

CÁC PHỨC CHẤT TẠO BỞI Dy^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} VỚI CAFFEIC ACID VÀ 1,10-PHENANTROLINE: TỔNG HỢP, TÍNH CHẤT VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC

Đến toà soạn 10-05-2024

Nguyễn Thị Hiền Lan*, Phạm Văn Khang, Ngô Thị Mai Việt, Đỗ Trà Hương

Khoa Hóa học, trường ĐH Sư Phạm - ĐH Thái Nguyên

**Email: lanntth.chem@tnue.edu.vn*

SUMMARY

COMPLEXES OF Dy^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} WITH CAFFEIC ACID AND 1,10-PHENANTROLINE: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

*In this paper, a multi-analytical-technique approach was utilized to investigate the property of the complexes of Dy^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} with caffeic acid (HCaf) and 1,10-phenantroline (Phen). The synthesized complexes were analyzed using FT-IR and thermal (TGA) analysis. IR spectroscopy results indicated the successful synthesis of these complexes, with three of them consist of neutral monomeric molecules. Thermal analysis demonstrated their considerable heat stability. The general molecular formula for the synthesized complexes in solid state was $Ln(Caf)_3Phen$ (Ln: Dy, Er, Yb). These results were confirmed by electrospray-ionization mass spectrometry (ESI-MS). Additionally, the antimicrobial properties of the complexes and HCaf against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were studied by measuring the diameter of the inhibitory zone. The complexes present higher antibacterial activity against bacterias compared to HCaf, likely due to the increased lipophilicity of these complexes.*

Keywords: *Lanthanides, metal complexes, antimicrobial activity, caffeic acid.*

1. MỞ ĐẦU

Axit cacboxylic tự nhiên có nhiều trong quả, hạt, lá, thân và rễ của thực vật. Cấu trúc, hoạt tính sinh học và các đặc tính độc đáo khác của chúng đã được nghiên cứu rộng rãi trong các lĩnh vực hóa sinh vô cơ, thực phẩm và dược phẩm. Các axit này có các hoạt tính chống oxy hóa, kháng khuẩn và chống ung thư [1]. Axit polyphenolic có thể được chia thành hai nhóm chính: axit hydroxybenzoic và axit hydroxycinnamic. Các axit này đều chứa một hoặc nhiều nhóm hydroxyl gắn trực tiếp vào vòng thơm. Axit caffeic (HCaf)

là một trong những axit hydroxycinnamic dồi dào nhất, có hoạt tính kháng khuẩn cao [2-5]. Tuy nhiên có rất ít thông tin về cấu trúc và tính chất của phức chất giữa caffeic với các ion kim loại, đặc biệt là với lanthanide. Sự tổng hợp và nghiên cứu tính chất các phức chất caffeinate kim loại đã được một số nghiên cứu đề cập, tuy nhiên có rất ít công trình về hoạt tính sinh học của chúng [1,6]. Các nghiên cứu về cấu trúc của phức chất rắn caffeinate với các ion kim loại kiềm (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ và Cs^+) cho thấy rằng, các kim loại đã ảnh hưởng đến cấu trúc phân tử và sự

phân bố điện tích của phối tử nên đã làm thay đổi hoạt động chống oxy hóa của chúng [7,8]. Trong dung dịch nước, sự phối trí của các cation kim loại đường như xảy ra chủ yếu bởi các nhóm hydroxyl. Tuy nhiên, sự hình thành phức chất giữa Pb(II) với HCaf trong dung dịch nước đường như xảy ra trực tiếp thông qua nhóm carboxylic [9]. Nhiều nghiên cứu khác về sự tương tác của HCaf với các cation kim loại khác nhau cũng đã được công bố [10,11], nhưng theo hiểu biết của chúng tôi, số công trình nghiên cứu về các phức được hình thành bởi hệ HCaf/lanthanide còn rất ít được nghiên cứu. Trong bài báo này, chúng tôi trình bày quá trình tổng hợp, tính chất và hoạt tính sinh học của các phức chất tạo bởi Dy^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} với hỗn hợp phối tử caffeic acid và 1,10 phenantroline.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Hóa chất

Các hóa chất tinh khiết (Merck): Caffeic acid, 1,10 phenanthroline, Dy_2O_3 , Er_2O_3 , Yb_2O_3 , HCl, C_2H_5OH ; Nước cất 2 lần.

2.2. Tổng hợp phức chất

Hòa tan phối tử caffeic acid (HCaf) trong C_2H_5OH được dung dịch HCaf 0,1M; phối tử 1,10 phenanthroline (Phen) cũng được hòa tan trong C_2H_5OH , được dung dịch Phen 0,1M. Hòa tan các Ln_2O_3 (Ln: Dy, Er, Yb) trong HCl đặc, cô cạn dung dịch, thu được muối $LnCl_3$ khan. Hòa tan muối $LnCl_3$ khan bằng nước cất 2 lần, thu được các $LnCl_3$ 0,1M. Cho từ từ dung dịch $LnCl_3$ 0,1M vào dung dịch HCaf-Phen [12]. Các chất: $LnCl_3$, HCaf, Phen, phản ứng theo tỉ lệ số mol là 1 : 3 : ; pH = 5 Sau khoảng 4h , xuất hiện chất rắn không tan (phức chất) được lọc, rửa và làm khô.

2.3. Các phương pháp nghiên cứu tính chất của phức chất

Phương pháp phổ hồng ngoại (FTIR), được thực hiện trên máy FTIR Affinity - IS, hãng SHIMADZU (Nhật), tại khoa Hóa học, trường ĐH KHTN - ĐHQG Hà Nội.

Phương pháp phân tích nhiệt, được thực hiện trên máy SETARAM (Pháp) tại khoa Hóa học, trường ĐH KHTN - ĐHQG Hà Nội.

Công thức ion phân tử và ion mảnh của các phức chất được xác định bởi phương pháp phổ khối lượng (MS), được ghi trên máy LC/MS - Xevo TQMS, hãng Water (Mỹ), tại Viện Hóa học, Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam.

Hoạt tính sinh học của các phức chất được tiến hành với 3 chủng khuẩn (Escherichia coli (E. coli), Staphylococcus Aureus (S. Aureus), Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa), tại Khoa Sinh học, Trường ĐHSP Thái Nguyên, bằng phương pháp xác định đường kính của vùng ức chế [13].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Từ kết quả phân tích phổ FTIR, giản đồ nhiệt và phổ MS của các phức chất, chúng tôi đã đề nghị công thức phân tử giả thiết của các phức chất.

3.1 Kết quả phổ hấp thụ hồng ngoại

Bảng 1 trình bày kết quả phổ IR của phối tử và ba phức chất. Dải hấp thụ mạnh ở 1640 cm^{-1} đặc trưng cho dao động của nhóm -COOH trong phổ IR của HCaf đã dịch chuyển về vùng ($1616\text{-}1620$) cm^{-1} trong phổ IR của ba phức chất. Chứng tỏ liên kết Ln^{3+} -Caf đã hình thành qua nguyên tử O của COO^- . Hiệu $\Delta\nu = \Delta\nu_{as} - \Delta\nu_s = (127\text{-}135)\text{ cm}^{-1}$ chứng tỏ kiểu phối trí vòng hai càng đã xảy ra trong các phức chất [14]. Mặt khác Trong phổ IR của Phen xuất hiện dải ở 1587 cm^{-1} được quy gán cho dao động của -CN, cũng bị dịch chuyển về ($1539\text{-}1544$) cm^{-1} trong phổ

của ba phức chất, điều này chứng tỏ đã xuất hiện liên kết Ln^{3+} -Phen qua N của Phen [15]. Như vậy, trong các phức chất đã tổng hợp, ion Ln^{3+} đã đồng thời phối trí với O của $-\text{COO}^-$ trong Caf^- và với N của Phen kiểu vòng hai càng bền vững.

Bên cạnh đó, trong phổ IR của các phức chất còn có dải ở $491 - 497 \text{ cm}^{-1}$, chứng tỏ cho sự hình thành liên kết $\text{Ln}^{3+} - \text{O}$; dải ở 3062 cm^{-1} thuộc về dao động của $-\text{OH}$ trong Caf^- .

3.2. Kết quả phân tích nhiệt

Bảng 1. Các số sóng đặc trưng trong phổ IR của các hợp chất (cm^{-1})

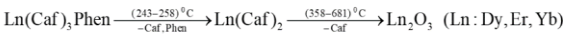
TT	Hợp chất	$\nu(\text{COOH})$	$\nu_{\text{as}}(\text{COO}^-)$	$\nu_{\text{s}}(\text{COO}^-)$	$\nu(\text{CN})$	$\nu(\text{Ln-O})$	$\nu(\text{OH})$
1	HCaf	1640		1445			3399 3217
2	Phen	-	-	-	1587		3387
3	$\text{Dy}(\text{Caf})_3\text{Phen}$	-	1620	1485	1543	497	3062
4	$\text{Er}(\text{Caf})_3\text{Phen}$	-	1612	1485	1539	495	3062
5	$\text{Yb}(\text{Caf})_3\text{Phen}$	-	1616	1483	1544	491	3062

Bảng 2. Kết quả giản đồ phân tích nhiệt của các phức chất

TT	Phức chất	Nhiệt độ ($^{\circ}\text{C}$)	Quá trình xảy ra	Phần còn lại	Khối lượng mất (%)	
					Lý thuyết	Thực nghiệm
1	$\text{Dy}(\text{Caf})_3\text{Phen}$	243	Phân hủy	$\text{Dy}(\text{Caf})_2$	40,76	42,34
		358	Phân hủy	Dy_2O_3	38,12	39,54
		539	Phân hủy		40,54	37,82
2	$\text{Er}(\text{Caf})_3\text{Phen}$	258	Phân hủy	$\text{Er}(\text{Caf})_2$	40,54	37,82
		473	Phân hủy	Er_2O_3	37,92	37,76
		681	Phân hủy			
3	$\text{Yb}(\text{Caf})_3\text{Phen}$	245	Phân hủy	$\text{Yb}(\text{Caf})_2$	40,31	42,12
		413	Phân hủy	Yb_2O_3	37,64	34,72
		534	Phân hủy			

Kết quả phân hủy nhiệt được trình bày ở bảng 2. Kết quả phân hủy nhiệt của ba phức chất cho thấy, dưới 243°C không có hiệu ứng mất khối lượng trên đường TGA, chứng tỏ trong các phức chất không có nước. Dữ liệu này hoàn toàn phù hợp với kết quả phổ IR. Trên đường TGA của ba phức chất đều xuất hiện 3 hiệu ứng mất khối lượng, hiệu ứng mất khối lượng thứ nhất ở $(243-258)^{\circ}\text{C}$ được giả thiết cho quá trình tách Phen và 1 phối tử Caf^- . Hiệu ứng mất khối lượng thứ hai ở $(358-473)^{\circ}\text{C}$ và hiệu ứng mất khối lượng thứ ba ở $(534-681)^{\circ}\text{C}$ được giả thiết cho quá trình phân hủy hoàn toàn

phức chất và tạo ra sản phẩm cuối cùng là Ln_2O_3 . Bảng 2 cho thấy, số liệu thực nghiệm tương đối phù hợp với tính toán lý thuyết. Từ đó, chúng tôi đưa ra sơ đồ phân hủy nhiệt của các phức chất đã tổng hợp như sau:

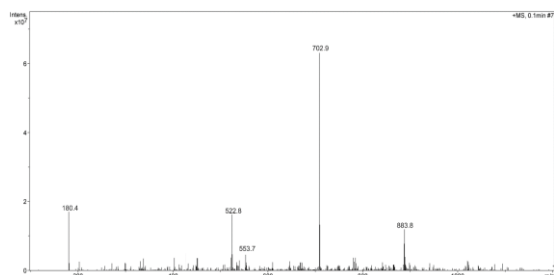


3.3. Kết quả phổ MS

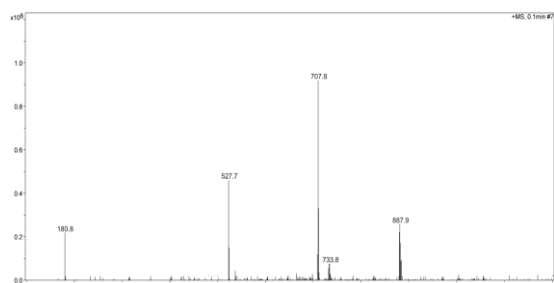
Phổ MS của 3 phức chất được trình bày trên hình 1.

Phổ MS của phức chất Dy^{3+} xuất hiện pic có m/z lớn nhất tại 883, giá trị này trùng với khối lượng của $[\text{Dy}(\text{Caf})_3(\text{Phen})]^+$,

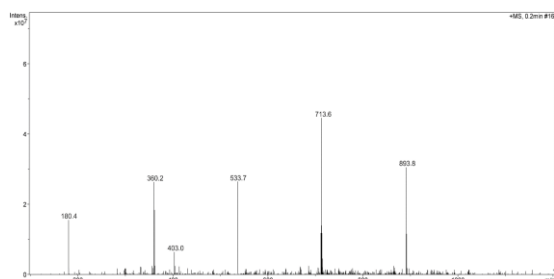
chứng tỏ $[\text{Dy}(\text{Caf})_3(\text{Phen})]^+$ là ion phân tử của phức chất Dy^{3+} . Pic có $m/z = 702$ chứng minh sự xuất hiện của ion $[\text{Dy}(\text{Caf})_3]^+$, pic này có cường độ lớn nhất, do đó đây là ion cơ bản. Ngoài ra còn xuất hiện 2 pic có m/z lần lượt là 522 và 180, các giá trị này được quy gán tương ứng cho các ion mảnh $[\text{Dy}(\text{Caf})_2]^+$ và $[\text{Phen}]^+$.



Hình 1a. Phổ MS của $\text{Dy}(\text{Caf})_3\text{Phen}$



Hình 1b. Phổ MS của $\text{Er}(\text{Caf})_3(\text{Phen})$



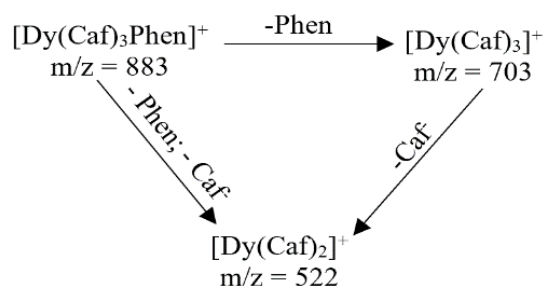
Hình 1c. Phổ MS của $\text{Yb}(\text{Caf})_3(\text{Phen})$

Phổ MS của phức chất Er^{3+} xuất hiện pic có m/z cực đại tại 887, giá trị này chứng tỏ sự có mặt của ion phân tử $[\text{Er}(\text{Caf})_3(\text{Phen})]^+$, ion cơ bản $[\text{Er}(\text{Caf})_3]^+$ tương ứng với $m/z = 707$. Hai ion mảnh $[\text{Er}(\text{Caf})_2]^+$ và $[\text{Phen}]^+$ được quy gán bởi hai pic xuất hiện ở $m/z = 527$ và $m/z = 180$ tương ứng.

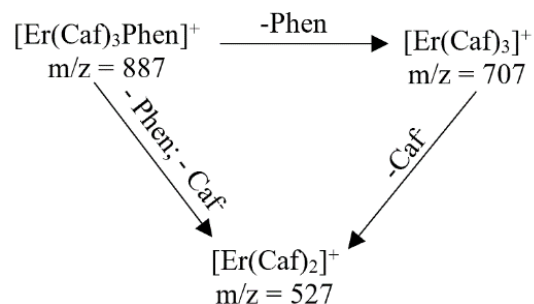
Tương tự như hai phức chất trên, phổ MS của phức chất Yb^{3+} xuất hiện chủ yếu 4

pic có $m/z = 893$; 713; 533 và 180. Các giá trị này được gán tương ứng cho sự xuất hiện của: Ion phân tử $[\text{Yb}(\text{Caf})_3(\text{Phen})]^+$ ($m/z = 893$); ion cơ bản $[\text{Yb}(\text{Caf})_3]^+$ ($m/z = 713$); 2 ion mảnh $[\text{Yb}(\text{Caf})_2]^+$ ($m/z = 533$) và $[\text{Phen}]^+$ ($m/z = 180$).

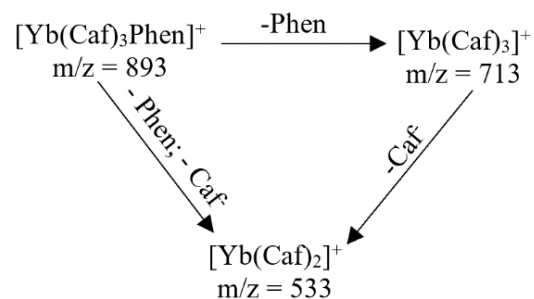
Kết quả phổ MS của 3 phức chất cho thấy thành phần pha hơi của 3 phức chất tương tự nhau, đều bao gồm sự có mặt của 1 ion phân tử, 1 ion cơ bản và 2 ion mảnh. Sơ đồ phân mảnh của các phức chất được trình bày ở hình 2.



Hình 2a. Sơ đồ phân mảnh của $\text{Dy}(\text{Caf})_3(\text{Phen})$

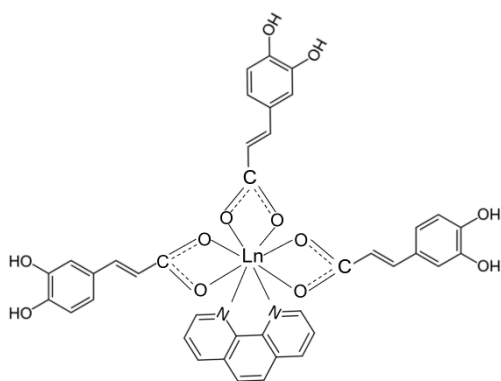


Hình 2b. Sơ đồ phân mảnh của $\text{Er}(\text{Caf})_3\text{Phen}$



Hình 2c. Sơ đồ phân mảnh của $\text{Yb}(\text{Caf})_3\text{Phen}$

Từ kết quả phổ MS của 3 phức chất, kết hợp với kết quả phổ IR và phân tích nhiệt, chúng tôi đưa ra công thức cấu tạo giả thiết của các phức chất ở hình 3.



Hình 3. Công thức cấu tạo giả thiết của $Ln(Caf)_3Phen$ (Ln: Dy, Er, Yb)

3.4. Kết quả hoạt tính sinh học

Kết quả về khả năng kháng khuẩn (xác định bởi đường kính của vùng ức chế) của các hợp chất nghiên cứu và các chất đối chiếu (HCaf, $LnCl_3$, kháng sinh Amoxilline) được trình bày trong bảng 3.

Kết quả chỉ ra rằng, các phức chất đều có hoạt tính kháng khuẩn cao đối với *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* khi so sánh với

HCaf và $LnCl_3$. Trong đó, $Dy(Caf)_3Phen$ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn cao nhất, tiếp theo là $Er(Caf)_3Phen$ và $Yb(Caf)_3Phen$. Điều này có thể được giải thích bằng lý thuyết “Chelation” của Tweedy, cho rằng khả năng thẩm thấu của tế bào phụ thuộc rất nhiều vào đặc tính “ưa chất béo” của màng tế bào, nghĩa là màng tế bào luôn cho các chất hòa tan trong lipid đi qua một cách dễ dàng [14]. Trong các phức chất đã nghiên cứu, có thể giả sử sự gia tăng tính “ưa chất béo” sau khi tạo phức, bởi thực tế là điện tích dương của ion kim loại được chia sẻ một phần với các nguyên tử cho electron của phối tử, dẫn đến sự giải tỏa electron- π trên vòng chelate. Mặt khác sự tương tác của ion kim loại hoặc phức chất với các thành phần của tế bào thông qua các con đường khác nhau cũng có thể làm thay đổi tính chất của màng tế bào, dẫn đến độc tính của muối $LnCl_3$ hoặc phức chất đắt hiếm cao hơn so với phối tử tự do [14].

Bảng 3. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn của HCaf, $LnCl_3$ và phức chất

Mẫu	Nồng độ	Đường kính vùng ức chế <i>Escherichia coli</i> (nm)	Đường kính vùng ức chế <i>Staphylococcus aureus</i> (nm)	Đường kính vùng ức chế <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (nm)
Kháng sinh Amoxilline	50mg/ml	30	23	25
HCaf	50 μ g/ml	0	0	0
	100 μ g/ml	7	8	6
	200 μ g/ml	9	10	9
$Dy(Caf)_3Phen$	50 μ g/ml	27	31	28
	100 μ g/ml	38	45	42
	200 μ g/ml	42	46	44
$DyCl_3$	200 μ g/ml	13	15	14
$Er(Caf)_3Phen$	50 μ g/ml	0	0	0
	100 μ g/ml	37	39	37
	200 μ g/ml	40	42	40
$ErCl_3$	200 μ g/ml	11	13	12
$Yb(Caf)_3Phen$	50 μ g/ml	0	0	0
	100 μ g/ml	27	30	28
	200 μ g/ml	37	38	38
$YbCl_3$	200 μ g/ml	11	12	11

4. KẾT LUẬN

Đã tổng hợp được 03 phức chất rắn của caffeic acid và 1,10 phenantroline với Dy^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+} , các phức chất ở trạng thái khan, công thức phân tử có dạng: $Ln(Caf)_3Phen$ (Ln^{3+} : Dy^{3+} , Er^{3+} , Yb^{3+}).

Trong 3 phức chất, Ln^{3+} liên kết với nguyên tử O của 3 phối tử Caf và nguyên tử N của một phối tử Phen theo kiểu phối trí vòng 2 càng với số phối trí 8. Các phức chất đều không có nước và tương đối bền nhiệt; chúng đều là các phức chất đơn nhân, có thành phần pha hơi tương tự nhau, các ion phân tử và ion mảnh tương đối bền trong điều kiện ghi phổ MS.

Ba phức chất đều có khả năng kháng 3 chủng khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* tương đối tốt, tốt hơn phối tử và ion kim loại, đồng thời tốt hơn kháng sinh Amoxilline, trong đó phức chất của Dy^{3+} kháng khuẩn tốt nhất, rồi đến phức chất của Er^{3+} và Yb^{3+} .

Lời cảm ơn: Bài báo này được tài trợ bởi đề tài KHCN cấp Bộ mã số B2023-TNA-28 do tác giả Nguyễn Thị Hiền Lan là chủ nhiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Godlewska-Zylkiewicz B., Swislocka R., Kalinowska M., Golonko A., Swiderski G., Arciszewska Z., Nalewajko-Sieliwoniuk E., Naumowicz M., Lewandowski W., (2020). Biologically Active Compounds of Plants: Structure-Related Antioxidant, Microbiological and Cytotoxic Activity of Selected Carboxylic Acids. *Materials*, **13**, 4454.
- [2] Lima V.N., Oliveira-Tintino C.D., Santos E.S., Morais L.P., Tintino S.R., Freitas T.S., Geraldo Y.S., Pereira R.L., Cruz R.P., Menezes I.R., et al, (2016). Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. *Microb. Pathog.*, **99**, 56-61.
- [3] Kyselka J., Rabiej D., Dragoun M., Kreps F., Burcová Z., Nemecková I., Smolová J., Bjelkova M., Szydłowska-Czerniak A., Schmidt S., et al., (2017). Antioxidant and antimicrobial activity of linseed lignans and phenolic acids. *Eur. Food Res. Tech.*, **243**, 1633-1644.
- [4] Kepa M., Miklasinska-Majdanik M., Wojtyczka R.D., Idzik D., Korzeniowski K., Smolen-Dzirba J., Wasik T.J., (2018). Antimicrobial Potential of Caffeic Acid against *Staphylococcus aureus*: Clinical Strains. *BioMed Res. Int.*, **2018**, 7413504.
- [5] Khan F., Bamunuarachchi N.I., Tabassum N., Kim Y.-M., (2021). Caffeic Acid and Its Derivatives: Antimicrobial Drugs toward Microbial Pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, **69**, 2979-3004.
- [6] Damasceno S., Dantas B., Ribeiro-Filho J., Antônio M., Galberto M., (2017). Chemical Properties of Caffeic and Ferulic Acids in Biological System: Implications in Cancer Therapy. A Review. *Curr. Pharm. Des.*, **23**, 3015-3023.
- [7] Swislocka R., (2013). Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV absorption, 1H and ^{13}C NMR) and theoretical (in B3LYP/6-311++G** level) studies on alkali metal salts of caffeic acid. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **100**, 21-30.
- [8] Matejczyk M., Swislocka R., Golonko A., Lewandowski W., Hawrylik E., (2018). Cytotoxic, genotoxic and antimicrobial activity of caffeic and rosmarinic acids and their lithium, sodium and potassium salts as potential anticancer compounds. *Adv. Med. Sci.*, **63**, 14-21.
- [9] Boilet, L., Cornard J.P., Lapouge C., (2005). Determination of the Chelating Site Preferentially Involved in the Complex of Lead(II) with Caffeic Acid: A Spectroscopic and Structural Study. *J. Phys. Chem. A*, **109**, 1952-1960.
- [10] De Stefano C., Foti C., Giuffrè O., Sammartano S., (2014). Acid-base and UV behavior of 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-propenoic acid (caffeic acid) and complexing ability towards different divalent metal

cations in aqueous solution. *J. Mol. Liq.*, **195**, 9-16.

[11] Zivanovic S.C., Veselinovic A.M., Mitic Z.J., Nikolic G.M., (2018). The study of the influence of Mg(II) and Ca(II) ions on caffeic acid autoxidation in weakly alkaline aqueous solution using MCR-ALS analysis of spectrophotometric data. *New J. Chem.*, **42**, 6256-6263.

[12] Na Zhao, Shu-Ping Wang, Rui-Xia Ma, Zhi-Hua Gao, Rui-Fen Wang, Jian-Jun Zhang, (2007). Synthesis, crystal structure and properties of two ternary rare earth complexes with aromatic acid and 1,10-phenanthroline. *Journal of Alloys and Compounds*, **463**, 338-342.

[13] Hadacek F., Greger H., (2000). Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and

assay choice. *Phytochemical Analysis*, **11**, 137-147.

[14] Żaneta Arciszewska, Sofia Gama, Monika Kalinowska, Grzegorz Świdorski, Renata Świsłocka, et al., (2022). Caffeic Acid/Eu (III) Complexes: Solution Equilibrium Studies, Structure Characterization and Biological Activity. *Int. J. Mol. Sci.*, **23(2)**, 888.

[15] Nguyễn Thị Hiền Lan, Ngô Thị Mai Việt, (2021). Tổng hợp, tính chất, khả năng phát quang phức chất hỗn hợp phối tử axetylsalixylat và o-phenantrolin của một số nguyên tố đất hiếm nặng. *Tạp chí Phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, **26(2)**, 1-6.

[16] Cota I., Marturano, V., Tylkowski B., (2019). Ln complexes as double faced agents: Study of antibacterial and antifungal activity. *Coord. Chem. Rev.*, **396**, 49-71.