



Eclética Química

ISSN: 0100-4670

atadorno@iq.unesp.br

Universidade Estadual Paulista Júlio de

Mesquita Filho

Brasil

Ribeiro, J. N.; Jorge, R. A.; da Silva, A. R.; Flores, A. V.; Ronchi, L. M.; Tedesco, A. C.
Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da
fotooxidação de triptofano
Eclética Química, vol. 32, núm. 1, 2007, pp. 7-14
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Araraquara, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42932101>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

 redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano

J. N. Ribeiro^{1*}, R. A. Jorge², A. R. da Silva², A. V. Flores³, L. M. Ronchi¹, A. C. Tedesco⁴

¹Laboratório de Química Médica Ambiental, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro Biomédico, Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, Vitória-ES

²Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas-SP

³Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto-SP

⁴Centro Federal de Educação Tecnológica do Espírito Santo – CETETES, Vitória-ES

*nariber@ig.com.br

Resumo: Neste trabalho investigou-se a atividade fotodinâmica de octaetilporfirina (OEP), octaetilporfirina de vanadil (VOOEP) e *meso*-tetramesitilporfirina (*m*-TMP). Este estudo foi realizado através da determinação da constante da velocidade de fotoxidação (k_f) do aminoácido triptofano (Trp). A participação do oxigênio singlete nesta fotoxidação foi determinada através da adição de azida de sódio e água deuterada no meio de reação. Os valores de $k_f/10^{-4}s^{-1}$ para a fotoxidação de Trp demonstraram que OEP ($2,80 \pm 0,05$) é mais eficiente do que *m*-TMP ($1,62 \pm 0,07$) e VOOEP ($0,81 \pm 0,08$). Os valores de k_f foram menores na presença de azida de sódio e maiores na presença de água deuterada, sugerindo que o oxigênio singlete é o responsável pela atividade fotodinâmica de OEP, VOOEP e *m*-TMP. Estes resultados sugerem também que as diferenças na atividade fotodinâmica entre as porfirinas podem ser associadas com as diferenças na estrutura molecular das mesmas. A presença do grupo vanadil (V=O) interfere claramente na atividade fotodinâmica de OEP causando considerável redução na sua eficiência.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; porfirinas; oxigênio singlete.

Introdução

A terapia fotodinâmica (PDT – do inglês Photodynamic Therapy) é uma técnica que vem sendo utilizada no tratamento do câncer, bem como em outras doenças não oncológicas [1-4], baseada na administração sistêmica de um fotossensibilizador que se acumula preferencialmente nos tecidos doentes [5], em razão da formação de complexos intravasculares entre as substâncias fotossensíveis e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) [6]. Devido à maior concentração de receptores desta lipoproteína nas células neoplásicas (em comparação com as normais), há o

acúmulo preferencial dos fotossensibilizadores sobre este tecido, de modo que a seletividade tumoral aumenta com o caráter lipofílico do agente fotossensibilizador [7,8].

O tumor é então irradiado, utilizando-se uma fonte de luz na região do vermelho ou infravermelho próximo, a fim de que a radiação penetre efetivamente no tecido neoplásico, já que emissões abaixo de 600 nm são absorvidas por cromóforos bioendogênicos e/ou espalhadas pelos tecidos, o que torna a fotoxidação apenas superficial [9]. A irradiação do tumor provoca a excitação do fotossensibilizador a um estado eletrônico de maior energia, do qual pode

retornar ao estado fundamental via processos radioativos (como fluorescência ou fosforescência) ou não radioativos (como conversão interna, cruzamento intersistema ou relaxações vibrationais). Dentre estes processos de decaimento energético, o cruzamento intersistema é fundamental para a terapia fotodinâmica (transição proibida por spin, onde o fotossensibilizador no estado eletrônico singlete excitado (S_1) sofre uma transição para o estado triplete excitado (T_1)). O fotossensibilizador no estado triplete excitado apresenta um tempo de vida maior do que no estado singlete excitado, em razão da transição $T_1 \rightarrow S_0$ ser proibida por spin. Dessa forma, o fotossensibilizador no estado T_1 pode interagir fotoquimicamente com moléculas de oxigênio, localizadas próximas à região irradiada, gerando espécies reativas que oxidam biomoléculas e danificam o tecido irradiado (Figura 1) [10-12].

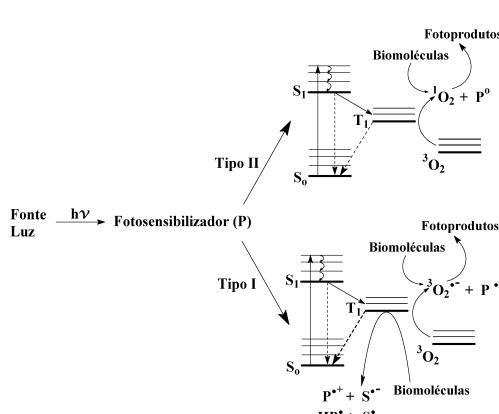


Figura 1. Mecanismos (Tipo I e II) de geração de ROS pela combinação de luz, fotossensibilizador (FTS) e oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$).

A fotodestruição dos tecidos pode ocorrer através da geração de radicais livres extremamente reativos (mecanismo tipo I) ou de oxigênio singlete (mecanismo tipo II) [13-15]. No mecanismo tipo I, o fotossensibilizador no estado excitado interage diretamente com um substrato orgânico e/ou outras moléculas vizinhas (preferencialmente O_2), produzindo radicais ou íons radicais através de reações de trans-

ferência de átomos de hidrogênio ou de elétrons [8-14]. A maioria destes radicais reage instantaneamente com o O_2 , gerando uma mistura complexa de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($\text{O}_2^\bullet -$) e hidroxila ($\cdot\text{OH}$) [14], os quais são capazes de oxidar uma variedade de biomoléculas [16].

No mecanismo tipo II obtém-se oxigênio singlete ($^1\Delta_g \text{O}_2$ ou $^1\text{O}_2$), altamente reativo, através da transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o estado triplete fundamental do oxigênio ($^3\Sigma_g^- \text{O}_2$ ou $^3\text{O}_2$). Em razão das reações de transferência de energia serem mais rápidas do que as reações de transferência de elétrons, o mecanismo tipo II é geralmente favorecido nas reações de fototoxicidade [17-20]. Como o tempo de vida do oxigênio singlete é muito curto (~ 2 μs), esta espécie reativa reage no seu sítio de formação. Isto significa que moléculas do fotossensibilizador não ligadas às células não serão fototóxicas. O oxigênio singlete, quando gerado, pode reagir com lipídeos insaturados (incluindo colesterol), aminoácidos (como o triptofano, histidina e metionina) e ácido nucléicos¹. Lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas. Portanto, as reações fotoxidativas ocasionam alterações da permeabilidade celular [10], provocando a morte do tecido tumoral via necrose ou apoptose [3,11,21].

O primeiro FTS a ser aprovado pela FDA para o tratamento de câncer através da PDT foi um derivado de hematoporfirina (Photofrin®) produzido pela QLT Inc. e atualmente vendido pela Axcan Scandipharm Inc. Outras variantes comerciais são: Photosan®, Photogem® e Photocarcinorin® [7].

Embora o Photofrin® represente um importante progresso na pesquisa de novas terapias oncológicas, principalmente devido aos pequenos efeitos colaterais, há algumas desvantagens a serem citadas como: pequena absorção na região da “janela terapêutica”, limitando sua eficiência na PDT e excreção lenta pelo organismo, resultando em uma prolongada fotossensibilidade da pele, exigindo que o paciente permaneça ao abrigo do sol por vários dias. Além disso, este fotossensibilizador é

constituído por uma mistura complexa de derivados de hematoporfirinas, de maneira que a purificação da droga não é um procedimento simples nem barato, sendo, portanto, pouco acessível economicamente (75mg de Photofrin® custam aproximadamente U\$ 2.200) [8]. Em vista disto, vários outros fotossensibilizadores têm sido investigados [8,22,23].

Alguns trabalhos têm mostrado que a retenção de fotossensibilizadores em células tumorais aumenta com a diminuição da polaridade da molécula, fato que eleva a eficiência do fotossensibilizador [24,25].

Em razão dos fatos citados acima, nós avaliamos, *in vitro*, a capacidade de 3 compostos de baixa polaridade (meso-tetramesitilporfirina (*m*-TMP), octaetilporfirina (OEP) e vanadil octaetilporfirina (VOOEP) (Figura 2) de fotoxidar triptofano (Trp) na presença de luz e oxigênio. Além disso, experimentos foram realizados para avaliar a participação do oxigênio singlete no processo fotooxidativo.

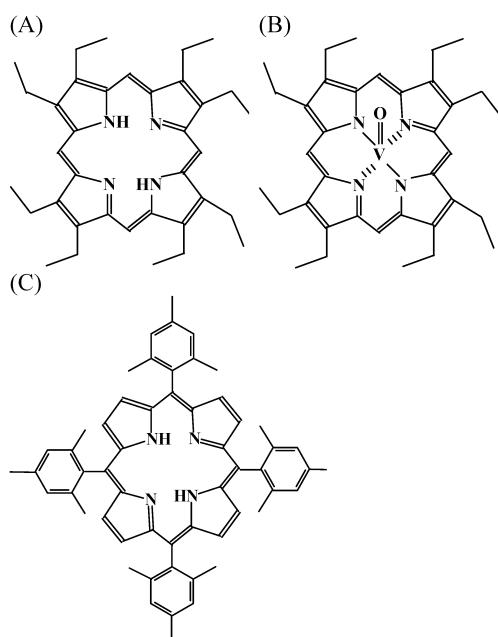


Figura 2. Estruturas de OEP (A), VOOEP (B) e *m*-TMP (C).

Material e Métodos

Material

As porfirinas *m*-TMP, OEP e VOOEP foram obtidas da Porphyrin Product, Inc. (Logan Utah, USA). O aminoácido triptofano (Trp) e o surfactante polioxietilenosorbitan monolaurato (Tween 20®) foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). O NaCl, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ e a azida de sódio (NaN₃) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). O solvente acetato de etila foi obtido da Synth (Diadema, Brasil). A água deuterada (D₂O) foi obtida da Aldrich Chemical Company, Inc (Milwaukee, USA).

Para irradiação das porfirinas foram utilizadas uma lâmpada de mercúrio Philips HPLN 80W e um filtro Oriel BG 38 para permitir a passagem de radiação na faixa de 400-600 nm. As intensidades de fluorescência de Trp foram obtidas através de um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55.

Métodos

Soluções aquosas contendo 50 μM do aminoácido Trp foram preparadas em tampão fosfato salino (PBS: 0,15 M de NaCl, 1,9 mM NaH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) contendo surfactante Tween 20®, 0,6% (m/v), acetato de etila 2% (v/v) e diferentes concentrações de OEP ou VOOEP ou *m*-TMP (0 - 10 μM). Estas soluções foram saturadas com oxigênio e irradiadas com lâmpada de mercúrio durante 60 minutos à temperatura ambiente (25 ± 2°C). As intensidades de fluorescência de Trp foram obtidas através da excitação deste aminoácido em 280 nm, sendo a emissão monitorada entre 300-500 nm. Esta fluorescência foi monitorada em intervalos de 10 minutos para se determinar a constante de velocidade de foto-oxidação (k_f) de Trp na presença de oxigênio, luz e porfirinas. A lei de velocidade integrada para a fotooxidação de triptofano pode ser escrita, considerando-se a relação linear entre a fluorescência e a concentração da biomolécula [26], conforme a equação abaixo:

$$\ln (F/F_0) = -k_f t$$

onde F₀= fluorescência inicial de Trp em 360 nm,

F = fluorescência de Trp no tempo t , k_f = constante de velocidade de foto-oxidação de Trp. A partir de um gráfico de $\ln(F/F_0)$ versus t é possível determinar o valor da constante k_f através do coeficiente angular.

Posteriormente, foram acrescentadas a estas soluções diferentes concentrações de NaN_3 ($0 - 3000 \mu\text{M}$) ou D_2O ($0 - 50\% \text{ v/v}$) para se verificar a participação do oxigênio singlete na fotooxidação do Trp por OEP, VOOEP e *m*-TMP.

Resultados e Discussão

Espécies reativas de oxigênio como o oxigênio singlete podem destruir o anel indol do Trp [6] (Figura 3). Tal evento pode ser detectado por decaimentos na intensidade de fluorescência deste aminoácido [11]. Os resultados deste trabalho demonstraram que as três porfirinas foram capazes de fotoxidar Trp, sendo OEP mais eficiente do que *m*-TMP e ambas mais eficientes do que VOOEP. Isto pode ser confirmado através do decaimento na intensidade de fluorescência de Trp, que é maior na presença de OEP (Figura 4). Os valores das constantes de velocidade de fotooxidação (Tabela 1) indicam que o OEP foi 1,7 vezes mais eficiente que o *m*-TMP, enquanto este foi 2,0 vezes mais eficiente que o VOOEP. O grupo vanadil ($V=O$) interfere na atividade de OEP, provocando uma redução considerável em sua eficácia. Este evento pode ser decorrente da natureza paramagnética de VOOEP, o que pode resultar em um menor tempo de vida no estado triplete, comprometendo a geração de espécies reativas de oxigênio. No caso de *m*-TMP, a presença de fenilas ligadas a grupos metilas no anel porfirínico também reduz a eficiência desta porfirina devido ao aumento de decaimentos não radioativos por processos roto-vibacionais [27]. No entanto, esta redução é menos acentuada do que a que ocorre com VOOEP.

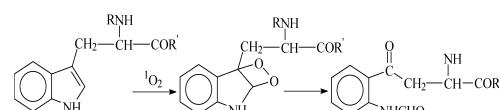


Figura 3. Mecanismo de ação do oxigênio singlete sobre o aminoácido triptofano [6].

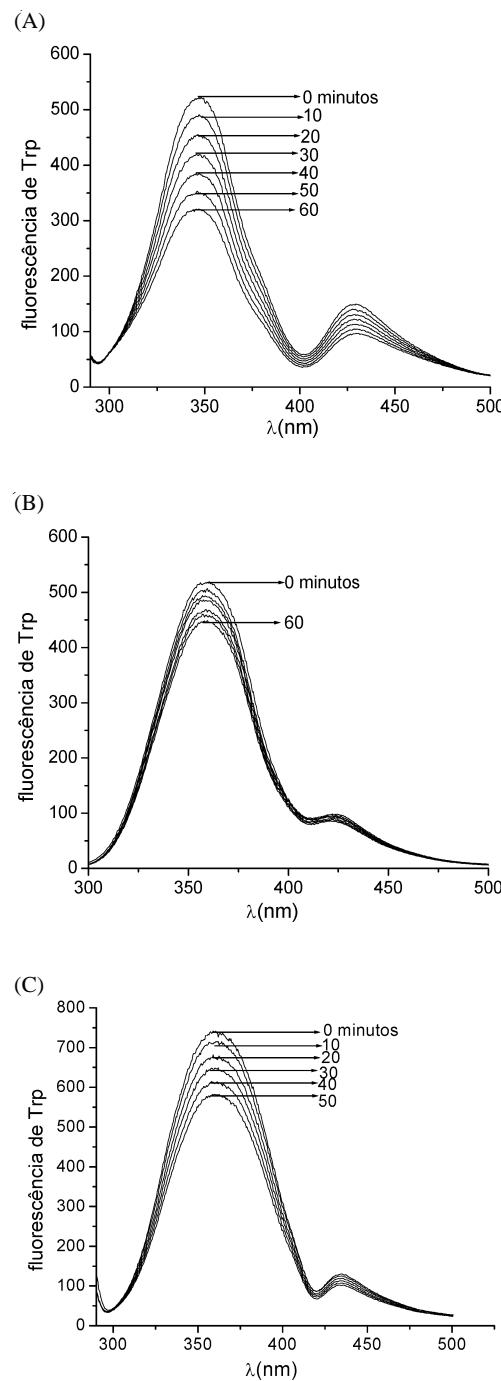


Figura 4. Decaimento na intensidade dos espectros de fluorescência de Trp na presença de $10 \mu\text{M}$ de OEP (A), VOOEP (B), *m*-TMP (C), luz e oxigênio.

Tabela 1. Valores das constantes de velocidade de foto-oxidação (k_f) de Trp na presença de 10 μM de OEP, VOOEP, m-TMP, luz e oxigênio. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

Porfirinas	k_f para Trp / 10^{-4}s^{-1}
OEP	$2,80 \pm 0,05$
VOOEP	$0,81 \pm 0,08$
m-TMP	$1,62 \pm 0,07$

Pode-se observar pela figura 5 que os valores de k_f aumentam com o aumento das concentrações das porfirinas (Figura 5). No entanto, este aumento não é linear, provavelmente devido à formação de agregados das porfirinas avaliadas. A formação de agregados provoca a diminuição do tempo de vida do fotossensibilizador no estado triplete em razão do aumento dos decaimentos não radiativos por conversão interna, tornando mais difícil a transferência de energia do fotossensibilizador do estado triplete excitado para o $^3\text{O}_2$, o que diminui a eficiência do fotossensibilizador [28, 29]. Karns et al. [29] sugeriram que a agregação das porfirinas está associada à resistência do meio aquoso em abrir cavidades para as moléculas hidrofóbicas, resultando na

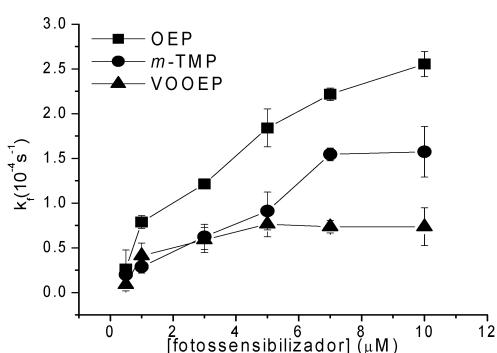


Figura 5. Valores de k_f em função das concentrações das porfirinas. Os valores representam a média de três medidas \pm desvio padrão amostral.

justaposição das superfícies hidrofóbicas para minimizar a área exposta ao meio aquoso, fato que poderia estar acontecendo neste trabalho. Entretanto, não é conveniente propor uma estrutura ou conformação do agregado das porfirinas estudadas neste sistema complexo, constituído de surfactante, tampão e solvente orgânico, sem utilizar técnicas adequadas.

Reinhard Schmidt [30] demonstrou que a água deuterada (D_2O) diminui a energia vibracional das moléculas de oxigênio, fato que causa um aumento no tempo de vida do oxigênio singlete de 10 a 26 vezes, comparado à água não deuterada (2-3 μs) [31,32]. A azida de sódio (NaN_3), ao contrário de D_2O , é um eficiente抑止剤 of oxigênio singlete [30-32]. Portanto, é esperado que a presença de D_2O no meio reacional aumente a constante de velocidade da reação de fotooxidação do triptofano, enquanto que a azida de sódio cause uma diminuição, caso o mecanismo preponderante seja do tipo II.

Os gráficos apresentados na Figura 6 demonstram que os valores de k_f referentes à fotooxidação ocasionada por OEP (A), VOOEP (B) e m-TMP (C), decrescem na presença de NaN_3 . Ao contrário, a presença de D_2O (Figura 7) provoca um aumento considerável nestes valores. Tais dados sugerem que o mecanismo predominante na fotooxidação de Trp pelas três porfirinas é do Tipo II, ou seja, com destacada participação do oxigênio singlete. No entanto, deve-se ressaltar que não apenas o mecanismo Tipo II pode estar envolvido, já que vários trabalhos têm demonstrado que a fotooxidação de biomoléculas pode ocorrer pelos dois mecanismos simultaneamente [20,32]. Segundo Ochsner [14], na presença de baixas concentrações de triptofano ($\leq 0,1 \text{ mM}$), o mecanismo do tipo II compete com o mecanismo do tipo I, mesmo em soluções altamente polares onde há o favorecimento das reações que envolvem espécies radicalares.

Do ponto de vista clínico, a participação do oxigênio singlete é preferível em Terapia Fotodinâmica devido à extrema reatividade desta espécie e ao seu tempo de vida extremamente curto, fato que evita danos aos tecidos saudáveis adjacentes ao tumor [33].

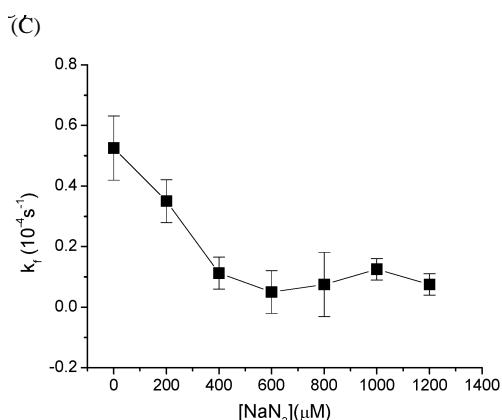
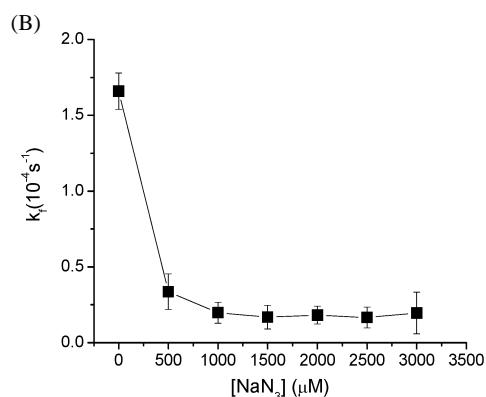
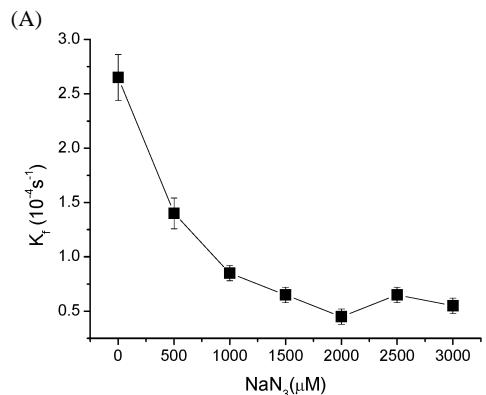


Figura 6. Influência de NaN₃ na fotoxidação de Trp mediada por 10 μM de OEP (A), VOOEP (B), *m*-TMP (C), luz e oxigênio. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.

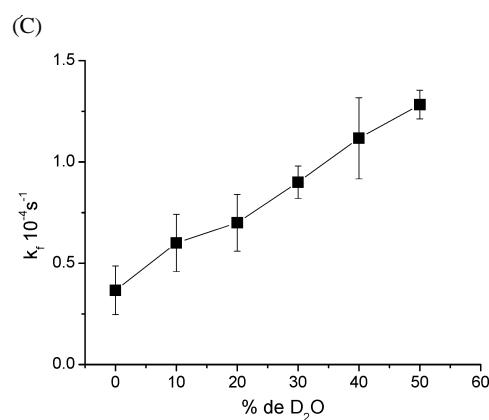
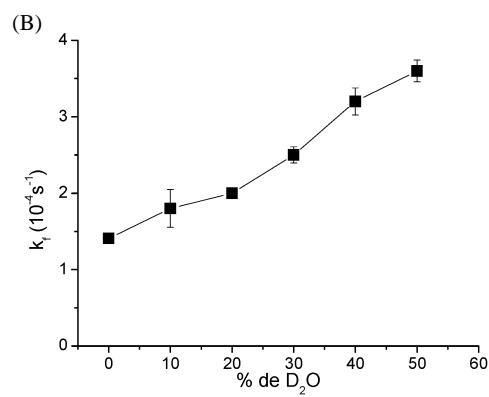
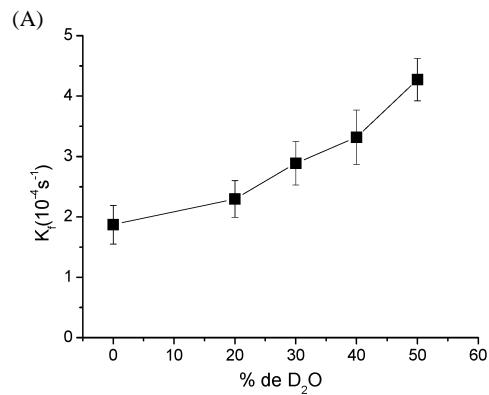


Figura 7. Influência de D₂O na fotoxidação de Trp mediada por 10 μM de OEP (A), VOOEP (B), *m*-TMP (C), luz e oxigênio. Os valores apresentados representam a média de três medidas ± desvio padrão amostral.

Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstraram que as três porfirinas são capazes de fotoxidar Trp. Além disso, os efeitos supressor e estimulador de NaN₃ e D₂O, respectivamente, na fotoxidação, sugerem que o oxigênio singlete seja a espécie reativa de oxigênio predominante neste processo. As diferenças observadas na atividade fotodinâmica das três porfirinas podem ser associadas com as diferenças em suas estruturas moleculares. O grupo vanadil (V=O) interfere na atividade de OEP, provocando uma redução con-

siderável em sua eficiência. A presença de fenilas, ligadas a grupos metilas, no anel porfirínico de *m*-TMP, também reduz a eficácia desta porfirina. No entanto, esta redução é menos acentuada do que a que ocorre com VOOEP. Portanto, os dados obtidos neste estudo estimulam a continuidade dos trabalhos com OEP e *m*-TMP, visando a futura aplicação das mesmas em Terapia Fotodinâmica.

Recebido em: 14/08/2006.

Aceito em: 17/01/2007.

J. N. Ribeiro, R. A. Jorge, A. R. da Silva, A. V. Flores, L. M. Ronchi, A. C. Tedesco. Evaluation of photodynamic activity of porphyrins for use in photodynamic therapy through tryptophan photo-oxidation.

Abstract: In this work an investigation of the photodynamic efficiency of octaethylporphyrin (OEP), vanadyl octaethylporphyrin (VOOEP), and *meso*-tetramesitylporphyrin (*m*-TMP) was done. This study was performed by the determination of photoxidation rate constants (k_f) of the tryptophan amino acid (Trp). The mechanism involved in the photoxidation of Trp was also studied using sodium azide (singlet oxygen scavenger) and deuterium oxide. The values of $k_f/10^{-4}s^{-1}$ for Trp photoxidation demonstrated that OEP (2.80 ± 0.05) is more efficient than *m*-TMP (1.62 ± 0.07) and VOOEP (0.81 ± 0.08). The values of k_f were reduced by the presence of sodium azide and increased by deuterium oxide indicating that singlet oxygen is responsible by OEP, VOOEP, and *m*-TMP photoactivity. These results indicated that differences in the photodynamic activity between porphyrins could be associated with differences in their molecular structures. The presence of vanadyl group (V=O) interferes clearly in the photodynamic activity of OEP causing a considerable reduction in its efficiency.

Keywords: photodynamic therapy; porphyrins; singlet oxygen.

Referências

- [1] E.S. Nyman, P.H. Hynninen, J. Photoch. Photobio. B 73 (2004) 28
- [2] E.F.G. Dickson, R.L. Goyan, R.H. Pottier, Cell. Mol. Biol. 48 (2003) 939
- [3] I.J. Mac Donald, T.J. Doughert, J. Porphy. Phthalocya. 5(2) (2001) 105
- [4] M.A. Calin, S.V. Parasca, J. Optoelectro. Adv. Mat. 8(3) (2006) 1173
- [5] Y.N. Konan, R. Gurny, E. Allemann, J. Photoch. Photobio. B 66 (2002) 106
- [6] S. Michels, S.U. Schmidt-Erfurth, Invest. Ophth. Vis. Sci. 44 (2003)-2154
- [7] F.I. Simplicio, F. Maionchi, N. Hioka, Quím. Nova 25 (2002) 801
- [8] L.V. Via, S.M. Magno, Curr. Med. Chem. 8 (2001) 1405
- [9] R.B. Ostler, A.D. Scully, A.G. Taylor, I.R. Gould, T.A. Smith, A. Waite, D. Phillips, Photochem. Photobiol. 71 (2000) 397
- [10] A. Gorman, J. Killoran, C. O'Shea, T. Kenna, W.M. Gallagher, D.F. O'Shea, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 10619
- [11] N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko, Photochem. Photobiol. Sci. 1 (2002) 1
- [12] C.F. Van Nostrum, Adv. Drug Deliver. Rev. 56 (2004) 9
- [13] R. Bonnett, Chem. Soc. Rev. 24 (1995) 19
- [14] M. Ochsner, J. Photoch. Photobio. B. 39 (1997) 1
- [15] C.H. Sibata, V.C. Colussi, N.L. Oleinick, T.J. Kinsella, Braz. J. Med. Biol. Res. 33 (2000) 880
- [16] J.N. Ribeiro, A.V. Flores, R. Mesquita, J.H. Nicola, E.M. Nicola, Physicae, 5 (2) (2004) 31
- [17] S.P. Songca, B. Mbatha, J. Pharm. Pharmacol. 52 (2000) 1361

- [18] E. Zenkevich, E. Sagun, V. Knyuksho, S.P. Shulga, A. Mironov, O. Efremova, R. Bonnett, S.P. Songca, M. Kassem, J. Photoch. Photobio. B 33 (1996) 171
- [19] L. Howe, J.Z. Zhang, Photochem. Photobiol. 67 (1998) 90
- [20] L.I. Grossweiner, A.S. Patel, J.B. Grossweiner, Photochem. Photobiol. 36 (1982) 159
- [21] J.N. Ribeiro, A.R. Silva, R.A. Jorge, J. Bras. Patol. Med. Lab. 40(6) (2004) 385
- [22] J.C. Lai, P.C. Lo, D.K.P. Ng, W.H. Ko, S.C.H. Leung, K.P. Fung, W.P. Fong, Cancer Biol. Therapy 5 (4) (2006) 413
- [23] N.E. Stavropoulos, A. Kim, U.U. Nseyo, I. Tsimaris, T.D. Chung, T.A. Miller, M. Redlak, U.O. Nseyo, D. Skalkos, Photochem. Photobiol. B-Biol. 84 (1) (2006) 64
- [24]. D. Kessel, Photodynamic therapy of neoplastic disease, CRC Press, London, 1999.
- [25] K. Berg, H. Anhot, J. Moan, A. Ronnestad, C. Rimington, J. Photoch. Photobio. B 20 (1993) 37
- [26]. André Romero da Silva, Dissertação de mestrado “Análise das Propriedades Fotossensibilizantes do In(III)-mesotetrafenilporfírina para uso em Terapia Fotodinâmica”, Instituto de Química, UNICAMP, 2003]
- [27]. Falk, J. E.; (1964); Porphyrins and Metalloporphyrins; Elsevier; Vol 2; 1st Edition; p. 72-93.
- [28] G.A. Karns, W.A. Gallagher, W.B. Elliott, Bioorg. Chem. 8 (1979) 69
- [29] R. Rotomskis, S. Bagdonas, G. Streckyte, J. Photochem. Photobiol. B. 33 (1996) 61
- [30] R. Schmidt; J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 6983
- [31] C. Sconfienza, A.V Vorst, G. Jori, Photochem. Photobiol. 31 (1979) 351
- [32] K. Inoue, T. Matsuura, I. Saito, Bull. Chem. Soc. Jpn. 55 (1982) 2959
- [33] A.E.H. Machado, Quím. Nova 23(2) (2000) 237