDROLASES	14
2.3 O NÍQUEL E SEU PAPEL BIOLÓGICO	15
2.4 UREASE	16
2.5 AS CICLODEXTRINAS	19
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>24</b>
3.1.2 Objetivo Específico	24
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
4.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)	25
4.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO (RMN <sup>13</sup> C)	25
4.3 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA (UV-VIS)	25
4.4 ANÁLISE ELEMENTAR CHNS	26
4.5 ELETROQUÍMICA: ANÁLISE DE VOLTAMETRIA CÍCLICA.	26
4.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	26
4.7 REATIVIDADE	26
4.8 SÍNTESE DO COMPLEXO $[Ni_2(HBPPAMFF)\mu(OAC)_2(H_2O)]BPH_4$ (1)	28
4.9 MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA DA $\beta$ -CICLODEXTRINA ( $\beta$ -CD)	28
4.9.1 6-Mono(p-toluenesulfonil)- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CDTos)	28
4.9.2 6-Monodeoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CDNH <sub>2</sub> )	29
4.10 ANCORAMENTO DO COMPLEXO $Ni_2(HBPPAMFF)\mu(OAC)_2(H_2O)]BPH_4$ EM $\beta$ -CICLODEXTRINA (B-CDNH <sub>2</sub> )	30
<b>5 RESULTADO E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO $[Ni_2(HBPPAMFF)\mu(OAC)_2(H_2O)]BPH_4$ (1)	31
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES NA B-CICLODEXTRINA ( $\beta$ -CD)	34
5.3 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SISTEMA $\beta$ -CD-COMPLEXO	35
5.4 ESTUDO DA REATIVIDADE DO COMPLEXO EM SOLUÇÃO E ANCORADO EM $\beta$ -CICLODEXTRINA	35
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>38</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABELAS E ESQUEMAS

Figura 1. Mecanismo proposto para o sítio catalítico da urease(LIPPARD, 1995).	18
Figura 2. Estrutura das $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ -ciclodextrinas e a representação tridimensional do tronco de cone formado pelo alinhamento dos átomos	19
Figura 3. Ligante H <sub>2</sub> BPPAMFF	23
Figura 4. Espectro no infravermelho complexo [Ni <sub>2</sub> (HBPPAMFF)( $\mu$ -OAc) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]BPh <sub>4</sub>	31
Figura 5. Espectro eletrônico complexo(1) em acetonitrila em (a) bandas de transferência de carga e em (b) transição d-d	32
Figura 6. Voltamograma cíclico de (1) em acetonitrila (0.1 mol.L <sup>-1</sup> ) com [Bu <sub>4</sub> N][PF <sub>6</sub> ] como eletrólito suporte trabalhando com eletrodo de ouro padrão do ferroceno, taxa de varredura interna 100 mV.s <sup>-1</sup>	32
Figura 7. Estrutura proposta para o complexo [Ni <sub>2</sub> (HBPPAMFF)( $\mu$ -OAc) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]BPh <sub>4</sub>	33
Figura 8: Estrutura parcial do cátion complexo [Ni <sub>2</sub> (HBPPAMFF)( $\mu$ -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> COO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)]	33
Figura 9. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (a) da $\beta$ -ciclodextrina pura em D <sub>2</sub> O, (b) $\beta$ -ciclodextrina tosilada em d-DMSO, (c) $\beta$ -ciclodextrina amino em D <sub>2</sub> O.	34
Figura 10. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP (v <sub>0</sub> ) com o pH para o complexo em solução (a) e ancorado (b). Condições: [Complexo] = 1,0 x 10 <sup>-5</sup> mol. L <sup>-1</sup> ; [2,4-BDNPP] = 1,0 x 10 <sup>-3</sup> mol. L <sup>-1</sup> ; [Tampões] = 50,0 x 10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> ; I = 50,0 x 10 <sup>-3</sup> mol.L <sup>-1</sup> (LiClO <sub>4</sub> ) em solução H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN (50% V/V) a 25°C.	36
Figura 11. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo livre (a) e ancorado (b). Condições: [Complexo] = 1,0 x 10 <sup>-5</sup> mol.L <sup>-1</sup> ; [Tampão] = 50,0 x 10 <sup>-3</sup> mol. L <sup>-1</sup> (CHES, pH = 9,00); I = 50,0 x 10 <sup>-3</sup> mol. L <sup>-1</sup> (LiClO <sub>4</sub> ) em solução H <sub>2</sub> O/CH <sub>3</sub> CN (50% V/V) a 25 °C.	37
Tabela 1 – Classificação principal das enzimas segundo a IUBMB .	13
Tabela 2. Parâmetros cinéticos da hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo livre e ancorado.	37
Esquema 1. Síntese da $\beta$ -CDTos	29
Esquema 2. Síntese da $\beta$ -CDNH <sub>2</sub>	29
Esquema 3. Ancoramento da $\beta$ -CDNH <sub>2</sub> com o compelxo(1)	30
Esquema 4. Espécie cataliticamente ativa sugerida por análogos Ni(II)Ni(II) (Greatti,2004, 2008; Loloee, 2008)	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\epsilon$  – coeficiente de absorvidade molar  
 $\delta$  – deformação angular (IV)  
 $\nu$  – estiramento (IV)  
 $\delta_H$  – deslocamento químico do hidrogênio (RMN)  
 $\Lambda_M$  – condutividade molar  
 $\lambda_{\text{máx}}$  – comprimento de onda, no máximo de absorção  
2,4-BDNPP – bis(2,4-dinitrofenil)fosfato  
Asp – aspartato  
BPU – *Bacillus pasteurii* urease  
CD – ciclodextrina  
CHES – ácido 2-[N-Cicloexilamino]etanossulfônico  
CODH monóxido de carbono dextrogenase Hidrogenase  
EXAFS – Extended X-ray Absorption Fine Structure - Estrutura fina de absorção de raios X estendida  
H<sub>2</sub>BPPAMFF (3-(((3-((Benzil(2-piridilmetil)aminometil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(2-metipiridil)aminometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído)  
HEPES – ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-piperazino]-etanossulfônico  
His – histidina  
*I* – força iônica  
IUBMB – International Union of Biochemistry and Molecular Biology - União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular  
IV – espectroscopia vibracional na região do infravermelho  
JBU – Jack bean urease  
 $K_{\text{ass}}$  – constante de associação  
KAU – *Klebsiella aerogenes* urease  
 $k_{\text{cat}}$  – constante catalítica  
 $K_M$  – constante de Michaelis-Menten  
MCR metil-S-coenzima M metil redutase  
MES – (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid – ácido 2-[N-Morfolino]etanossulfônico  
MM – massa molar  
NaBPh<sub>4</sub> – tetrafenilborato de sódio  
NaOAc – acetato de sódio  
NHE – normal hydrogen electrode – eletrodo normal de hidrogênio  
pH – potencial hidrogeniônico  
RMN <sup>13</sup>C – ressonância magnética nuclear de carbono  
RMN <sup>1</sup>H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio  
TBAPF<sub>6</sub> – hexafluorofosfato de tetrabutilamônio  
TMS – tetrametilsilano  
UV-Vis-NIR – Ultraviolet-Visible-Near Infrared - região do ultravioleta-visível-infravermelho próximo  
 $v_0$  – velocidade inicial  
VC Voltametria cíclica  
 $v_{\text{máx}}$  – velocidade máxima  
XAS – X-Ray Absorption Spectroscopy – espectroscopia de absorção de raios X  
 $\beta$ -CDNH<sub>2</sub> - 6-Monodeoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina  
 $\beta$ -CDTos - 6-Mono(p-toluenesulfonil)- $\beta$ -ciclodextrina

## RESUMO

Em todas as células vivas ocorrem ininterruptamente reações, moléculas agem reorganizando átomos, transferindo elétrons e transformando energia para a manutenção dos organismos vivos. A maioria das reações de interesse biológico na verdade deveriam ser muito lentas ou nem ocorrer devido sua complexidade, entretanto essas reações são muito rápidas, o que leva a conclusão que existem moléculas que ampliam em milhões de vezes as velocidades das reações em que participam. Esses catalisadores naturais são chamados de enzimas. Enzimas são proteínas que agem de modo muito específico sobre um dado substrato e são raros os exemplos que produzem subprodutos que não são utilizados nos organismos vivos.

O estudo para desvendar a estrutura, função e mecanismos de ação das enzimas tem levado à descoberta de que algumas delas dependem de metais para seu funcionamento normal. Embora várias enzimas já tenham sido exaustivamente estudadas, a grande maioria continua sendo uma incógnita.

Na tentativa de se obter um maior conhecimento a respeito do mecanismo catalítico das enzimas, estudos através de comparações com complexos modelos de baixa massa molar são realizados. Por esse motivo, propõe-se neste trabalho, a síntese de um complexo binuclear de níquel, assim como o estudo da sua reatividade em solução e ancorado em  $\beta$ -ciclodextrina modificada como modelos estruturais e/ou funcionais para hidrolases.

*Palavras-chave: hidrolases, complexo-modelo,  $\beta$ -ciclodextrina*

## 1 INTRODUÇÃO

Os estudos de como os processos biológicos ocorrem nos mais diversos organismos têm contribuído para a descoberta de que a presença de íons metálicos é parte fundamental para o funcionamento normal dos mesmos. Dentre esses processos de interesse estão o entendimento do modo de ação de enzimas e proteínas.

Embora várias enzimas já tenham sido amplamente estudadas, a grande maioria continua sem ter sua estrutura, função e mecanismo de ação elucidados. No entanto, diversas metaloenzimas (enzimas com metais em seu sítio ativo) conhecidas, possuem algumas propriedades físico-químicas bem determinadas, o que permite um estudo através de comparações com complexos de baixa massa molar, cuja estrutura cristalina pode ser determinada, permitindo comparação das propriedades dos mesmos com a estrutura e funções da enzima de interesse.

Além disso, os complexos-modelo podem apresentar aplicações em potencial, tais como atividade farmacológica e catalisadores em processos industriais. Neste sentido, também tem sido estudada a imobilização de compostos em suportes, buscando a formação de estruturas organizadas que permitam um grande acesso do substrato ao sítio catalítico. A matriz do suporte pode impor uma forma seletiva e promover um ambiente favorável para a aproximação do substrato à espécie ativa (HALMA, 2002; BEDIOIU, 1995).

A imobilização de complexos metálicos em suportes pode ocorrer em fase homogênea e heterogênea. Em fase homogênea, o suporte facilita a solubilização do complexo em um solvente no qual era insolúvel, por exemplo a  $\beta$ -ciclodextrina, que devido a sua estrutura, pode tornar moléculas hidrofóbicas solúveis em água. Existem outros suportes, que quando ligados aos complexos não solubilizam, formando uma fase geralmente sólida em solução. A imobilização em fase heterogênea como é chamada, facilita a regeneração do catalisador e sua separação dos produtos, proporciona uma maior estabilidade, pois, previne a agregação molecular ou a destruição do catalisador durante a reação, as quais levam à desativação da espécie catalítica. Pode ser utilizado um suporte inorgânico (argilas ou sílica gel) ou um biopolímero como a quitosana. Dentre esses suportes

este trabalho dá atenção especial para a imobilização de complexos em  $\beta$ -ciclodextrina em fase homogênea.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ENZIMAS

As enzimas são as biomoléculas mais notáveis e especializadas dos sistemas vivos e apresentam como característica principal uma extraordinária eficiência catalítica, sendo então chamadas de catalisadores naturais. Vale salientar que o ponto que as diferenciam de outros tipos de catalisadores é o alto grau de especificidade com relação aos seus substratos. Elas aceleram reações químicas específicas em meio aquoso sob condições suaves de temperatura e pH (NELSON, 2000; STRYER, 1996).

Devido a essa especificidade, a maioria delas é nomeada pelo seu substrato ou pela reação que catalisa seguido da palavra **ase**. Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) as enzimas são classificadas em seis grandes grupos, de acordo com o tipo de reação envolvida como mostrado na Tabela 1 (VOET, 1995, STRYER, 1996).

Tabela 1 – Classificação principal das enzimas segundo a IUBMB (VOET, 1995, STRYER, 1996).

Classe	Reação	Exemplo
1. Oxirredutases	Oxidação-redução	Lactato desidrogenase
2. Transferases	Transferência de grupo	Homocisteína metiltransferase
3. Hidrolases	Reações de hidrólise	Quimotripsina
4. Liases	Adição ou remoção de grupos	Fumarase
5. Isomerases	Isomerização	Mandelato racemase
6. Ligases	Ligação de dois substratos	Asparagina sintetase

A maior parte do poder catalítico das enzimas vem da sua capacidade de aproximar os substratos em orientações favoráveis que promovam a formação dos estados de transição. Para alcançar a estrutura conformacional necessária e diminuir

a energia do estado de transição, além das convencionais interações supramoleculares e ligações de dissulfeto, muitas enzimas têm metais em seus sítios ativos que auxiliam tanto na ligação do substrato por coordenação, como na aproximação de diversos resíduos distantes. As diversas cadeias laterais dos aminoácidos ligam-se de várias formas aos metais, regulando sua eletrofilicidade e estado de oxidação. Por isso os metais são considerados cofatores inorgânicos das assim chamadas metaloenzimas (KAIM, 1994).

## 2.2 HIDROLASES

Hidrolases biomiméticas do DNA ou do RNA (nucleases) são de extrema importância na biotecnologia e na medicina. A habilidade de clivar ácidos nucleicos de forma eficiente, e não de maneira degradativa, e com altos níveis de seletividade para sítios ou estruturas podem oferecer diversas aplicações como na manipulação genética terapêutica, no desenvolvimento de novos fármacos e sondas de DNA (COWAN, 2001).

As nucleases catalisam a clivagem hidrolítica da cadeia de fosfodiésteres do DNA e RNA. Por isso há um crescente interesse no desenvolvimento de nucleases químicas, reagentes que possam reconhecer e clivar estruturas ou seqüências específicas do ácido nucleico (BURSTYN, 1993). O desenvolvimento de nucleases artificiais para o uso em genética molecular e engenharia genética é um desafio para muitos pesquisadores devido à grande estabilidade da cadeia dos diésteres de fosfato do DNA e sua resistência à clivagem hidrolítica (TROGLER, 1990). Nucleases típicas aceleram a velocidade da hidrólise do DNA em um fator que excede  $10^{10}$  (WILLIAMS, 1999; WESTHEIMER, 1987). Muitos catalisadores sintéticos testados exibem velocidades relativamente baixas para a hidrólise do DNA; (LIU, 2004) e um melhor entendimento das características mecânicas dessa reação poderia ser útil no desenvolvimento de sistemas mais efetivos.

O papel dos íons metálicos em promover a hidrólise de diésteres de fosfato e polifosfatos tem sido objeto de consideráveis estudos para se conhecer as vias pelas quais os metais atuam nestes processos. Acredita-se que o centro binuclear facilite a hidrólise de fosfodiésteres pelo uso de um sítio metálico para a ativação do substrato e do outro sítio como um ácido de Lewis diminuindo o  $pK_a$  da água, liberando o nucleófilo hidróxido para o ataque ao substrato (KIMURA, 2000; FONTECAVE

1998). Entretanto, algumas hidrolases sintéticas contendo centros mononucleares também têm sido utilizadas em processo hidrolíticos do DNA (MORROW, 1998; DEAL, 1996; PARIMALA, 2003; RAWJI 2000).

### 2.3 O NÍQUEL E SEU PAPEL BIOLÓGICO

Por um longo tempo o níquel foi o metal de transição 3d menos pesquisado (quando comparado aos outros metais da primeira série de transição) em relação ao seu papel biológico. O níquel hoje em dia é reconhecido como um elemento traço essencial para as bactérias, plantas, animais e seres humanos (LANCASTER, 1988). No entanto, os modelos bioquímicos desse metal nos animais não são muito conhecidos, pois até hoje foram encontrados apenas quatro enzimas (em bactérias) que dependem do níquel: Ureases (também encontrada em plantas), monóxido de carbono dextrogenase (CODH), Hidrogenase ( $H_2$ -ase) e metil-S-coenzima M metil redutase (MCR) que empregam um átomo de níquel no grupo prostético (fator 430).

Dependendo da metaloenzima, o ambiente de coordenação ao redor do íon níquel é diferente, por exemplo, seja pelo número de coordenação (4, 5 ou 6) ou pelos ligantes N, O ou S doadores coordenados ou até mesmo pelo seu estado de oxidação. Em todos os sistemas estudados, no entanto, os centros de níquel estão ligados a resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das enzimas e intimamente envolvidos no seu ciclo catalítico (NRIAGU, 1980).

Vários aspectos da química biológica do níquel são incomuns no conhecimento da química de coordenação do níquel: três das quatro enzimas são conhecidas por conter centros de níquel ativos por reações redox, cujo estado de oxidação pode variar entre +3, +2 e ou +1 em ligantes ricos em tiolato e tetrapirrois. Sabe-se que as reações catalisadas por essas enzimas; clivagem da ligação C-S (MCR), a oxidação do  $H_2$  e a redução do  $H^+$  ( $H_2$ -ase), e a interconversão do CO em  $CO_2$  e a formação ou clivagem da ligação C-S e C-C (DOCH) são muitíssimo incomuns para complexos inorgânicos de níquel. A exceção é a Urease que é, portanto o único exemplo do emprego natural do íon  $Ni^{+2}$  como um ácido de Lewis catalítico.

Com exceção da Urease (JABRI, 1995) nenhuma das enzimas acima foi caracterizada por cristalografia de raios X e o conhecimento dos seus sítios ativos e modelos de atividade são muito limitados porque os dados foram obtidos por

técnicas físico-químicas. Estas incertezas inspiram um grande interesse na química de coordenação do níquel.

## 2.4 UREASE

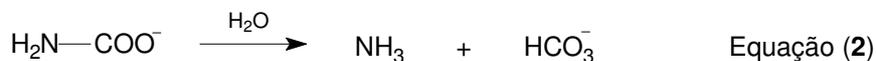
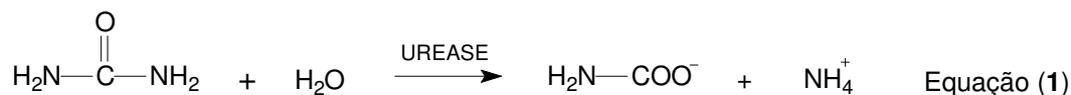
As hidrolases são enzimas capazes de hidrolisar uma série de ligações químicas, tais como: amidas, ésteres, éteres, nitrilas, entre outras. Neste trabalho, as metaloenzimas de interesse concentram-se na classe das amidohidrolases dentre as quais se encontra a urease.

A urease (uréia amidohidrolase E.C.3.5.1.5) pertence a uma família das metalohidrolases binucleares e contém íons níquel (II) no sítio catalítico, sendo a mesma denominada de catalisador biológico para a decomposição hidrolítica da uréia. A uréia é formada em grandes quantidades, como um produto do catabolismo de compostos contendo nitrogênio. Cada humano produz, por exemplo, cerca de 10 quilogramas de uréia por ano (MOBLEY,1989). A decomposição espontânea da uréia ocorre com um tempo de meia-vida em torno de 3,6 anos e este longo período pode levar rapidamente a um grande acúmulo de uréia causando vários problemas ambientais (ZERNER,1991).

A urease extraída de plantas *Canavalia ensiformis* (extraída de um tipo de feijão japonês, conhecida como Jack bean) foi a primeira enzima a ser isolada na forma cristalina por James B. Sumner em 1926 (SUMNER, 1926). O grande avanço na história da urease foi à descoberta da presença de íons níquel em seu sítio ativo (DIXON, 1975). Após aproximadamente 70 anos do isolamento da urease na forma cristalina, obteve-se a estrutura tridimensional da urease da bactéria *Klebsiella aerogenes* por difração de raios X com uma resolução de 2,2 Å, a qual revela detalhes acerca da geometria molecular no sítio ativo (KARPLUS, 1995).

A metaloenzima urease catalisa a hidrólise da uréia em uma grande variedade de bactérias (*Klebsiella aerogenes* - KAU, *Bacillus pasteurii* – BPU), plantas (*Canavalia ensiformes* ou Jack bean – JBU), fungos e alguns invertebrados produzindo amônio e carbamato. Este processo ocorre cerca de  $10^{14}$  vezes mais rápido do que a reação não catalisada, com um tempo de meia-vida de microssegundos. O carbamato produzido durante esta reação se decompõe espontaneamente, a pH fisiológico, gerando amônia e bicarbonato, como

representado nas Equações (1) e (2), respectivamente (HALCROW,1994; BLAKELEY, 1982).



Este mecanismo contrasta com a decomposição da uréia em meio aquoso, a qual se mostra ser não hidrolítica, promovendo uma reação de eliminação produzindo ácido ciânico e amônia (KOŁODZIEJ, 1994). O impacto ambiental e na saúde causado pela atividade das ureases é enorme, no entanto o controle da velocidade de hidrólise da uréia pelo uso de inibidores levaria a uma melhora na eficiência da captura de nitrogênio pelas plantas, além de um grande progresso nas estratégias terapêuticas utilizadas para o tratamento de infecções causadas pelas ureases bacteriais.

Nas últimas décadas vários estudos espectroscópicos e estruturais têm sido realizados a fim de elucidar as propriedades e a natureza do sítio ativo das ureases. Estudos de espectroscopia eletrônica realizados com a urease de Jack bean (JBU) mostram que o espectro eletrônico desta enzima caracteriza-se por fracas bandas de absorção na região do visível e infravermelho próximo com  $\lambda_{\text{máx}} = 1060 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 10 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $910 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 14 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ),  $745 \text{ nm}$  ( $\epsilon = 46 \text{ mol. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) e  $407 \text{ nm}$  (ombro). Estas bandas são atribuídas a transições d-d relacionadas com o íon níquel(II) pentacoordenado ou em ambientes octaédricos distorcidos (HALCROW,1994; DIXON,1980). Reforçando estes resultados, estudos de EXAFS (Estrutura Fina de Absorção de raio X) com a JBU indicaram que os íons níquel(II) encontram-se em geometria pseudo-octaédrica coordenados a três átomos de nitrogênio a  $2,04 \text{ \AA}$  de distância, dois átomos de oxigênio a  $2,07 \text{ \AA}$  e um átomo de oxigênio a  $2,25 \text{ \AA}$  de distância (HASNAIN, 1983; ALAGNA, 1984). A presença de resíduos de histidina coordenada ao centro metálico também foi sugerida (HASNAIN, 1983). Novos estudos de espectroscopia de absorção de raios X (XAS) definiram uma esfera de coordenação composta de um total de 5-6 átomos N,O doadores com uma média de comprimento de ligação Ni-(N,O) de  $2,06 \text{ \AA}$  (CLARK, 1990).

Inspirados nas informações espectroscópicas, estruturais e mecanísticas abordadas anteriormente, os químicos bioinorgânicos vêm sintetizando compostos que possam vir a apresentar propriedades similares as metaloenzimas em questão.

Os compostos binucleares de níquel, sintetizados com este objetivo, reproduzem algumas características importantes do sítio ativo das ureases e podem fornecer informações importantes do ciclo catalítico. Por exemplo, vários complexos de níquel(II) contêm uréia na esfera de coordenação (BLAKELEY,1982; WAGES, 1993; KOGA,1998; YAMAGUCHI, 1997; GREATTI, 2000) e apresentam-se como modelos para a interação do substrato com o sítio ativo. Estes compostos sintéticos mostraram que a uréia coordena-se preferencialmente pelo átomo de oxigênio do grupo carbonila. A coordenação da molécula de uréia nesses compostos está de acordo com o mecanismo proposto por Lippard (figura 1), (LIPPARD, 1995) ou seja, o substrato (uréia) coordena-se ao íon níquel na urease através do átomo de oxigênio do grupo carbonila.

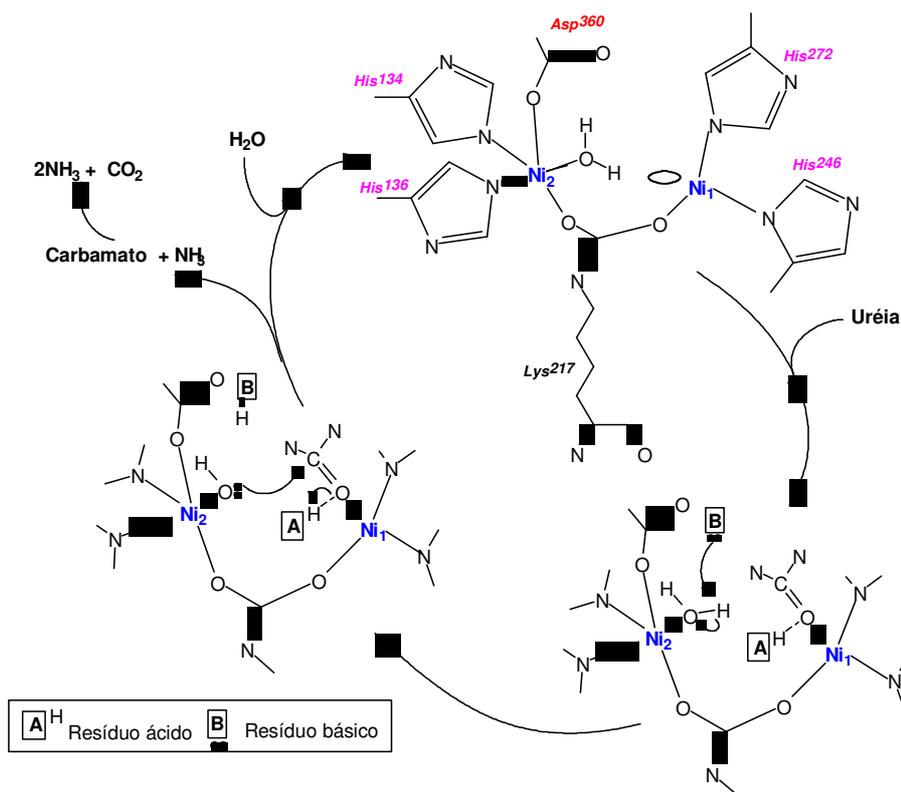


Figura 1. Mecanismo proposto para o sítio catalítico da urease(LIPPARD, 1995).

Diante da dificuldade apresentada pelos complexos binucleares de níquel (II) em hidrolisar uréia, alguns complexos modelos para as ureases têm sido testados na hidrólise de ésteres de fosfato, (VOLKMER, 1996; VOLKMER, 1999; NORDLANDER, 2002) visando conhecer a capacidade desses compostos em atuar como modelos funcionais para metaloenzimas hidrolíticas.

## 2.5 AS CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CD) são oligossacarídeos cíclicos formados pela união de moléculas de  $\alpha$ -(D)-glicopiranosose, com estrutura semelhante a um tronco de cone (CONNORS, 1997). A primeira referência sobre substâncias que mais tarde seriam classificadas em ciclodextrinas foi publicada por Villiers em 1891 (VILLIERS, 1891), em um estudo sobre a digestão do amido com o *Bacillus amylobacter*. Após a degradação, Villiers observou a formação de um composto cristalino, em pequena quantidade (3,0 g/kg), com composição representada por um múltiplo de  $(C_6H_{10}O_3).3H_2O$  e propriedades semelhantes à celulose.

No início dos anos 30, Freudenberg, através de investigações em laboratório e de observações publicadas por Schardinger e Cramer, concluiu que o sólido cristalino isolado por Villiers era uma mistura de oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unida através de ligações  $\alpha$ -(1-4), e nomeou-as ciclodextrinas(CD) (SZEJTLI, 1998). Nos anos posteriores, diversos grupos trabalharam na caracterização física, química e na obtenção em larga escala das ciclodextrinas, bem como no estudo de seus compostos de inclusão (STELLA, 1997; BUSCHMANN, 2002; MARTIN DEL VALLE, 2004).

As CD mais amplamente empregadas para fins comerciais e científicos são  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -CD, formadas por seis, sete e oito unidades de D-glicose, respectivamente (HEDGES, 1998; SINGH, 2002) (Figura 2).

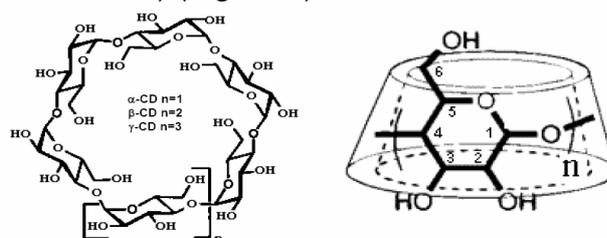


Figura 2. Estrutura das  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas e a representação tridimensional do tronco de cone formado pelo alinhamento dos átomos

No estado natural são moléculas rígidas, cristalinas e homogêneas, que oferecem inúmeras utilidades em função do seu tamanho, forma e grupos funcionais livres (LI, 2002). Sua estrutura física foi estabelecida em 1942, por estudos de raios X (FERREIRA, 1999; LINDNER, 1982), através da qual determinou-se que essas moléculas anulares possuem os grupos hidroxila primária na parte mais estreita do tronco, ao passo que os grupos hidroxilas secundários encontram-se na parte mais larga deste tronco (Figura 2). Assim, as hidroxilas das extremidades podem formar ligações de Hidrogênio com o solvente e tornando-as solúveis em água.

Por outro lado, o interior da cavidade é delimitado pelo alinhamento dos hidrogênios C(3)-H e C(5)-H e pelo oxigênio da ligação éter C(1)-O-C(4), o que lhe confere um caráter hidrofóbico (ENGELDINGER, 2003).

Em meio aquoso, as cavidades das CDs proporcionam uma matriz hidrofóbica em um ambiente hidrofílico, podendo formar compostos de inclusão com uma ampla variedade de moléculas, dependendo apenas de restrições estereoquímicas e de polaridade (LOFTSSON, 1996). As dimensões da cavidade interna variam de acordo com o número de unidades de D-glicose que as formam.

Para a compreensão dos mecanismos de enzimas envolvendo as ciclodextrinas, vários estudos tem sido efetuados, o que tem motivado muitos grupos de pesquisa para o desenvolvimento de inúmeros modelos enzimáticos e de enzimas artificiais que trazem CDs em sua arquitetura. (BRESLOW 1994, 1996, 1998; UGAS 1996; MONTEIRO, 2003; BRANDÃO 2004; MILOVIC 2004; BARR 2004,2005; MARINESCU 2005, 2006; ROUSSEAU 2005; LIU 2006).

Estes sistemas modelos aproveitam a habilidade das CDs de serem solúveis em água, de apresentarem uma cavidade lipofílica adequada para reconhecer substratos e, ainda, a possibilidade de serem funcionalizadas com grupos lábeis para, atuando de forma integrada, aumentar a especificidade do reconhecimento do substrato e exercer função catalítica pela sua proximidade com o centro reativo.

Desta forma, o conhecimento da estrutura do sítio ativo de muitas enzimas auxilia na montagem destes sistemas e tem inspirado os químicos na montagem de enzimas artificiais capazes de catalisar reações que as enzimas naturais não conseguem realizar (VENTURINI, 2008).

Da mesma forma que as CDs catalisam diferentes processos podem, ainda, ser responsáveis pela inibição de muitas reações, o que é de interesse quando o que se deseja é proteger o substrato dos diferentes agentes no meio em que ele se

encontra. Um exemplo foi proporcionado recentemente por um trabalho em que se demonstra que a formação de um complexo de inclusão de uma  $\gamma$ -CD com ampicilina reduz a velocidade de hidrólise do antibiótico na presença de  $\beta$ -lactamase (SCHNEIDER 1998; PONS, 2001; RAMSTAD, 2005; MAFFEO, 2006)

Estudos desta natureza apresentam importância considerando-se que  $\beta$ -lactamases são produzidas por bactérias, com o intuito de inibir a atividade do antibiótico. Um outro aspecto importante a ser evidenciado é a capacidade antioxidante que  $\alpha$ -, $\beta$ - e  $\gamma$ -CD apresentam (VOICESCU, 2006). No campo dos estudos relacionados com o transporte, as CDs vêm sendo empregadas como catalisadores de transferência de fase (ABREU, 2005), como dopantes em membranas poliméricas para o transporte de metais (REECE, 2005), na montagem de canais iônicos (MADHAVAN,2005) e em processos de extração de hidrocarbonetos(MEINDERSMA,2006).

A associação das CDs à química dos polímeros tem permitido uma ampla faixa de aplicações que envolvem, por exemplo, o desenvolvimento de um sistema para a liberação de insulina com aplicação nasal (YU, 2004), o uso de nanoesferas em sistemas de floculação/sorção (XIAO, 2005), o estudo da pervaporação de misturas de benzeno com cicloexano (DUBEY, 2006) e o desenvolvimento de adutos supramoleculares paramagnéticos para aplicações como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética(AIME, 2006).

Além disso, as CDs formam complexos com uma variedade de compostos utilizados na área agrícola, tais como herbicidas (KLEIN, 2006), fungicidas (BALMAS, 2006), inseticidas (ROMI, 2005), feromônios (ARAD-YELLIN,2001) e reguladores de crescimento (TSORTEKI, 2005), sendo estes trabalhos de interesse especial devido à formação destes complexos de inclusão geralmente resultar em melhorias nas propriedades físico-químicas dos agroquímicos, tais como o aumento da solubilidade e da biodisponibilidade, o aumento da estabilidade no caso de compostos instáveis ou fotodegradáveis, a redução do aroma desagradável e a redução da toxicidade em sistemas vivos(VILLAVERDE, 2004; DIGNAM, 2006).

Merece destaque ainda o uso de CDs para o desenvolvimento de receptores moldados especialmente para determinados substratos pelo uso da estratégia da impressão molecular (“molecular imprinting”)( VENTURINI, 2008). Neste caso, faz-se em uma primeira etapa a complexação do substrato-molde com a CD e a seguir é realizada uma reticulação na presença do complexo, com o uso de um monômero

apropriado. Após a remoção do molde, a cavidade do novo receptor pode ser explorada para o reconhecimento do substrato (ASANUMA, 2004; EGAWA, 2005). Além da técnica da impressão molecular, a interação de sílicas modificadas com CDs foi investigada para a obtenção de centros de adsorção para moléculas bioativas (BELYAKOVA,2005), da mesma forma como o metoxicinamatode octila, um agente protetor solar, pôde ser incorporado nas cavidades de uma  $\beta$ -CD especialmente funcionalizada para se ligar covalentemente a uma fibra celulósica (SCALIA, 2006).

A formação de complexos de inclusão nas ciclodextrinas pode ser realizada em meio aquoso ou no estado sólido. Em meio aquoso, a cavidade interior das CDs é ocupada por moléculas de água através de uma interação fraca e energeticamente desfavorável (interação polar - apolar), o que facilita a inclusão de moléculas menos polares que a água. A inclusão na matriz rígida das CD geralmente proporciona às moléculas inseridas algumas mudanças em suas propriedades físico-químicas, como aumento da estabilidade e biocompatibilidade.

Um aumento na hidrofobicidade ou hidrofiliidade pode ser alcançado com alterações nos grupos  $-OH$  externos, possibilitando assim o uso de CD nestes produtos (IRIE, 1997). Os métodos de modificação de CDs podem ser divididos em dois tipos: o primeiro é o chamado “método direto”, onde são utilizadas rotas curtas e a CD é modificada indiscriminadamente, formando uma mistura de produtos que são separados posteriormente por cromatografia. O segundo é mais elaborado, com várias etapas, e é necessário para produção de CDs com modificações em posições específicas (KHAN, 1998).

Como os grupos hidroxila são nucleofílicos, a reação de modificação da CD começa com um ataque eletrofílico nas posições 2, 3 ou 6. Dos grupos hidroxilas presentes na CD, os da posição 6 são os mais básicos, e portanto, mais nucleofílicos, e os da posição 2 e 3 mais ácidos. Além disto, a rotação dos grupos 2 e 3 (hidroxilas secundárias) é muito restrita, enquanto que a rotação das hidroxilas da posição 6 (primárias) é livre. Assim, sob circunstâncias normais, um reagente eletrofílico ataca a posição 6 preferencialmente. Para uma modificação direcionada à posição 2 ou 3, primeiramente é necessária uma desprotonação do grupo, deixando assim o oxianion formado mais nucleofílico que os da posição 6. Um outro modo de direcionar esta reação é proteger a posição não desejada com uma alquilação, direcionando o ataque à outra posição.

Foram investigados complexos mimetizadores funcionais no reconhecimento de enzimas (ZHANG, 1997; TASTAN, 2000). Entretanto, estudos nos complexos da inclusão da ciclodextrina, que são construídos por um complexo do metal que liga uma molécula CD como mimetizadores de meloenzimas, são relatados ainda raramente. Recentemente, Mao e colaboradores (ZHOU, 2008) relataram complexos da inclusão da ciclodextrina como imitadores da superóxido dismutase. Nesse sentido, tem sido estudada a imobilização de compostos em suportes buscando a formação de estruturas organizadas que permitam um grande acesso do substrato ao sítio catalítico.

O ligante (3-(((3-((Benzil(2-piridilmetil)aminometil)-2-hidroxi-5-metilbenzil)(2-metipiridil)aminometil)-2-hidroxi-5-metilbenzaldeído) H<sub>2</sub>BPPAMFF (Figura 3), sintetizado e caracterizado (PIOVEZAN, 2009), apresenta um grande potencial para a síntese de complexos binucleares de níquel como modelos para as hidrolases, pela possibilidade de fornecer um sítio livre para coordenação em um dos centros metálicos, coordenado com um grupo lábil que possa facilmente ser substituído pelo substrato.

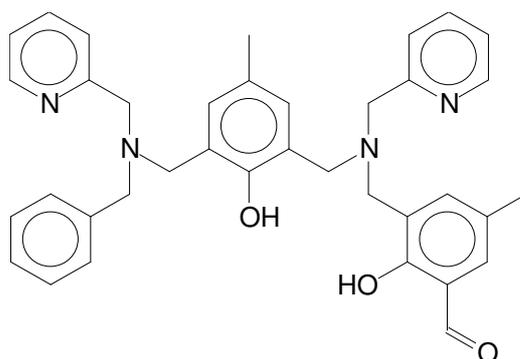


Figura 3. Ligante H<sub>2</sub>BPPAMFF

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

A compreensão da maneira como atuam as metaloenzimas tem sido facilitada pela Química Bioinorgânica. A síntese e caracterização de modelos e análogos sintéticos que mimetizem a estrutura do sítio ativo de enzimas têm fornecido relevantes informações para o trabalho na área biológica. Trata-se de um trabalho em etapas, no qual se busca o ajuste das propriedades físico-químicas dos modelos ou análogos sintéticos com as respectivas propriedades das enzimas de interesse na pesquisa, através de complexos modelos sintetizados, do estudo da reatividade dos compostos obtidos.

##### 3.1.2 Objetivos Específicos

Frente à abordagem da Química Bioinorgânica acima citado são objetivos deste trabalho:

- 1) Síntesar e caracterizar um complexo binuclear de níquel com o ligante  $H_2BPPAMFF$ .
- 2) Modificar a estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina para o ancoramento do respectivo complexo.
- 3) Estudar da reatividade do complexo binuclear de níquel formado com o ligante  $H_2BPPAMFF$  como modelo para as metaloproteínas que promovem hidrólise (hidrolases) frente à hidrólise de ésteres de fosfatos do complexo em solução e ancorado na  $\beta$ -ciclodextrina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os reagentes e solventes utilizados foram comprados de fontes comerciais (Aldrich, Fluka, Merck, Tedia, Acros, Vetec e Nuclear).  $\beta$ -ciclodextrina foi recristalizada em água antes do uso. O ligante H<sub>2</sub>BPPAMFF foi sintetizado e caracterizado por método descrito na literatura (PIOVEZAN, 2009). O substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato [2,4-BDNPP], foi sintetizado de acordo com o método descrito por Bunton (BUNTON,1969).

### 4.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR – 2000, Perkin Elmer, na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. As amostras foram preparadas por dispersão em KBr de grau espectroscópico e prensadas (~10 toneladas), formando pastilhas com cerca de 1 cm de diâmetro e 0,5 mm de espessura. Estas pastilhas foram introduzidas no caminho óptico do equipamento para leitura do percentual de transmitância (%T). As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

### 4.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO (RMN<sup>13</sup>C)

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C foram obtidos em um espectrofotômetro VARIAN 400 MHz, na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. Foram utilizados, clorofórmio deuterado, dimetil sulfóxido deuterado e água deuterada como solvente.

### 4.3 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA (UV-VIS)

Os espectros eletrônicos nas regiões do ultravioleta, visível e infravermelho próximo foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo Lambda-19, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química – UFSC.

As análises foram realizadas utilizando-se solventes de grau espectroscópicos e cubetas de quartzo e vidro com capacidade para 4 mL e 1 cm de caminho óptico.

#### 4.4 ANÁLISE ELEMENTAR CHNS

A determinação dos percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio foram realizadas em uma analizador elementar CHNS Perkin-Elmer 2400 Analyzer na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC.

#### 4.5 ELETROQUÍMICA: ANÁLISE DE VOLTAMETRIA CÍCLICA.

O equipamento usado na técnica (VC) é um potenciostato Epsilon EC 2000, eletrodo de trabalho: ouro, eletrodo de referênica: Ag/Ag<sup>+</sup>, eletrodo suporte: platina, eletrólito suporte: hexafluorofosfato tetrabutilamonio(0,1 mol.L<sup>-1</sup>), padrão interno: ferroceno.

#### 4.6 DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

A análise de difração de raios X de monocristal do complexo foi realizada pelo Prof. Dr. Eduardo E. Castellano do Departamento de Física – UFSCar. Os dados foram coletados em um difratômetro Enraf-Nonius Kappa-CCD equipado com um tubo de molibdênio (MoK<sub>α</sub> λ = 0,71073 Å) e monocromador de grafite à temperatura ambiente. A estrutura cristalina parcial foi resolvida através de métodos diretos com a utilização do programa SHELXS97 (SHELDRICK, 1997) e refinados pelo método dos mínimos quadrados com matriz completa, com a utilização do programa SHELXL97. As representações gráficas das estruturas moleculares foram geradas utilizando o programa ORTEP (FARRUGIA, 1997).

#### 4.7 REATIVIDADE

A atividade catalítica do complexo [Ni<sub>2</sub>(HBPPAMFF)(μ-OAc)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]BPh<sub>4</sub> em solução e ancorado foram avaliadas através da reação de hidrólise do substrato bis-(2,4-dinitrofenil)fosfato [2,4-BDNPP]. Os experimentos cinéticos foram realizados em

triplicata sob condições de excesso de substrato monitorando-se espectrofotometricamente, em um espectrofotômetro UV-Vis Varian Cary 50 BIO acoplado a um banho termostatizado, a variação de absorbância ocorrida em 400 nm, relacionada à liberação do ânion 2,4-dinitrofenolato, como produto da reação de hidrólise. A concentração de 2,4-dinitrofenolato formada foi calculada a partir do coeficiente de extinção molar em 400 nm ( $\epsilon = 12100 \text{ L. mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) (BUTTON, 1969) previamente determinado em pH = 6,00 e 9,00. As reações foram monitoradas até 5% de conversão de substrato a produto e os dados foram tratados pelo método das velocidades iniciais. As velocidades iniciais foram obtidas diretamente do gráfico da concentração de 2,4-dinitrofenolato *versus* o tempo.

Os estudos em função do pH, os quais visam à obtenção do pH ótimo de atividade, foram realizados em uma faixa de pH entre 4,00 e 10,50 em condições de 100 vezes de excesso do substrato a 25 °C utilizando cubetas de quartzo e/ou vidro óptico com capacidade para 4 mL e caminho óptico de 1 cm, seladas com tampa de teflon, nas quais foram adicionados 1,5 mL de solução aquosa ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) do tampão (MES pH 4,00 a 6,50; HEPES pH 7,00 a 8,50; CHES pH 9,00 a 10,00; com força iônica mantida constante ( $I = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ ) com a adição de perclorato de lítio, 0,100 mL de uma solução estoque do complexo ( $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila), 0,300 mL de uma solução estoque do substrato ( $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila), e acetonitrila para completar o volume final de 3,0 mL da mistura reacional. Portanto, as concentrações finais utilizadas de complexo e de substrato foram  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  e  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ , respectivamente.

Os experimentos em função da concentração do substrato foram realizados a 25 °C utilizando tampão CHES, pH = 9,00. Em um experimento típico adicionou-se 1,5 mL de tampão CHES ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  em água), 0,100 mL de uma solução estoque do complexo ( $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila), quantidades adequadas de soluções estoque de substrato de 0,060 mL a 1,20 mL ( $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila) e de 0,020 a 1,350 mL ( $2,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  em acetonitrila). As concentrações finais utilizadas foram  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  de complexo e concentrações variadas de substrato entre  $2,0 \times 10^{-4}$  a  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Para o sistema ancorado em  $\beta$ -ciclodextrina foi pesado cerca de 1 mg ( $8,62 \times 10^{-7}$  mols) do complexo ancorado dentro da cubeta reacional e este foi solubilizado no

respectivo tampão. Todas as condições reacionais para a variação do pH e substrato se seguiram como descritas acima.

#### 4.8 SÍNTESE DO COMPLEXO $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$ (1)

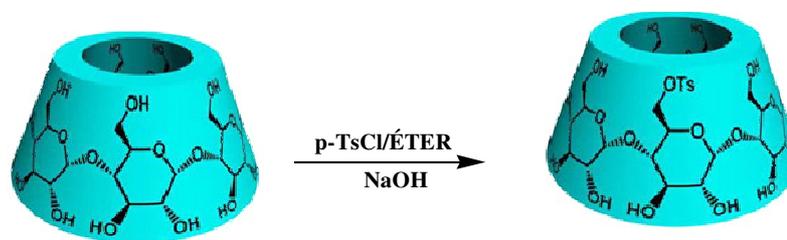
O complexo (1) foi sintetizado através de uma solução metanólica misturando-se perclorato de níquel hidratado ( $\text{Ni}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (0,73 g, 2 mmol em 20 mL) e o ligante  $\text{H}_2\text{BPPAMFF}$  (0,58 g, 1 mmol, em 20 mL) com a agitação e aquecimento suave ( $60^\circ\text{C}$ ). Após 15 minutos, acetato de sódio  $\text{NaCH}_3\text{COO} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,16 g, 2 mmol) foi adicionado, e uma solução verde foi obtida. Tetrafenilborato de sódio  $\text{NaBPh}_4$  foi utilizado como contra íon (0,34 g, 1 mmol), imediatamente um sólido verde foi formado, este foi filtrado e seco sob o vácuo por 24 horas. Rendimento: 58% IV (KBr), in  $\text{cm}^{-1}$ :  $\nu$  ( $\text{C-H}_{\text{Ar}}$  e  $\text{C-H}_{\text{Aliph}}$ ) 3431-2922;  $\nu$  ( $\text{C=N}$  e  $\text{C=C}$ ) 1637-1427;  $\nu_{\text{ass}}$  (OAc) 1552;  $\nu_{\text{sym}}$  (OAc) 1479;  $\nu$  ( $\text{C-O}$ ) 1263;  $\nu$  ( $\text{H-O}_{\text{phen}}$ ) 1026,  $\delta$  ( $\text{C-H}_{\text{Ar}}$ ) 734 e 705. CHN% Calc.  $\text{Ni}_2\text{C}_{65}\text{H}_{67}\text{N}_4\text{O}_8\text{B}$  exp(calc): C 67,2% (67,6%); H 5,8% (5,7%) N 4,8%(4,9%).  $\Lambda_{\text{M}} = 120 \text{ S.cm}^2.\text{mol}^{-1}$  em  $\text{CH}_3\text{CN}$  eletrólito 1:1.

Devido a inúmeras tentativas frustradas de se cristalizar este sistema foi optado além de se trocar o contra íon também foi trocado a ponte exógena (tetrafenil borato por perclorato e acetato por benzoato). Foi montado um sistema de cristalização por difusão utilizando acetonitrila/isopropanol e após um mês houve a formação de monocristais verdes que foram submetidos à análise de raios X.

#### 4.9 MODIFICAÇÕES NA ESTRUTURA DA $\beta$ -CICLODEXTRINA ( $\beta$ -CD)

10 g de  $\beta$ -ciclodextrina foram adicionadas em 100 mL de água destilada fervente. Após uma hora de agitação, o sistema foi deixado em repouso até a temperatura ambiente onde apareceram os primeiros cristais. Uma maior quantidade de cristais foi obtida após a solução ser resfriada no freezer. Rendimento 85%. RMN  $^{13}\text{C}$  [400MHz  $\text{D}_2\text{O}$ ],  $\delta$ ppm (C1) 60,31 (C2) 71,84 (C3) 72,12 (C4) 73,12 (C5) 81,17 (C6) 109,99.

##### 4.9.1 6-Mono(p-toluenesulfonil)- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CDTos) .( JICSINSZKY, 2001)



Esquema 1. Síntese da  $\beta$ -CDTs

Em 125 mL de água contendo 0,26 g (6,6 mmol) de hidróxido de sódio foram dissolvidos 5 g (4,4 mmol) de  $\beta$ -ciclodextrina. Nessa solução foi sendo adicionando lentamente 1 g (5,28 mmol) de cloreto de tosilato dissolvido em éter (Esquema 1). A mistura foi deixada sob agitação durante uma noite, no dia seguinte neutralizada com ácido clorídrico (pH 6-6,5) e deixada no refrigerador por mais um dia.

A solução aquosa foi removida e o sólido foi filtrado, lavado com etanol e seco a vácuo por 24 h. Rendimento: 54% RMN  $^{13}\text{C}$  [400MHz DMSO],  $\delta$ ppm (C1)19,24 (C2)60,57 (C4)72,70 (C5)73,08 (C6)73,72 (C8)82,19 (C9)102,63 (C10)126,17 (C11)128,76.

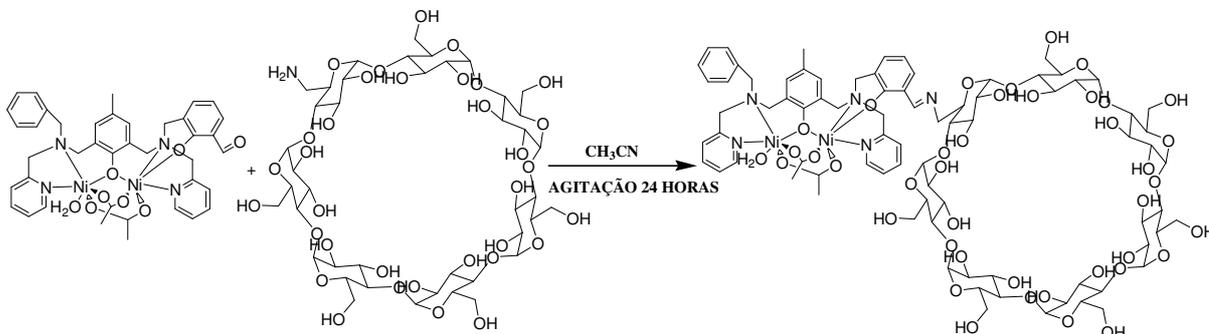
#### 4.9.2 6-Monodeoxi-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CDNH<sub>2</sub>) (CABRER, 1999)



Esquema 2. Síntese da  $\beta$ -CDNH<sub>2</sub>

1 g (0,77 mmol) de 6-Mono(p-toluenesulfonyl)- $\beta$ -ciclodextrina foi dissolvido em 25 mL de uma solução 25% de hidróxido de amônio e foi deixado a 50°C durante a noite (Esquema 2). O solvente foi evaporado a pressão reduzida, o sólido resultante foi lavado com acetona, filtrado e deixado secar no dessecador a vácuo. Rendimento de 82% RMN  $^{13}\text{C}$  [400MHz D<sub>2</sub>O],  $\delta$ ppm (C1)42,54 (C2)60,27 (C6) 72,13 (C8) 81,13 (C10)101,96.

#### 4.10 ANCORAMENTO DO COMPLEXO $\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-OAC})_2(\text{H}_2\text{O})\text{]BPH}_4$ EM $\beta$ -CICLODEXTRINA ( $\beta\text{-CDNH}_2$ )



Esquema 3. Ancoramento da  $\beta\text{-CDNH}_2$  com o complexo(1)

Em um balão de 50mL foram dissolvidos em acetonitrila 50 mg ( $4,31 \times 10^{-5}$  mols) de complexo e adicionado 200 mg ( $17 \times 10^{-5}$  mol) de ( $\beta\text{-CDNH}_2$ ), não houve solubilização total porque ( $\beta\text{-CDNH}_2$ ) não dissolve em acetonitrila, então o sistema foi deixado sob agitação por 24 horas (Esquema 3). Houve a formação de um sólido verde claro, o qual foi lavado várias vezes com acetonitrila. A solução mãe foi avolumada em um balão de 25 mL. A partir de uma alíquota dessa solução, um espectro eletrônico foi realizado. O objetivo da realização do espectro é calcular a quantidade de complexo que ficou em solução, ou seja, quanto não foi imobilizado. Foi lida a absorbância em 390 nm, através da Lei de Beer pode-se determinar a concentração do complexo em solução. O mesmo procedimento foi realizado utilizando 50 mg ( $4,31 \times 10^{-5}$  mols) de complexo e 200 mg ( $18 \times 10^{-5}$  mol) de  $\beta\text{-CD}$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$ (1)

A condutibilidade molar medida do complexo (1) em solução de acetonitrila a 25°C foi de  $120 \text{ S}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{mol}^{-1}$ , característicos de um eletrólito do 1:1 (GEARY, 1973). As porcentagens obtidas na análise de CHN foram próximas às calculadas, CHN% Calc.  $\text{Ni}_2\text{C}_{65}\text{H}_{67}\text{N}_4\text{O}_8\text{B}$  exp(calc): C 67,2% (67,6%); H 5,8% (5,7%) N 4,8%(4,9%). O espectro de IV do complexo (Figura 4) mostra bandas  $\nu_{\text{ass}}(\text{COO}^-)$  em  $1606 \text{ cm}^{-1}$  e  $\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$  em  $1479 \text{ cm}^{-1}$  com  $\Delta = 127 \text{ cm}^{-1}$  que indicam a coordenação de um grupo carboxilato formando ponte entre os centros metálicos (NAKAMOTO, 1977). A vibração do fenol terminal no ligante livre em  $1375 \text{ cm}^{-1}$  foi observada no complexo ( $1317 \text{ cm}^{-1}$ ) o que indica a não desprotonação destes grupos.

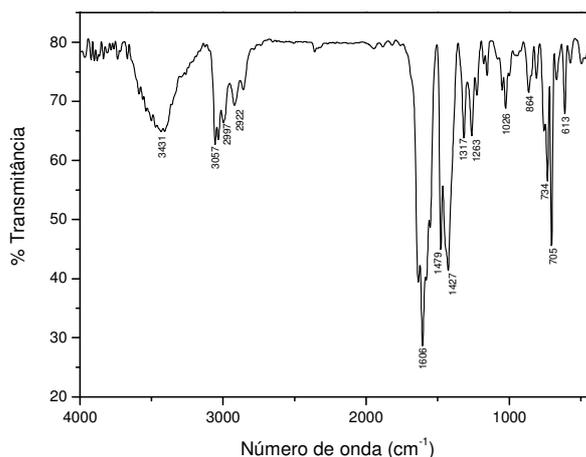


Figura 4. Espectro no infravermelho complexo  $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$

O espectro eletrônico de (1) (figura 5) medido na solução de acetonitrila exibe bandas em 308 nm ( $\epsilon = 4300 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) e 390nm ( $\epsilon = 4700 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) características de transferência de carga interna do ligante e em 604 nm ( $\epsilon = 20 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) transição d-d.

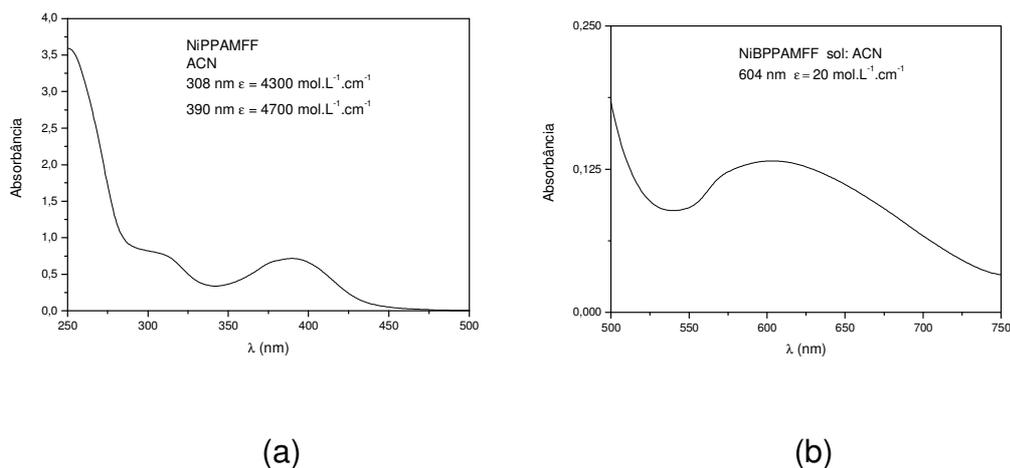


Figura 5. Espectro eletrônico complexo(1) em acetonitrila em (a) bandas de transferência de carga e em (b) transição d-d

Os voltamogramas cíclicos foram realizados em acetonitrila na faixa de potencial -2.0 a 2.0 V *versus* Ag/AgCl, eletrodo de trabalho: ouro, eletrodo de referênica: Ag/Ag<sup>+</sup>, eletrodo suporte: platina, eletrólito suporte: hexafluorofosfato de tetrabutílamônio, padrão interno: ferroceno.

No voltamograma cíclico para o complexo 1 (figura 6) duas ondas catódicas não reversíveis foram observadas – 1,27 V e em -1,64 V *versus* NHE, a 100 mV.s<sup>-1</sup>. Estes potenciais redox podem ser tentativamente atribuídos aos processos de transferência do elétron Ni<sup>II</sup>Ni<sup>II</sup>/Ni<sup>II</sup>Ni<sup>I</sup> → Ni<sup>II</sup>Ni<sup>I</sup>/Ni<sup>I</sup>Ni<sup>I</sup>. A não-reversibilidade destes processos é indicativo da instabilidade da forma total reduzida do complexo em solução.

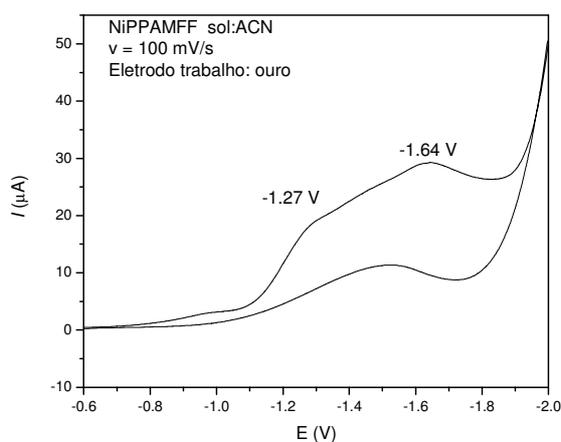
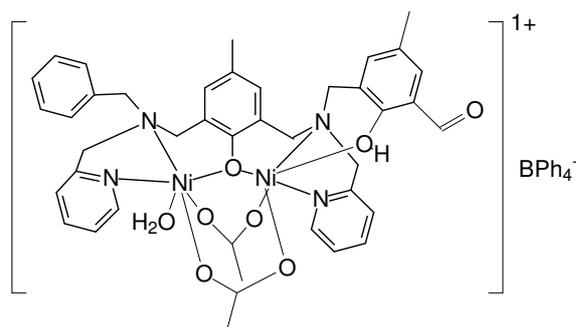


Figura 6. Voltamograma cíclico de (1) em acetonitrila (0.1 mol.L<sup>-1</sup>) com [Bu<sub>4</sub>N][PF<sub>6</sub>] (0,1 mol.L<sup>-1</sup>) como eletrólito suporte trabalhando com eletrodo de ouro padrão do ferroceno, taxa de varredura interna 100 mV.s<sup>-1</sup>

A partir das diversas técnicas utilizadas pode-se propor a estrutura do complexo (figura 7).



$\text{BPh}_4^-$  = tetrafenil borato

Figura 7. Estrutura proposta para o complexo  $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-OAc})_2(\text{H}_2\text{O})]\text{BPh}_4$

A análise dos monocristais do complexo contendo pontes benzoato revelou uma estrutura binuclear de níquel. Os átomos de níquel encontram-se coordenados pelos átomos N e O doadores do ligante e através das duas pontes benzoato. Ambos átomos de níquel se encontram hexa-coordenados (octaedro distorcido) sendo que um dos átomos encontra-se uma água coordenada fornecendo um sítio lábil. O grupo carbonila não está coordenado a nenhum centro metálico o que possibilita sua ligação com o suporte  $\beta\text{-CDNH}_2$ . Devido a este resultado da estrutura ser apenas parcial não é possível se discutir distâncias e ângulos das ligações. Todas as análises feitas indicam que o sistema com ponte acetato seja iso estrutural deste complexo com ponte benzoato.

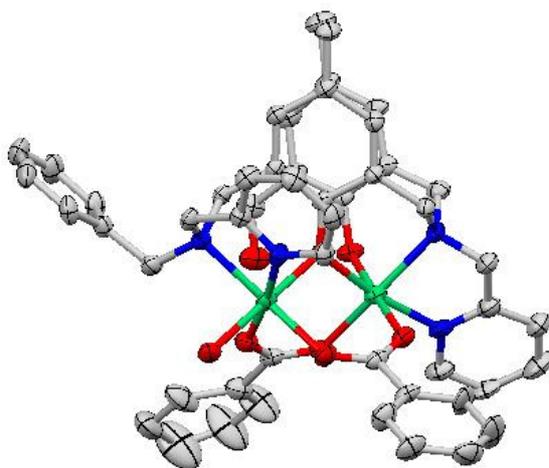


Figura 8: Estrutura parcial do cátion complexo  $[\text{Ni}_2(\text{HBPPAMFF})(\mu\text{-C}_6\text{H}_5\text{COO})_2(\text{H}_2\text{O})]$

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MODIFICAÇÕES NA $\beta$ -CICLODEXTRINA ( $\beta$ -CD)

As modificações na estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina forneceu compostos puros e com bons rendimentos. Através de comparação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -CD pura,  $\beta$ -CDTos, e da  $\beta$ -CDNH<sub>2</sub> (Figura 9) pode-se comprovar a eficácia das substituições através do aparecimento de novos picos no espectro indicando a presença de novos substituintes, além de deslocamentos de alguns carbonos devido aos efeitos causados pelas modificações. Como, por exemplo, na  $\beta$ -CDTos houve o aparecimento dos picos em 19,24 ppm, 126,17 ppm, e 128,78 ppm os quais podem ser atribuídos ao grupamento metila e ao anel benzênico respectivamente pertencentes ao do grupo tosila. Quando analisado o RMN da  $\beta$ -CDNH<sub>2</sub> há o desaparecimento desses deslocamentos e o aparecimento de um novo pico em 42,54 ppm, que caracteriza o carbono ligado ao NH<sub>2</sub>.

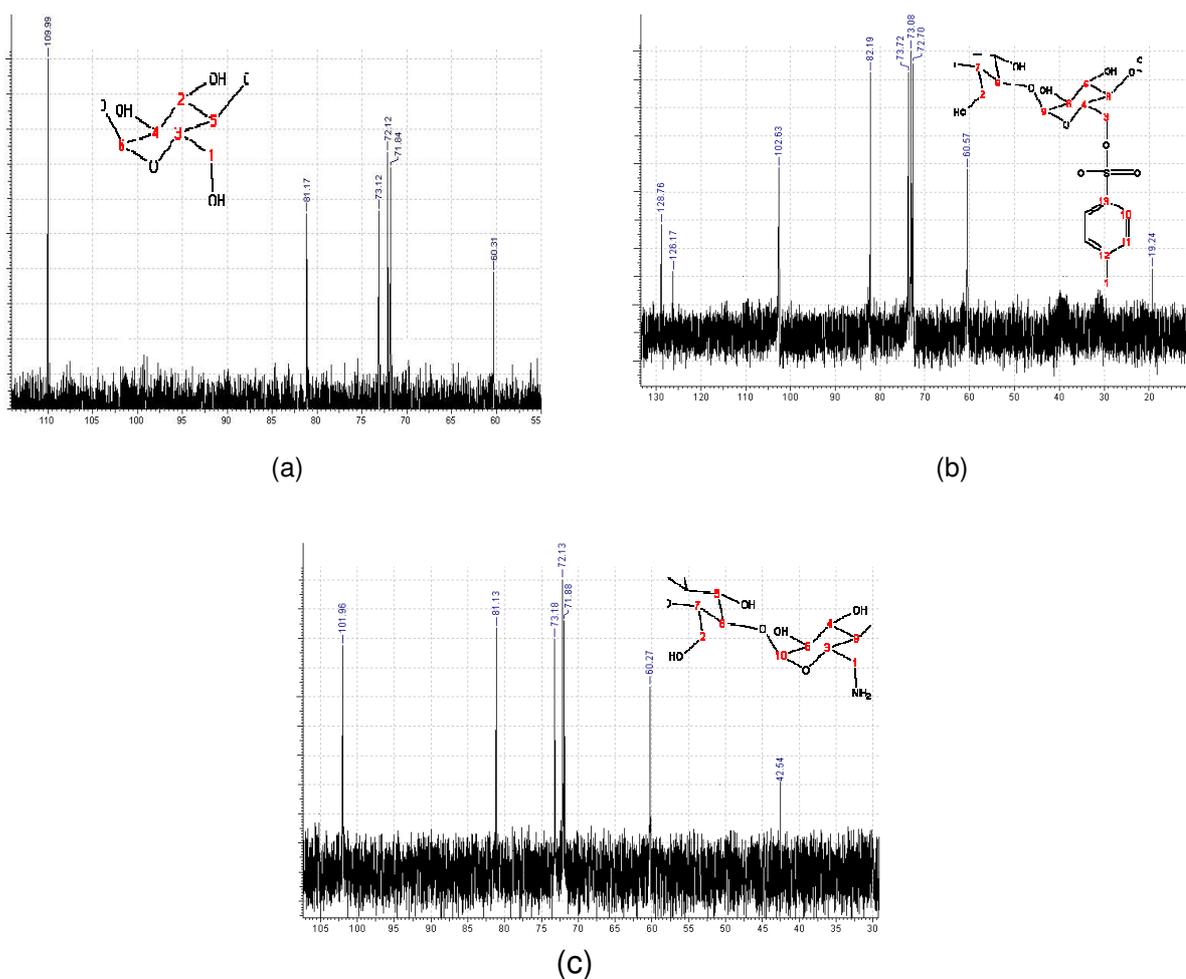


Figura 9. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (a) da  $\beta$ -ciclodextrina pura em  $\text{D}_2\text{O}$ , (b)  $\beta$ -ciclodextrina tosila em d-DMSO, (c)  $\beta$ -ciclodextrina amino em  $\text{D}_2\text{O}$ .

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SISTEMA $\beta$ -CD-COMPLEXO

Através da absorvância lida em 390 nm, banda característica do complexo (1), a concentração de complexo em solução pôde ser determinada pela Lei de Beer

$$A = \epsilon bc$$

Onde A é a absorvância lida,  $\epsilon$  a absortividade molar, b o caminho optico, e c a concentração. A absorvância lida foi de 1,1481, o caminho óptico da cubeta como descrito anteriormente é igual a 1, e o valor de absortividade molar do complexo em 390 nm é de 4700 mol.L<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. A partir destes dados obteve-se uma concentração de 2,44 x 10<sup>-4</sup> mol/L de complexo na solução mãe, como esta solução estava avolumada em um balão de 25 mL o número de mols de complexo livre na solução foi de 6,11 x 10<sup>-6</sup> mols. Sabendo que foram utilizados 50 mg (4,31 x 10<sup>-5</sup> mols) de complexo para a imobilização a diferença foi a quantidade de complexo que foi imobilizada, sendo que ficaram retidos 3,70 x 10<sup>-5</sup> mols de complexo na  $\beta$ -ciclodextrina modificada o que confere 85,8% de imobilização ou seja 1,85 x 10<sup>-4</sup> mol de complexo/g de  $\beta$ -CDNH<sub>2</sub>. Quando o complexo foi submetido a mesma condição com  $\beta$ -CD não modificada não houve imobilização.

### 5.4 ESTUDO DA REATIVIDADE DO COMPLEXO EM SOLUÇÃO E ANCORADO EM $\beta$ -CICLODEXTRINA

A atividade catalítica do complexo em solução e ancorado na clivagem do diéster de fosfato 2,4-BDNPP é fortemente influenciada pelo pH da mistura reacional. Considerando que para o complexo livre o gráfico da velocidade inicial ( $V_0$ ) *versus* o pH tem formato sigmoidal com uma taxa de variação no pH em crescimento exponencial foi optado trabalhar em pH 9 para comparar os resultados com a literatura (GREATI 2004) (Figura 10). Quando ancorado, o perfil da variação do pH apresenta-se em formato de sino e um pH ótimo igual a 9,5 é observado conforme apresentado na Figura 10. A diferença entre os dois perfis de pH pode ser explicada pela formação de diferentes espécies de complexo em solução, pois em pHs mais elevados, a presença de hidroxilas pode gerar outras pontes formando dímeros, tetrâmeros etc (GREATI 2004). Já no complexo ancorado, a  $\beta$ -

ciclodextrina, evita a formação dessas espécies, provavelmente devido a algum impedimento estérico. A diminuição da reatividade em pH maior que 9,5 se deve ao fato da inativação dos sítios de níquel pela coordenação das hidroxilas.

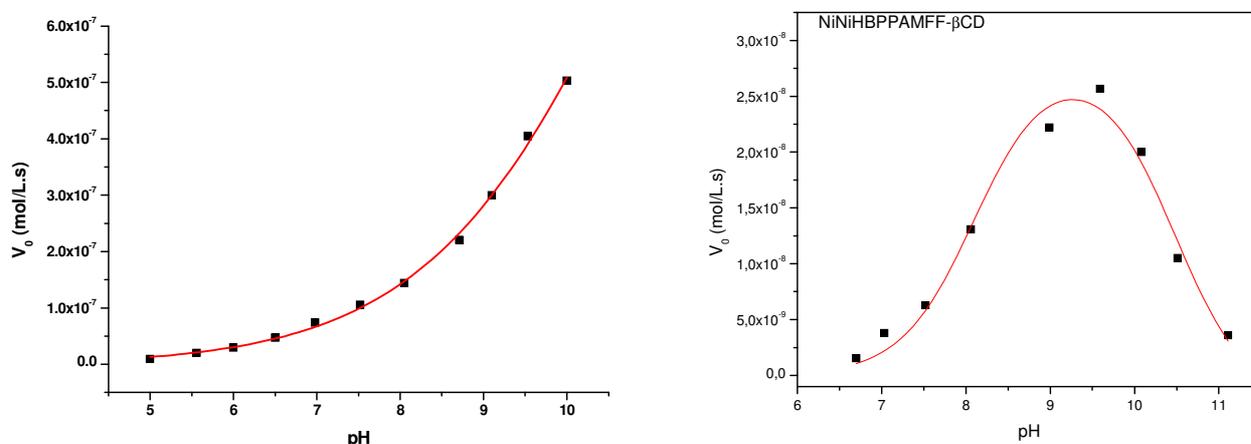
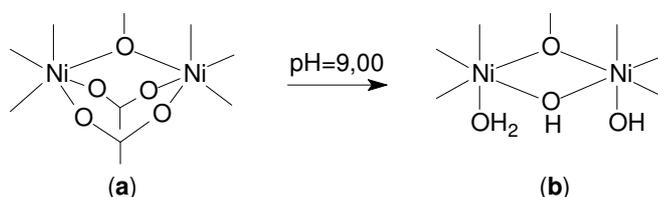


Figura 10. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP ( $v_0$ ) com o pH para o complexo em solução (a) e ancorado (b). Condições: [Complexo] =  $1,0 \times 10^{-5}$  mol. L<sup>-1</sup>; [2,4-BDNPP] =  $1,0 \times 10^{-3}$  mol. L<sup>-1</sup>; [Tampões] =  $50,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup>;  $I = 50,0 \times 10^{-3}$  mol.L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) em solução H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (50% V/V) a 25°C.

Esses resultados sugerem que a variação da velocidade na reação catalítica depende da desprotonação da molécula de água coordenada ao centro de Ni(II), que é a espécie cataliticamente ativa como sugere os análogos Ni(II)Ni(II) Esquema 4 onde (a) é a espécie presente no complexo e (b) a espécie ativa nas condições experimentais utilizadas nos experimentos cinéticos. (GREATTI, 2004, 2008; LOLOEE, 2008)



Esquema 4. Espécie cataliticamente ativa sugerida por análogos Ni(II)Ni(II) (Greatti, 2004, 2008; Loloee, 2008)

A dependências das velocidades iniciais para o complexo livre em pH 9,0, concentração de substrato (0,2-1,8 mM) e ancorado pH 9,5, revela uma cinética de saturação a qual pode se descrita pelo modelo de Michaelis–Menten (Figura 11). Como mostram os parâmetros apresentados na Tabela 2, na presença do complexo

livre em solução o 2,4-BDNPP hidrolisa 138.400 vezes mais rápido que a reação não catalisada do 2,4-BDNPP nas mesmas condições (BUNTON, 1969), e 145 vezes mais rápido que o complexo ancorado.

Em solução a cavidade das moléculas de  $\beta$ -ciclodextrina é ocupada pelo solvente,  $H_2O/CH_3CN$  (50% V/V) através de uma interação fraca e energeticamente desfavorável (interação polar-apolar), o que facilita a inclusão de moléculas menos polares que a água, nesse caso o grupo 2,4-dinitrofenolato que entra no cone e não sai, com isso, uma nova molécula não pode se aproximar, tornando cada vez mais lenta sua hidrólise.

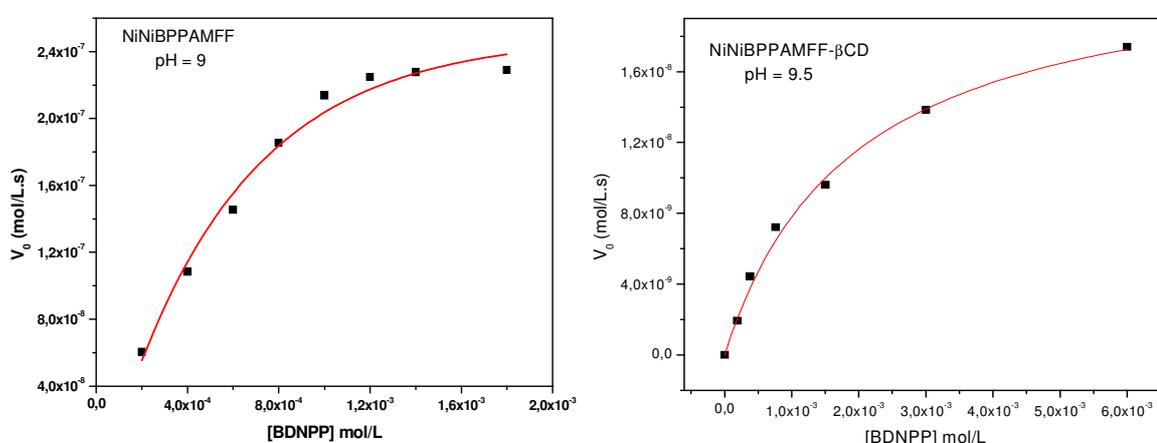


Figura 11. Dependência da velocidade de reação do 2,4-BDNPP com a concentração do substrato para o complexo livre (a) e ancorado (b). Condições: [Complexo] =  $1,0 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>; [Tampão] =  $50,0 \times 10^{-3}$  mol. L<sup>-1</sup> (CHES, pH = 9,00); I =  $50,0 \times 10^{-3}$  mol. L<sup>-1</sup> (LiClO<sub>4</sub>) em solução H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN (50% V/V) a 25 °C.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos da hidrólise do 2,4-BDNPP promovida pelo complexo livre e ancorado.

Complexo	V <sub>0</sub> (mol.L.s <sup>-1</sup> )	K <sub>M</sub> (mol/L)	K <sub>cat</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>assoc</sub> (L/mol)	E (L.s/mol)	f (k <sub>cat</sub> /k <sub>ncat</sub> )
<b>1</b>	5.37x10 <sup>-7</sup>	1.57x10 <sup>-3</sup>	5.37x10 <sup>-2</sup>	637	34.2	138.400
<b>Ancorado</b>	2,28x10 <sup>-8</sup>	1,93x10 <sup>-3</sup>	3,7x10 <sup>-4</sup>	518	0,19	950

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi sintetizado e caracterizado um novo complexo binucleares de níquel (II) empregando-se o ligante H<sub>2</sub>BPPAMFF, complexo 1 = [Ni<sub>2</sub>(HBPPAMFF)(μ-OAc)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)]BPh<sub>4</sub>], modelo para hidrolase de acordo com rotas sintéticas desenvolvidas pelo grupo de pesquisa.

Modificações estruturais foram realizadas na β-ciclodextrina para seu ancoramento com o complexo (1) que possui um grupo carbonila livre, essas modificações foram caracterizadas através de RMN <sup>13</sup>C.

A partir das modificações na β-ciclodextrina e das características do complexo (1), foram realizados estudos de ancoramento assim como os estudos de reatividade desses sistemas frente a hidrólise de ésteres fosfato. Na qual o composto imobilizado teve uma atividade catalítica menor que o composto livre em solução.

Para comprovar o mecanismo de hidrólise serão ainda feitos os estudos do efeito isotópico de deutério, pois existe a possibilidade de uma catálise básica geral e a análise da titulação potenciométrica do complexo em solução e ligado na β-CD para se determinar os *pK<sub>a</sub>* e saber qual é realmente a espécie ativa. Para tentar melhorar os resultados da reatividade frente a hidrólise de esteres de fosfato, quando o complexo esta ligado na β-CD, novas modificações na estrutura β-ciclodextrina podem ser realizadas como, por exemplo, criar um espaçador maior entre a β-CD e o complexo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. R.; COSTA, I.; ROSA, C.; FERREIRA, L. M.; LOURENÇO, A.; SANTOS, P.P.; New enantioselective method for hydration of alkenes using cyclodextrins as phase transfer catalyst. Tetrahedron, v. 61 p.11986-11990, **2005**.

AIME, S.; GIANOLIO, E.; UGGERI, F.; TAGLIAPIETRA, S.; BARGE, A.; CRAVOTTO, G.; New paramagnetic supramolecular adducts for MRI applications based on non-covalent interactions between Gd(III)-complexes and  $\beta$ - or  $\gamma$ -cyclodextrin units anchored to chitosan. Journal of Inorganic Biochemistry v. 100, p. 931-938, **2006**.

ALAGNA, L., HASNAIN, S. S., WILLIAMS, D. J. The nickel ion environment Jack bean urease. Biochemistry Journal, v. 220, p. 591-595, **1984**.

ANDRES, G. O.; SILVA, O. F.; de ROSSI, R. H.; Hydrolysis of aryl hydrogen maleate esters mediated by cyclodextrins — Effect on the intramolecular catalysis. Canadian Journal of Chemistry v. 83 p. 1281-1286, **2005**.

ARAD-YELLIN, R.; TSOUCARIS, G.; GREEN, B. S.; Reversible encapsulation of guests in modified cyclodextrins: studies with the  $\beta$ -cyclodextrin percinamate-1,7-dioxaspiro[5,5]undecane system Tetrahedron Letters.v. 42, p.1335-1337, **2001**.

ASANUMA, H.; HISHIYA, T.; KOMIYAMA, M.; Efficient Separation of Hydrophobic Molecules by Molecularly Imprinted Cyclodextrin Polymers. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 50, p. 50-51 **2004**.

BALMAS, V.; DELOGU, G.; SPOSITO, S.; RAU, D.; MIGHELI, Q.; Use of a Complexation of Tebuconazole with  $\alpha$ -Cyclodextrin for Controlling Foot and Crown Rot of Durum Wheat Incited by *Fusarium culmorum*. Journal Agricultural and Food Chemistry,v.54, p. 480-484 **2006**.

BARR, L.; DUMANSKI, P. G.; EASTON, C. J.; HARPER, J. B.; LEE, K.; LINCOLN, S. F.; MEYER, A. G.; SIMPSON, J. S.; Cyclodextrin Molecular Reactors. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 50, p. 19-24 **2004**.

BARR, L.; LINCOLN, S. F.; EASTON, C. J.; A Cyclodextrin Molecular Reactor for the Regioselective Synthesis of 1,5-disubstituted-1,2,3-triazoles. Supramolecular Chemistry, v.17, p.547-55, **2005**.

BEDIOIU, F.; Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview, Coordination Chemical Review, vol. 144, p. 39, **1995**.

BELYAKOVA, L. A.; VARVARIN, A. M.; LYASHENKO, D. Y.; KHORA, O. V.; Adsorption Science and Technology, v. 23 p. 203, **2005**.

BLAKELEY, R. L., TRESTON, A. ANDREWS, R.K., *et al.* Nickel (II) – promoted ethanolysis and hydrolysis of N - (2-pyridilmethyl) urea. A model for urease. Journal of the American Chemical Society, v.1014, p. 612-614, **1982**.

BRANDÃO, T. A. S.; DAL MAGRO, J.; CHIARADIA, L. D.; NASCIMENTO, M. Da G.; NOME, F.; TATO, J. V.; YUNES, R. A.; Catalytic and inhibitory effects of  $\beta$ -cyclodextrin on the hydrolysis of benzoic anhydride Journal of Physical Organic Chemistry, v. 17 p. 370-375, **2004**.

BRESLOW, R.; DONG, S. D.; Biomimetic Reactions Catalyzed by Cyclodextrins and Their Derivatives. Chemical Review, v.98 p.1997-2011, **1998**.

BRESLOW, R.; SCHMUCK, C.; Goodness of Fit in Complexes between Substrates and Ribonuclease Mimics: Effects on Binding, Catalytic Rate Constants, and Regiochemistry. Journal of the American Chemical Society v.118 p.6601-6605, **1996**.

BRESLOW, R.; ZHANG, B. L.; Cleavage of Phosphate Esters by a Cyclodextrin Dimer Catalyst That Binds the Substrates Together with La<sup>3+</sup> and Hydrogen Peroxide Journal of the American Chemical Society v.116 p.7893-7894, **1994**.

BUNTON, C. A., FARBER, S. J. The hydrolysis of bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate. The Journal of Organic Chemistry, v. 34, n. 4, p. 767-772, **1969**.

BURSTYN, J. N.; DEAL, K. A; Selective catalytic hydrolysis of a simple phosphodiester by a macrocyclic copper(II) complex, Inorganic Chemistry, Inorganic Chemistry, v. 32, p. 3585, **1993**.

BUSCHMANN, H. J.; SCHOLLMEYER, E.; Applications of cyclodextrins in cosmetic products: a review, International Journal Cosmetic Science, vol. 53, p.575, **2002**.

CONNORS, K. A.; The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution, Chemical Review, vol. 97, p. 1325, **1997**.

CABRER, P. R., PARRILLA, E. A., MEIJIDE, F. SEIJAS, J. A. NUÑEZ, E. R. TATO, J. V.; Complexation of Sodium Cholate and Sodium Deoxycholate by  $\beta$ -cyclodextrin and Derivatives, Langmuir, vol. 15, p. 5489-5495, **1999**.

COWAN, J. A. Chemical Nucleases, Current Opinion in Chemical Biology, v. 5, p. 634, **2001**.

DEAL K. A., BURSTYN J. N.; Mechanistic Studies of Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Phosphate Diester Hydrolysis, Inorganic Chemistry, v. 35, p. 2792, **1996**.

DIGNAM, C. F.; RANDALL, L. A.; BLACKEN, R. D.; CUNNINGHAM, P. R.; LESTER, S. K. G.; BROWN, M. J.; FRENCH, S. C.; ANIAGYEI, S. E.; WENZEL, T. J.; Carboxymethylated cyclodextrin derivatives as chiral NMR discriminating agents. Tetrahedron: Asymmetry, v.17, p.1199-1208 **2006**.

DIXON, N. E., BLAKELEY, R., L., ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A simple dry ashing procedure for the micro-determination of trace-metals in proteins -

the nickel content of urease. Canadian Journal of Biochemistry, v. 58, p. 469-473, **1980**.

DIXON, N. E., GAZZOLA, C., BLAKELEY, R. L. *et al.* Metalloenzymes. Simple biological role for nickel. Journal of the American Chemical Society, v. 97, p. 4131-4133, **1975**.

DUBEY, V.; PANDEY, L. K.; SAXENA, C.; Pervaporation of benzene/cyclohexane mixtures through supramolecule containing poly(vinyl acetal) membranes. Separation and Purification , v. 50 p. 45-50, **2006**.

EGAWA, Y.; SHIMURA, Y.; NOWATARI, Y.; AIBA, D.; JUNI, K.; Preparation of molecularly imprinted cyclodextrin microspheres. International Journal of Pharmaceutics, v. 293 p. 165-170, **2005**.

ENGELDINGER, E., ARMSPACH, D., MATT, D.; Capped Cyclodextrins, Chemical Review, vol. 103, p. 4147, **2003**.

FARRUGIA, L. J. ORTEP3 for Windows. Journal of Applied Crystallography, v. 30, p. 565, of Göttingen, Germany, **1990**.

FERREIRA, L. F. V.; LEMOS, M.; A Técnica de Reflexão Difusa Aplicada ao Estudo da Fluorescência de 2,3-Naftalimidás N-Substituídas com Grupos Alquila Incluídas em  $\beta$ -Ciclodextrina e Adsorvidas em Celulose Microcristalina, Química Nova, vol. 22, p. 522, **1999**.

FONTECAVE, M.; MENAGE S.; DUBOC-TOIA, C., Functional models of non-heme diiron enzymes, Coordination Chemical Reviews, vol. 178, p. 1555, **1998**.

GEARY W. J., The use of conductivity measurements in organic solvents for the characterisation of coordination compounds, Coordination Chemistry Reviews, v. 7, p. 81-122, **1973**.

GREATTI A., de BRITO M. A., BORTOLUZZI A. J., CECCATO A. S., Synthesis, characterization and structure of a new dinickel(II) complex as model for urease Journal of Molecular Structure v. 688 p.185–190 **2004**.

GREATTI, A. Novos complexos binucleares de níquel como modelos para o sítio ativo das ureases. 2000. 104 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, **2000**.

GREATTI, A.; NEVES, A.; SCARPELLINI, M.; PERALTA R. A.; CASELLATO, A.; BORTOLUZZI, A. J., XAVIER, F. R.; JOVITO, R.; de BRITO, M. A., SZPOGANICZ, B.; TOMKOWICZ, Z.; RAMS, M.; HAASE, W.; Synthesis, Structure, and Physicochemical Properties of Dinuclear Ni(II) Complexes as Highly Efficient Functional Models of Phosphohydrolases Inorganic. Chemistry., vol. 47, p. 1107, **2008**.

HALCROW, M., CHRISTOU, G. Biomimetic chemistry of nickel. Chemical Review, v. 94, p. 2421-2481, **1994**.

HALMA, M.; WYPYCH, F.; DRECHSEL, S. M.; NAKAGAKI, S., Synthesis, characterization and catalytic behavior of iron porphyrins immobilized in layered double hydroxides, Journal Porphyrins and Phthalocyanines, vol. 6, p. 502, **2002**.

HASNAIN, S. S., PIGGOTT, B. An EXAFS study of Jack bean urease, a nickel metalloenzyme. Biochemical Biophysical Research Communication, v. 112, p.279-283, **1983**.

HEDGES, A.; Industrial Applications of Cyclodextrins, Chemical Review, vol. 98, p. 2035, **1998**.

IRIE, T.; UEKAMA, K.; Pharmaceutical applications of cyclodextrins III: toxicological issues and safety evaluation, Journal of Pharmaceutica Science Vol. 86, p. 147, **1997**.

JABRI, E., CARR, M. B.; HAUSINGER, R. P.; KARPLUS, P. A., The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*, Science, vol. 268, p. 998, **1995**.

JICSINSZKY, L.; IVÁNYI, R.; Catalytic transfer hydrogenation of sugar derivatives, Carbohydrate Polymer, vol. 45, p.139, **2001**.

KAIM, W., SCWEDERSKI, B. Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life, New York: John Wiley & Sons, 1st edition, p. 16-23, **1994**.

KARPLUS, P. A., JABRI, E., CARR, M. B. *et al.* The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. Science, v. 268, p. 998-1004, **1995**

KHAN, A. R.; FORGO, P.; STINE, K. J.; D`Souza, V. T.; Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins, Chemical Review, vol. 98, p. 1977, **1998**.

KIMURA, E.; Dimetallic hydrolases and their models, *Current Opinion in Chemical Biology*, Current Opinion in Chemical Biology, v. 4, p. 207, **2000**.

KLEIN, C.; SCHNEIDER, R. J.; MEYER, M. T.; AGA, D. S.; Enantiomeric separation of metolachlor and its metabolites using LC–MS and CZE. Chemosphere v. 62 p.1591-1599, **2006**.

KOGA, T., FURUTACHI, H., NAKAMURA, H. *et al.* Dinuclear nickel (II) complexes of phenol-based “end – off ” compartmental ligands and their urea adducts relevant to the urease active site. Inorganic Chemistry, v. 37, p. 989-996, **1998**.

KOŁODZIEJ, A. F. The chemistry of nickel containing enzymes. In: KARLIN, K. D. *Progress in Inorganic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, v. 41, p. 493-597, **1994**.

L.J. Farrugia, ORTEP-3 for Windows, *J. Appl. Cryst.* 30 (1997) 565.

LANCASTER, J.R.; Bioinorganic Chemistry of Nickel, VCH, Weinheim, **1988**.

LI, S.; PURDY, W. C.; *Cyclodextrins and Their Applications in Analytical Chemistry*, Chemical Review, vol. 92, p.1457, **1992**.

LINDNER, K.; SAENGER, W.; Crystal and molecular structure of cyclohepta-amylose dodecahydrate, Carbohydrate Research, vol. 99, p.103, **1982**.

LIPPARD, S. J. At Last – The crystal structure of urease. Science, v. 268, p. 996-997, **1995**.

LIU C., M. WANG , T. ZHANG , H. SUN, DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes Coordination Chemistry Reviews, V. 248, p. 147, **2004**.

LIU, Y.; HORIUCHI, N.; SUEICHI, Y.; YAMAMOTO, S.; Elucidation of the Role of the Complex in Hydride Transfer Reaction between Methylene Blue and 1-Benzyl-1,4-dihydronicotinamide by Effect of  $\gamma$ -Cyclodextrin. Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 54, p. 233-239 **2006**.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E.; Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, Journal of Pharmaceutica Science, Vol. 85, p.1017, **1996**.

LOLOEE R., CHAVEZ F. A., PAWLAK P. L. ,MALKHASIAN A. Y. S.,SJLIVIC B., TIZA M. J., KUCERA B. E., Synthesis, structure, and magnetic properties of a new binuclear Ni(II) complex supported by 1,4,8-triazacycloundecane Inorganic Chemistry Communications v.11 p. 1023–1026, **2008**.

MADHAVAN, N.; ROBERT, E. C.; GIN, M. S.; A Highly Active Anion-Selective Aminocyclodextrin Ion Channel Angewandte Chemie International Edition v. 44, p.7584-7587, **2005**.

MAFFEO, D.; LEONDIADIS, L.; MAVRIDIS, I. M.; YANNAKOPOULOU, K.; Positive effect of natural and negatively charged cyclodextrins on the stabilization of penicillins towards  $\beta$ -lactamase degradation due to inclusion and external guest–host association. An NMR and MS study. Organic & Biomolecular Chemistry v.4 p. 1297-1304, **2006**.

MARINESCU, L. G.; BOLS, M.; Very High Rate Enhancement of Benzyl Alcohol Oxidation by an Artificial Enzyme. Angewandte Chemie International Edition v. 45 p. 4590-4593, **2006**.

MARINESCU, L.; MOLBACH, M.; ROUSSEAU, C.; BOLS, M.; Supramolecular Oxidation of Anilines Using Hydrogen Peroxide as Stoichiometric Oxidant. Journal of the American Chemical Society v.127 p. 17578-17579, **2005**.

MARTIN D. V., E. M; Cyclodextrins and their uses: a review, Process Biochemistry, vol. 39, p. 1033, **2004**.

MEINDERSMA, G. W.; VAN SCHOONHOVEN, T.; KUZMANOVIC, B.; de HAAN, A.B.; Extraction of toluene, *o*-xylene from heptane and benzyl alcohol from toluene with aqueous cyclodextrins. Chemical Engineering and Processing v. 45, p.175-183, **2006**.

MILOVIC, N. M.; BADJIC, J. D.; KOSTIC, N. M.; Conjugate of Palladium(II) Complex and  $\alpha$ -Cyclodextrin Acts as a Biomimetic Peptidase. Journal of the American Chemical Society v.126 p. 696-697, **2004**.

MOBLEY, H. L. T., HAUSINGER, R. P. Microbial ureases – Significance, regulation , and molecular characterization. Microbiology Review, v. 53, p. 85-108, **1989**.

MONTEIRO, J. B.; CHIARADIA, L. D.; BRANDÃO, T. A. S.; Dal Magro, J.; YUNES, R. A Enzymatic hydrolysis of diloxanide furoate in the presence of  $\beta$ -cyclodextrin and its methylated derivatives. International Journal of Pharmaceutics v. 267 p. 93-100, **2003**.

MORROW J. R., TROGLER W.C.; Hydrolisys of phosphate diester with copper(II) catalysts, Inorganic Chemistry, v. 27, p. 3387. **1988**.

NAKAMOTO K., Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. 3<sup>a</sup> Ed. New York. John Wiley & Sons, Inc. 1977, part III, p. 231-232, 242.

NELSON, D. L. and COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry, New York: Worth Publishers, 3<sup>rd</sup> ed. p. 243-272, **2000**.

NEVES A. et. all. The Catalytic Mechanisms of Binuclear Metallohydrolases. Chemical Review, v. 106, p. 3338-3363, **2006**.

NORDLANDER, E., CARSSON, H., HAUKKA, M. *et al.* Hydrolytically Active Tetranuclear Nickel Complexes with Structural Resemblance to the Actie Site of Urease. Inorganic Chemistry, v.41, p. 4981-4983, **2002**.

NRIAGU, J. O.; *Nickel in the Environment*; Wiley: New York, p. 833, **1980**.

PARIMALA S., KANDASWAMY M., Mononuclear, dinuclear nickel(II) and heterodinuclear Zn(II)Ni(II) complexes as models for the active site of phosphatase, Inorganic Chemistry Communication, v. 6, p. 1252, **2003**.

PIOVEZAN C., SILVA J.M.R., NEVES A., Manuscrito em preparação, **2009**.

PONS, M.; MILLET, O.; Dynamic NMR studies of supramolecular complexes. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy v.38 p. 267-324, **2001**.

RAMSTAD, T.; HADDEN, C. E.; MARTIN, G. E.; SPEAKER, S. M.; Teagarden, D. L.; Thamann, T. J.; Determination by NMR of the binding constant for the molecular complex between alprostadil and  $\alpha$ -cyclodextrin, Implications for a freeze-dried formulation. International Journal of Pharmaceutics, v. 296 p. 55-63, **2005**.

RAWJI G. H., YAMADA M., SADLER N. P., MILBURN R. M., Cobalt(III)-promoted hydrolysis of 4-nitrophenyl phosphate: the role of dinuclear species, Inorganica Chimica Acta, v. 303, p. 168, **2000**.

REECE, D. A.; RALPH, S. F.; WALLACE, G. G.; Metal transport studies on inherently conducting polymer membranes containing cyclodextrin dopants. Journal of Membrane Science v. 249, p. 9-20, **2005**.

ROMI, R.; LO NOSTRO, P.; BOCCI, E.; RIDI, F.; BAGLIONI, P.; Bioengineering of a Cellulosic Fabric for Insecticide Delivery via Grafted Cyclodextrin; Biotechnology Progress, v. 21, p. 1724-1730, **2005**.

ROUSSEAU, C.; ORTEGA-CABALLERO, F.; NORDSTROM, L. U.; CHRISTENSEN, B.; PETERSEN, T. E.; BOLS, M.; Artificial Glycosyl Phosphorylases. Chemistry - A European Journal, v. 11, p.5094-5101, **2005**.

SCALIA, S.; TURSILLI, R.; BIANCHI, A.; LO NOSTRO, P.; BOCCI, E.; RIDI, F.; BAGLIONI, P.; Incorporation of the sunscreen agent, octyl methoxycinnamate in a

cellulosic fabric grafted with  $\beta$ -cyclodextrin. International Journal of Pharmaceutics, v. 308 p. 155-159, **2006**.

SCHNEIDER, H.-J.; HACKET, F.; RÜDIGER, V.; IKEDA, H.; NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. Chemical Review, v.98 p. 1755-1785 **1998**.

SHELDRICK, G. M. SHELXS-97: program for the solution of crystal structures. University of Göttingen, Germany, **1997**.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C.; Biotechnological applications of cyclodextrins, Biotechnology Advances, vol. 20, p. 341, **2002**.

STELLA, V. J.; RAJEWSKI, R. A.; Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery, Pharmaceutical Research, vol. 14, p. 556, **1997**.

STRYER L. Bioquímica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 4<sup>a</sup> edição. p. 171-194, **1996**.

SUMNER, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. Journal of Biological Chemistry, v. 69, p.135-141, **1926**.

SZEJTLI, J.; Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry Chemical Review, vol. 98, p. 1743, **1998**.

TASTAN, P.; AKKAYA, E.U.; A novel cyclodextrin homodimer with dual-mode substrate binding and esterase activity, Journal of Molecular Catalysis. A: Chemical, vol. 157, p.261, **2000**.

TROGLER, W. C.; DE ROSCH, M. A.; Hydrolysis of phosphodiester with nickel(II), copper(II), zinc(II), palladium(II), and platinum(II) complexes, Inorganic Chemistry, v. 29, p. 2409, **1990**.

TSORTEKI, F.; BETHANIS, K.; PINOTIS, N.; GIASTAS, P.; MENTZAFOS, D.; Inclusion compounds of plant growth regulators in cyclodextrins. V. 4-

Chlorophenoxyacetic acid encapsulated in  $\beta$ -cyclodextrin and heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin. Acta Crystallographica Section B Structural Science, v. 61, p. 207-217, **2005**.

UGAS, H.; Bioorganic Chemistry: A Chemical Approach to Enzyme Action, New York: Springer-Verlag 3<sup>rd</sup> ed., p. 345-361; **1996**

VENTURINI C. G.; NICOLINI J.; MACHADO C.; MACHADO V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas Química Nova vol.31, n.2 p. 360-368, 2008.

VILLAVERDE J.; MORILLO, E.; PÉREZ-MARTÍNEZ, J. I.; GINÉS, J. M.; MAQUEDA C.; Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Norflurazon and  $\alpha$ -Cyclodextrin To Improve Herbicide Formulations Journal Agricultural and Food Chemistry, v.52, p. 864-869, **2004**.

VILLIERS, A.; Compte Rendus, Vol.112, p. 536, **1891**.

VOET, D. and VOET, J. G. Biochemistry. Somerset: John Wiley & Sons. Inc. p. 332-344, **1995**.

VOICESCU, M.; IONITA, G.; VASILESCU, M.; MEGHEA, A.; The Effect of Cyclodextrins on the Luminol-Hydrogen Peroxide Chemiluminescence Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, v. 54, p. 217-219 **2006**.

VOLKMER, D., HOMMERICH, B., GRIESSAR, K. *et al.* Dinuclear nickel(II) complexes as models for the active site of urease. Inorganic Chemistry, v. 35, p. 3792-3803, **1996**.

VOLKMER, D., KREBS, B., HOMMERICH, B. *et al.* Model complex for ureases: A dinickel (II) complex with a novel asymmetric ligand and comparative kinetic studies on catalytically active zinc, cobalt, and nickel complexes. Zeitschrift fuer Anorganische Allgemeine Chemie, v. 625, p. 75-82, **1999**.

WAGES, H. E., TAFT, K. L., LIPPARD, S. J. *et al.*  $[\text{Ni}_2(\text{OAc})_3(\text{urea})(\text{tmen})_2]$  (OTf) and  $[\text{Ni}(\text{OAc})(\text{urea})_2(\text{tmen})](\text{OTf})$ , model complexes for the enzyme urease. Inorganic Chemistry, v. 32, p. 4985-4987, **1993**.

WESTHEIMER F.H., Why nature chose phosphates? Science, v. 235 , p. 1173, **1987**.

WILLIAMS N.H., B. TAKASAKI, M. WALL, J. CHIN, Structure and Nuclease Activity of Simple Dinuclear Metal Complexes: Quantitative Dissection of the Role of Metal Ions Accounts of Chemical Research, v. 32, p. 485, **1999**.

XIAO, H.; CEZAr, N.; Cationic-modified cyclodextrin nanosphere/anionic polymer as flocculation/sorption systems. Journal of Colloid and Interface v. 283, p. 406-413, **2005**.

YAMAGUCHI, K., KOSHINO, S., AKAGI, F. *et al.* Structures and catalytic activities of carboxylate – bridged dinickel (II) complexes as models for the metal center of urease. Journal American of Chemical Society, v. 119, p. 5752-5753, **1997**.

YU, S.; ZHAO, Y.; WU, F.; ZHANG, X.; LÜ, W.; ZHANG, H.; ZHANG, Q.; Nasal insulin delivery in the chitosan solution:in vitro and in vivo studies . International Journal of Pharmaceutics, v. 281 p. 11-23, **2004**.

ZERNER, B. Recent advances in the chemistry of an old enzyme, urease. Bioorganic Chemistry, v. 19, p. 116-131, **1991**.

ZHANG, B.; BRESLOW, R.; Ester Hydrolysis by a Catalytic Cyclodextrin Dimer Enzyme Mimic with a Metallobipyridyl Linking Group, Journal of the American Chemical Society, vol.119, p. 1676, **1997**.

ZHOU, Y.H; ZHAO, M.; LI, J. H.; MAO, Z. W, JI. L.N.; J. MI.; Effect of cyclodextrin dimers with bipyridyl and biphenyl linking groups on carboxyl ester hydrolysis catalyzed by zinc complex, Journal of Molecular Catalysis. A: Chemical vol. 293, p. 59, **2008**.