

AUTOAGREGAÇÃO DA 5,10,15,20-TETRAKIS(4-METOXIFENIL)PORFIRINA (TMPP): ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS E ANÁLISES MULTIVARIADAS

Gustavo Braga^a, Jader L. Aparicio^a, Bruno H. Vilsinski^a, André L. Tessaro^b, Adriana P. Gerola^{a,*}, Noboru Hioka^a e Wilker Caetano^a

^aDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5.790, 87020-900 Maringá – PR, Brasil

^bUniversidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana, R. Marcílio Dias, 635, 86812-460 Apucarana – PR, Brasil

Recebido em 12/09/2013; aceito em 16/01/2014; publicado na web em 21/03/2014

SELF-AGGREGATION OF 5,10,15,20-TETRAKIS(4-METHOXYPHENYL)PORPHYRIN (TMPP): SPECTROSCOPIC STUDIES AND MULTIVARIATE ANALYZES. In this work, the spectroscopic properties of 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl)porphyrin (TMPP) in solvents of different polarities and water/ethanol mixtures were studied by electronic absorption spectroscopy and resonance light scattering associated with statistical analysis. The molar absorption coefficient and emission maximum of TMPP were dependent on solvent polarity. In the water/ethanol mixture, TMPP remained monomeric up to 25% of water, when it reaches its critical aggregation percentage. Oblique head-to-tail aggregate was found at intermediate water content (35 – 55%), while formation of a J-type aggregate was observed at higher water content (> 60%).

Keywords: photodynamic therapy; 5,10,15,20-tetrakis(4-methoxyphenyl)porphyrin; self-aggregation.

INTRODUÇÃO

As porfirinas e macrociclos análogos são moléculas biologicamente importantes, apresentando funções fundamentais no metabolismo de seres vivos. Atuam como sítios ativos em diversos processos biológicos, como na ligação e transporte de oxigênio (mioglobina e hemoglobina),¹⁻³ captura de luz no processo de fotossíntese (clorofila),^{4,5} transferência de elétrons (citocromo c)^{6,7} e reações de metil-transferases (coenzima cobalamina - vitamina B₁₂),^{8,9} além de atuarem como eficientes fotossensibilizadores (FS) em processos catalíticos e fotodinâmicos.¹⁰

As porfirinas são FS potenciais para aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD)¹¹ devido às suas características, como: afinidade e seletividade por células neoplásicas, alto rendimento do estado excitado triplete (Φ_T), alto tempo de vida do estado triplete (τ_T) e, alto rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ).¹²⁻¹⁵ O estado de agregação de moléculas fotoativas¹⁶ é fundamental na eficácia fotodinâmica do fármaco *in vitro* e *in vivo*, devido ao decréscimo de biodisponibilidade e limitação na capacidade de absorver luz de moléculas agregadas. Além do que, estudos realizados mostraram que as porfirinas monoméricas foram mais fotoativas em relação às espécies autoagregadas, com maior τ_T e maior Φ_Δ .^{17,18}

Estudos de agregação de porfirinas e compostos análogos em diferentes solventes e misturas água/solvente são realizados com frequência, para melhor compreensão do estado de agregação e propriedades das espécies autoassociadas em sistemas modelo simples de diferentes polaridades.¹⁹ A extensão da formação de monômeros é dependente da constante dielétrica do meio, como exemplo a adição de álcool a sistemas aquosos favorece a formação de monômeros pela diminuição da polaridade da mistura e aumento da constante dielétrica.²⁰

A formação de espécies agregadas pode ser caracterizada por técnicas espectroscópicas, como espectroscopia de absorção eletrônica e espalhamento de luz ressonante (RLS). A utilização da espectroscopia de absorção eletrônica deve-se ao fato de que a autoagregação leva a modificações drásticas no perfil espectral, como diminuição

da intensidade de absorção, alargamento e surgimento de bandas e elevação da linha base.^{21,22} Enquanto a intensidade do sinal de RLS é dependente do tamanho e quantidade de agregados presentes.²³⁻²⁵ Porém, em muitos casos a caracterização espectral das espécies monomérica e agregada é dificultada pela alta sobreposição espectral entre ambas as espécies. Nesse caso, análises quimiométricas multivariadas que isolam os espectros de cada espécie é uma ferramenta útil, que possibilita uma análise mais precisa dos resultados.^{26,27}

As modificações espectroscópicas observadas com a agregação de porfirinas, como o deslocamento espectral e o desdobramento de bandas são explicadas pela teoria do Exciton,²⁸ modelo mecânico-quântico que considera as interações eletrostáticas entre os momentos dipolares das unidades monoméricas. A orientação relativa dos vetores de transição das unidades monoméricas no agregado influenciam as diferenças de energia e as probabilidades de transição do estado fundamental para o estado excitado. Quando esses vetores são paralelos, têm-se dois tipos possíveis de agregados: tipo H (sandwich) e tipo J (head-to-tail). Os agregados do tipo H são observados quando o ângulo (θ) entre a direção dos momentos dipolares e a linha que une os centros moleculares aproxima-se de 90° e a transição permitida produz uma banda de maior energia (deslocamento hipsocrômico). Nos agregados do tipo J, θ aproxima-se de 0° e a transição permitida produz um deslocamento na banda de absorção para regiões de menor energia (deslocamento batocrômico). Adicionalmente, quando os vetores de momento de transição não são paralelos pode-se ter a presença simultânea de bandas H e J, nesse caso têm-se os agregados do tipo *twisted sandwich-like* e do tipo *oblique head-to-tail*. As intensidades relativas das bandas nesses agregados dependem do ângulo entre os momentos de transição das unidades monoméricas no agregado (α). Para o agregado *twisted sandwich-like* a banda H é mais intensa do que a banda J, enquanto para o *oblique head-to-tail* a banda J é mais intensa do que a banda H.²⁹

Logo, neste trabalho investigaram-se as propriedades espectroscópicas da 5,10,15,20-tetrakis(4-metoxifenil)porfirina (TMPP – Figura 1) em meio homogêneo constituído de solventes de diferentes polaridades, bem como as características espectroscópicas associadas a estratégias estatísticas para caracterização das espécies autoagregadas do FS em misturas água/etanol.

*e-mail: adrianapassarella@yahoo.com.br

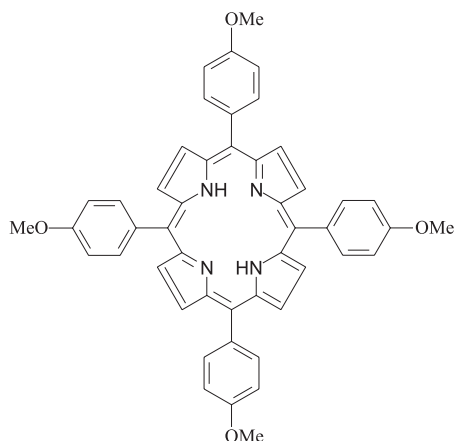


Figura 1. Fórmula estrutural da TMPP

PARTE EXPERIMENTAL

Caracterização espectroscópica da TMPP em meio homogêneo

Estudos das propriedades espectroscópicas da TMPP foram realizados em solventes de diferentes polaridades através de espectroscopia de absorção eletrônica (DU 800 Beckman Coulter). Os solventes utilizados foram diclorometano, acetona e etanol, cujas permissividades relativas (ϵ) são 8,93, 21,0 e 25,3, respectivamente.³⁰

Os espectros de absorção eletrônica foram obtidos a 25,0 °C para a TMPP nos diferentes solventes em várias concentrações ($\leq 10 \mu\text{mol L}^{-1}$) a partir de uma solução estoque de TMPP em diclorometano ($1,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Para as soluções de TMPP em acetona e etanol as mesmas foram preparadas a partir de alíquotas da solução estoque de TMPP em diclorometano, evaporadas e ressolubilizadas com o respectivo solvente. A partir dos espectros de absorção eletrônica nas diferentes concentrações, foram estimados os valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para as principais bandas de absorção utilizando a Lei de Lambert-Beer.³¹

Autoagregação da TMPP em misturas Água/Etanol

A autoagregação da TMPP ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes misturas água-etanol (v/v) foi avaliada por meio de espectroscopia de absorção eletrônica (UV-Vis) e de espalhamento de luz ressonante (RLS) ($\Delta\lambda = 0$). Todas as medidas foram realizadas a 25,0 °C. A concentração relativa das espécies monomérica e agregadas foi estimada a partir do tratamento estatístico de Análise das Componentes Principais (PCA), análise tipo-Q de Imbrie e método da matriz K. Adicionalmente, obtiveram-se os espectros isolados de cada espécie (monômeros e agregados).³²

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O espectro de absorção eletrônica da TMPP monomérica (Figura 2A) apresenta uma banda em 420 nm denominada banda Soret (ou B), referente à transição $S_0 \rightarrow S_2$, e 4 bandas Q em 518, 556, 593 e 650 nm, denominadas como Q_{IV} , Q_{III} , Q_{II} e Q_I , respectivamente, referente às transições eletrônicas do estado fundamental para o primeiro estado excitado. Todas essas bandas de absorção são originadas de transições eletrônicas do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$ entre os dois orbitais HOMO e os dois LUMO.³³

As características espectrais da TMPP em solventes de diferentes polaridades foram avaliadas utilizando-se etanol, acetona e diclorometano. Verificou-se com o aumento da polaridade do solvente um deslocamento hipsocrômico das bandas características de absorção

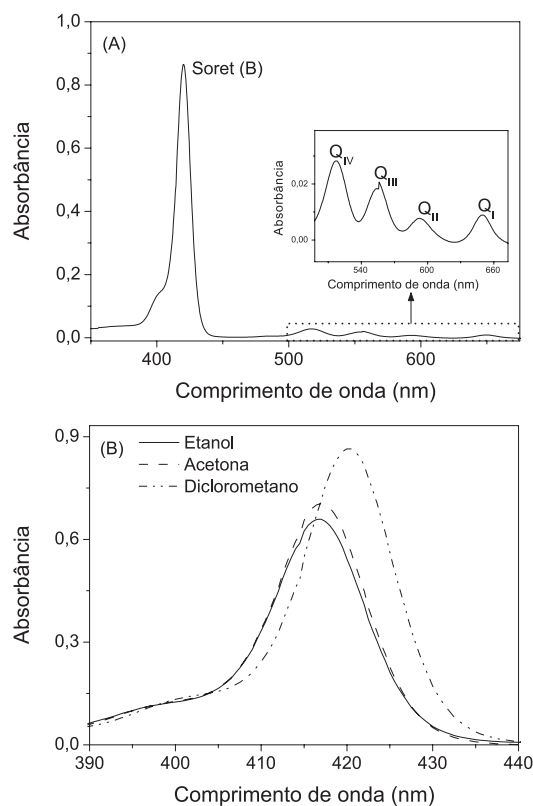


Figura 2. (A) Espectro de absorção eletrônica da TMPP ($1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diclorometano a 25,0 °C (B) Ampliação da região da banda Soret da TMPP ($1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) solubilizada em etanol, acetona e diclorometano a 25,0 °C

(Figura 2B), além do decréscimo no coeficiente de absorvidade molar na região da banda Soret (420 nm) (Tabela 1). Na região das bandas Q, por sua vez, não são verificadas mudanças significativas no perfil espectral e na intensidade de absorção com a mudança do solvente. Os valores de coeficiente de absorvidade molar das principais bandas da TMPP e seus respectivos máximos são apresentados na Tabela 1.

Autoagregação da TMPP em misturas água/etanol

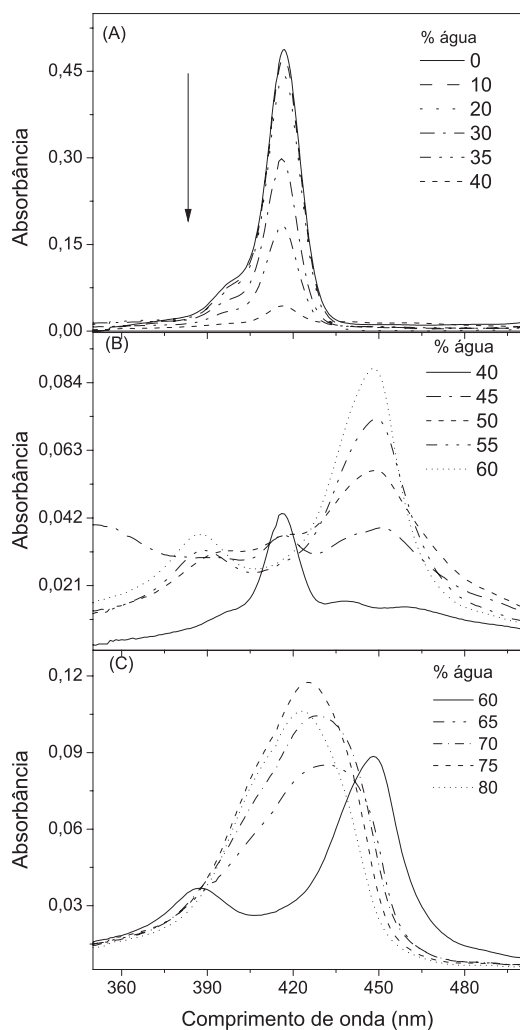
Os estudos de autoagregação da TMPP ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram realizados em diferentes porcentagens de água/etanol (Figura 3). Em misturas contendo baixo teor de água ($< 40\%$) há uma diminuição da intensidade da banda Soret ($\lambda = 417 \text{ nm}$), sem a presença de bandas adicionais (Figura 3A). Em porcentagens de água entre 45 e 60%, ocorrem mudanças mais drásticas no espectro de absorção da porfirina, caracterizada pelo desaparecimento da banda Soret e consequente aparecimento de duas bandas adicionais: uma em 448 e outra menos intensa em 388 nm (Figura 3B). Conhecidamente, mudanças espectrais como diminuição do pico relativo a monômeros, alargamento de bandas e surgimento de picos adicionais nos espectros de absorção eletrônica UV-Vis são evidências de formação de autoagregados do FS.^{21,22} A presença de duas bandas adicionais de agregados uma de maior energia (banda H) e outra de menor energia (banda J) indica que os vetores do momento de transição das unidades monoméricas nos agregados não são paralelos. Enquanto a maior intensidade da banda J em relação à banda H observada é característica de agregados do tipo *oblique head-to-tail*.²⁹

Adicionalmente, em porcentagens de água acima de 65% verificou-se o desaparecimento das bandas adicionais observadas entre 45 e 60% água/etanol (448 e 388 nm) e o aparecimento de outra banda em 424 nm (Figura 3C). Essa banda adicional apresentou um deslocamento para comprimentos de onda de menor energia em relação à

Tabela 1. Comprimento de onda de máxima absorção (λ_{\max}) e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da TMPP em diferentes solventes orgânicos a 25,0 °C

	Diclorometano		Acetona		Etanol	
	λ_{\max} (nm)	ϵ (10^3 Lmol $^{-1}$ cm $^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ (10^3 Lmol $^{-1}$ cm $^{-1}$)	λ_{\max} (nm)	ϵ (10^3 Lmol $^{-1}$ cm $^{-1}$)
Soret	420	476	417	389	417	373
Q _{IV}	518	13,9	515	13,9	515	13,6
Q _{III}	556	9,30	551	9,90	551	9,30
Q _{II}	593	4,30	592	4,30	592	4,20
Q _I	650	5,10	650	5,30	649	4,80

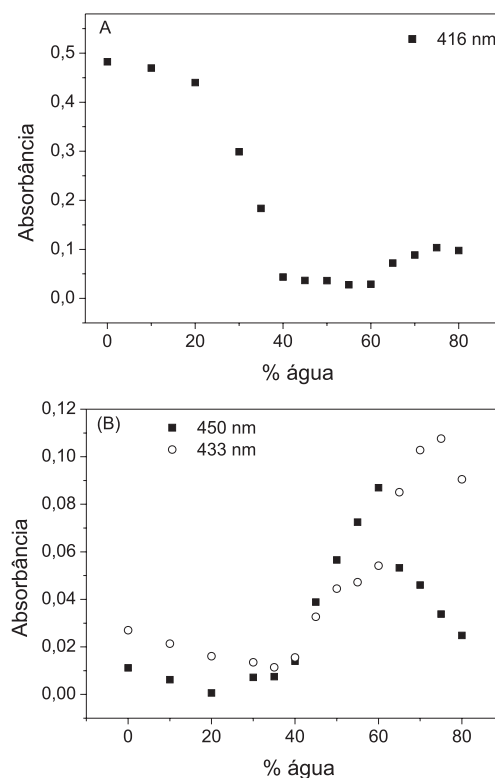
espécie monomérica, característica de agregado tipo J. Desse modo, em altos teores de água (> 65%) verificou-se a formação de agregados diferenciais em relação àqueles presentes em porcentagens de água intermediárias (45 a 60%).

**Figura 3.** Espectros de absorção eletrônica da TMPP ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes proporções água/etanol a 25,0 °C (região da banda Soret)

A partir dos espectros de absorção apresentados na Figura 3 plotou-se o gráfico de intensidade de absorvância pela porcentagem de água (Figura 4). A Figura 4A apresenta a diminuição do pico monomérico em 416 nm com o aumento do teor de água. Verificou-se uma queda brusca na intensidade de absorção dos monômeros devido à formação de espécies agregadas na solução a partir de 25% de água/etanol, na qual se tem a porcentagem de água agregacional crítica (PAAC).³⁴ O pico relativo a monômeros (416 nm) caiu a praticamente

zero em porcentagens de água em torno de 40%, mostrando a inexistência de espécies monoméricas nesse sistema. Simultaneamente a esta queda de absorvância em 416 nm verificou-se o aumento da intensidade de absorção em 433 e 450 nm (Figura 4B) referente à formação de autoagregados. Adicionalmente, em altas porcentagens de água (> 60%) observou-se uma queda na absorção do pico de 450 nm referente à espécie agregada. Concomitantemente à diminuição do sinal de absorvância em 450 nm houve um aumento no sinal de absorvância referente ao pico de 433 nm, confirmando a presença de agregados diferenciais no sistema.

Paralelamente ao aumento do sinal de absorvância em 433 nm, observado em altos teores de água (> 60%), verificou-se um aumento na intensidade de absorção em 416 nm (Figura 4A) resultante da sobreposição espectral da espécie monomérica e do agregado formado.

**Figura 4.** Intensidade de absorção em diferentes porcentagens água/etanol. (A) 416 nm; (B) 450 e 433 nm

A formação de autoagregados da TMPP em diferentes misturas água/etanol foi comprovada pelos espectros de espalhamento de luz ressonante (Figura 5). Esta técnica tem sido utilizada para obter informações a respeito de agregados grandes que espalham luz.²³⁻²⁵ A vantagem da combinação dessas duas técnicas é que enquanto o sinal da absorvância é diretamente proporcional ao coeficiente de absorvidade

molar e à concentração das espécies absorventes no meio, o sinal de RLS é proporcional ao volume do agregado e sua concentração.²³ Em etanol e 10% água/etanol não se observou espalhamento, uma vez que a TMPP está na forma monomérica, como já havia sido verificado a partir dos espectros de absorção. Entretanto, com o aumento da porcentagem de água, já a partir de 35 % é possível verificar discreto sinal de RLS na região de 440 nm (Figura 5A). Confrontando-se esse resultado com aquele obtido por absorção, pode-se inferir que nessas condições os autoagregados estão presentes. Com o aumento da porcentagem de água (35 a 65 %) verificou-se o aumento do sinal de espalhamento, devido ao aumento na quantidade e tamanho de agregados (Figura 5A). Por outro lado, com o teor de água superior a 70% verificou-se uma queda no sinal de RLS, que praticamente desaparece em 80% de água (Figura 5B e 5C). Esses resultados indicam a presença de agregados de tamanho e geometria diferenciados em altas porcentagens de água.

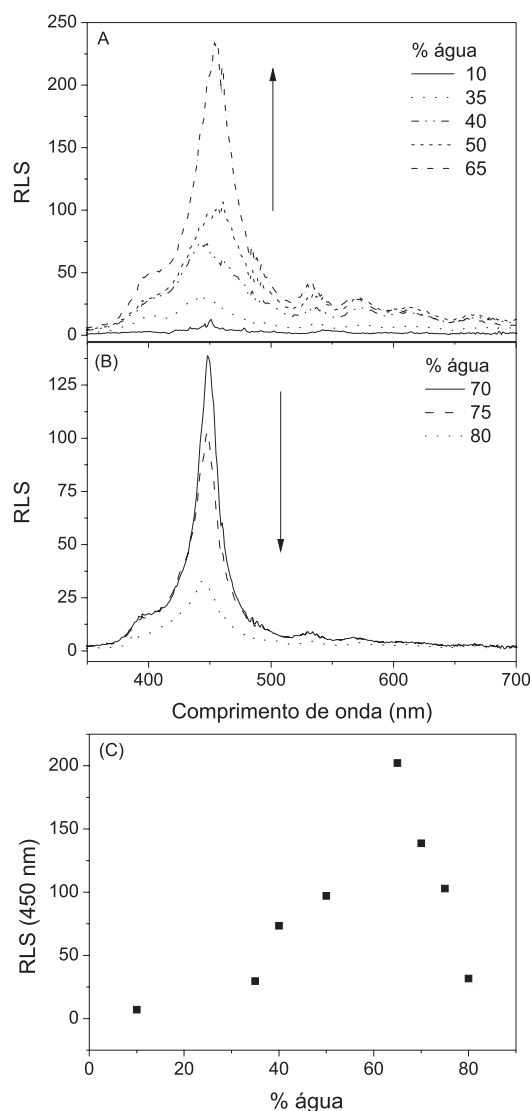


Figura 5. (A) e (B) Espectros de RLS de soluções de TMPP ($1,2 \mu\text{molL}^{-1}$) em diferentes teores água/etanol a $25,0^\circ\text{C}$; (C) Intensidade de RLS em 450 nm com a variação da porcentagem de água

Análise Quimiométrica da autoagregação da TMPP em misturas água/etanol

O processo de autoagregação da TMPP ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) em diferentes misturas água/etanol mostrou a formação de agregados diferenciais

com o aumento do teor de água. O equilíbrio entre monômeros e agregados é esquematizado abaixo:



Como pode ser observado nos espectros de absorção eletrônica da TMPP em diferentes porcentagens água/etanol (Figura 3) tem-se uma grande sobreposição das espécies (monômeros e agregados). Assim, para calcular a concentração relativa de cada uma das espécies (monômero, agregado 1 e agregado 2) utilizou-se do tratamento estatístico por métodos de Análise das Componentes Principais (PCA), análise tipo-Q de Imbrie e método da matriz K.³²

As concentrações relativas de cada espécie em diferentes porcentagens de água/etanol estimadas por quimiometria por meio da análise dos espectros eletrônicos são apresentadas na Figura 6. Verifica-se que em porcentagens de água inferiores a 30% tem-se predominantemente a TMPP na forma monomérica. Entre 35 e 55% água/etanol a espécie agregada 1 prevalece e, em porcentagens de água maiores do que 60% tem-se majoritariamente a espécie agregada 2. Esses resultados estão em concordância com os discutidos anteriormente.

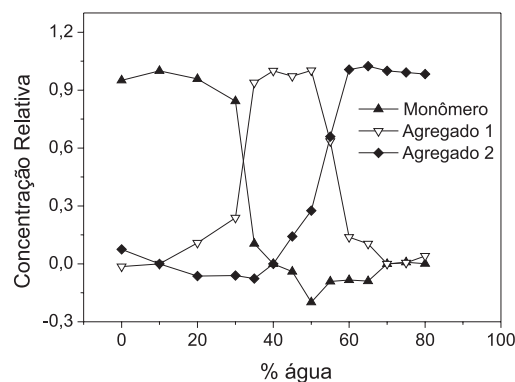


Figura 6. Concentração relativa das espécies monoméricas e agregadas da TMPP em diferentes porcentagens água/etanol

Adicionalmente, a aplicação do teste da matriz-K permitiu estimar os espectros das espécies monoméricas e agregadas puras, ilustrados na Figura 7. A análise dos espectros isolados de cada espécie, sem sobreposição espectral, facilita a discussão sobre os tipos de agregados presentes. O espectro de absorção isolado do agregado 1, mostra além do total desaparecimento do pico relativo a monômeros (418 nm), o aparecimento de duas bandas adicionais, uma em torno de 450 nm (maior intensidade) e outra em torno de 390 nm (menor intensidade). Esse fato evidencia a presença simultânea de bandas H e J, característica de agregados *oblique head-to-tail*.²⁹

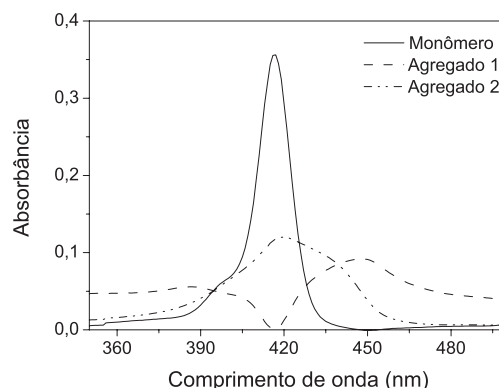


Figura 7. Espectros isolados dos monômeros e dos agregados 1 e 2 calculados com o método da matriz-K

O espectro isolado do agregado 2, presente em elevadas porcentagens de água, apresentou uma grande sobreposição espectral com a espécie monomérica. Além disso, houve um alargamento na região do vermelho, indicando a formação de agregado J. Como discutido nos estudos de RLS, em altas porcentagens de água onde se tem o agregado 2, tem-se a presença de agregados relativamente grandes e complexos.

A partir dos espectros isolados do monômero e das diferentes espécies agregadas determinou-se o coeficiente de absorvidade molar das espécies monoméricas e agregadas nos seus respectivos máximos de absorção (Tabela 2). Os valores dos coeficientes de absorvidade molar encontrados para as espécies autoagregadas foram significativamente mais baixas do que para as espécies monoméricas. Esse fato está de acordo com os apontamentos da literatura que reportam a diminuição da intensidade de absorção com a formação de espécies autoagregadas no sistema.^{20,21,33}

Tabela 2. Coeficiente de absorvidade molar (ϵ) das espécies monoméricas e agregadas nos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{\max})

	λ_{\max} (nm)	ϵ (10^3 L mol ⁻¹ cm ⁻¹)
Monômero	417	297
Agregado 1	385	46,7
	448	76,6
Agregado 2	417	100

CONCLUSÕES

As características espectrais da TMPP, como coeficiente de absorvidade molar e comprimento de onda de máxima emissão foram dependentes da polaridade do solvente. O perfil agregacional da TMPP em misturas água/etanol foi complexo, com diferentes tipos de agregados, que possuem sobreposição espectral com as espécies monoméricas. Em baixos teores de água (< 30%) a TMPP permaneceu na forma monomérica, enquanto em porcentagens de água entre 35 e 55 % tem-se a presença de agregados tipo *oblique head-to-tail*. Em altos teores de água (> 60%) tem-se a formação de outra espécie agregada, tipo J.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária (SETI/PR), CAPES/NanoBiotec e CNPq.

REFERÊNCIAS

- Perutz, M. F.; *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **1980**, *208*, 135.
- Collman, J. P.; Fu, L.; *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 455.
- Hardison, R. C.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 5675.
- Baker, N. R.; *Annu. Rev. Plant Biol.* **2008**, *59*, 89.
- Krause, G. H.; Weis, E.; *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 313.
- Salemme, F. R.; *J. Mol. Biol.* **1976**, *102*, 563.
- Poulos, T. L.; Kraut, J.; *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10322.
- Kalyanasundaram, K.; *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*, Academic Press: London, 1992.
- Shelnutt, J. A.; Song, X.; Ma, J.; Jia, S.; Jentzen, W.; Medforth, C. J.; *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 31.
- Suslick, K. S.; Rakow, N. A.; Kosal, M. E.; Chou, J. H.; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2000**, *4*, 407.
- Bonnett, R.; *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 19.
- Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K.; *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 380.
- Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q.; *JNCI, J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, *90*, 889.
- Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 801.
- Machado, A. E. *Quim. Nova* **2000**, *23*, 237.
- Macdonald, I. J.; Dougherty, T. J.; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, *5*, 105.
- Sobczyk, J.; Tønnesen, H. H.; Kristensen, S.; *Pharmazie* **2013**, *68*, 100.
- Ricchelli, F.; Gobbo, S.; Moreno, G.; Salet, C.; Brancaleon, L.; Mazzini, A.; *Eur. J. Biochem.* **1998**, *253*, 760.
- Simplicio, F. I.; Soares, R. R. S.; Maionchi, F.; Santin-Filho, O.; Hioka, N.; *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 9384.
- Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Santin-Filho, O.; Hioka, N.; *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, *17*, 325.
- Akins, D. L.; Zhu, H.; Guo, C.; *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 5420.
- Tessaro, A. L.; Batistela, V. R.; Gracetto, A. C.; de Oliveira H. P. M.; Sernaglia, R. L.; de Souza, V. R.; Caetano, W.; Hioka, N.; *J. Phys. Org. Chem.* **2011**, *24*, 155.
- Pasternack, R. F.; Schaefer, K. F.; *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 2062.
- Huang, C. Z.; Li, Y. F.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 105.
- de Paula J. C.; Robblee, J. H.; Pasternack, R. F.; *Biophys. J.* **1995**, *68*, 335.
- Antonov, L.; Gergov, G.; Petrov, V.; Kubista, M.; Nygren, J.; *Talanta* **1999**, *49*, 99.
- Gerola, A. P.; Tsubone, T. M.; Santana, A.; de Oliveira, H. P. M.; Hioka, N.; Caetano, W.; *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 7364.
- Kasha, M.; Rawls, H. R.; El-Bayoumi, M. A.; *Pure Appl. Chem.* **1965**, *11*, 371.
- Toncelli, C.; Pino-Pinto, J. P.; Sano, N.; Picchioni, F.; Broekhuis, A. A.; Nishide, H.; Moreno-Villoslada, I.; *Dyes Pigm.* **2013**, *98*, 51.
- Lide, D. R.; *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press: Boca Raton, 2005.
- Ruifrok, A. C.; Johnston, D. A.; *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **2001**, *23*, 291.
- Março, P. H.; Scarminio, I. S.; *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 138.
- Nemykin, V. N.; Hadt, R.; *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 12062.
- Gracetto, A. C.; Batistela, V. R.; Caetano, W.; Oliveira, H. P. M.; Santos, W. G.; Cavalheiro, C. C. S.; Hioka, N.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 1497.