



solubilização, prevenção da agregação e manutenção das propriedades fotofísicas dos compostos hidrofóbicos.<sup>9</sup>

Possíveis fotossensibilizadores para a terapia fotodinâmica podem ser testados no laboratório de forma simples, avaliando-se a atividade sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. Esse é utilizado em ensaios biológicos por apresentar resultados rápidos, não exigir técnicas assépticas e ser de baixo custo, podendo ser encontrado facilmente no comércio.<sup>14-16</sup> Proposto por Michael e colaboradores,<sup>17</sup> o bioensaio é amplamente utilizado correlacionando estudos em microcrustáceos com atividade biológicas, tais como toxinas fitoquímicas,<sup>18-20</sup> toxinas fúngicas,<sup>21</sup> atividade antitumoral<sup>22</sup> e antimicrobiana.<sup>23</sup>

Em várias linhas de pesquisa, a utilização de ferramentas estatísticas no planejamento experimental e otimização de processos está bastante difundida.<sup>24-26</sup> A aplicação da quimiometria permite respostas mais rápidas através de um número menor de experimentos, extraindo dados e informações, considerando vários parâmetros experimentais. O planejamento fatorial, por exemplo, permite estudar a correlação entre as variáveis de interesse de uma forma simplificada. Investigações em dois níveis utilizando-se da combinação de  $k$  fatores, geram  $2^k$  experimentos, sendo que estes fatores podem ser tanto qualitativos, quanto quantitativos.<sup>27</sup>

Assim, neste trabalho, utilizaram-se os surfactantes poliméricos F-127 e P-123 (Figura 1B) para formulação da Pheo na forma monomérica e aplicação dos formulados resultantes sobre o microcrustáceo *Artemia salina*. Os efeitos referentes aos fatores que influenciam a mortalidade da *Artemia salina* utilizando-se a TFD (concentração de Pheo, % de surfactante e tempo de iluminação) foram quantificados a partir de planejamento fatorial  $2^3$ .

## PARTE EXPERIMENTAL

### Preparação da Pheo

A Pheo foi obtida pela desmetalização da clorofila (Mg-Chl) com a adição de pequenas alíquotas de HCl 2 mol L<sup>-1</sup> em uma solução etanólica de Mg-Chl. A clorofila foi extraída de espinafre, seguindo-se metodologia da literatura.<sup>28</sup>

### Formulação da Pheo em sistemas micelares de F-127 e P-123

As soluções de surfactantes F-127 (MM = 12600 g mol<sup>-1</sup>, cmc = 0,01%, m/v) e P-123 (MM = 5800 g mol<sup>-1</sup>, cmc = 0,03%, m/v)<sup>11</sup> foram preparadas nas concentrações de 0,1; 0,2 e 1,0% (m/v), muito acima da cmc, a partir das quais se investigou a monomerização da feofitina decorrente da interação com a micela. Variou-se a concentração de FS de 1,00 x 10<sup>-6</sup> a 5,00 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>, mantendo-se constante a concentração de surfactante. Os estudos foram conduzidos por espectrofotometria UV-Vis (espectrofotômetro Varian, modelo Cary 50). Todos os experimentos foram realizados a 30,0 °C.

### Cinéticas de incorporação da Pheo em micelas de P-123

Investigou-se a cinética de incorporação da Pheo (4,42 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) em P-123 (0,2%, m/v) no comprimento de onda de 667 nm, registrando-se a sobreposição espectral, a 30,0 °C com o tempo. As cinéticas de incorporação foram ajustadas pelo modelo exponencial de primeira ordem com duas etapas consecutivas:

$$y = y_0 + A_1 e^{k_1 t} + A_2 e^{k_2 t}$$

onde  $A_1$  e  $A_2$  são as amplitudes de absorção na primeira e na segunda etapa, respectivamente, enquanto  $k_1$  e  $k_2$  são as constantes de velocidade de incorporação de suas respectivas etapas.

## Ensaios sobre *Artemia salina*

Para a verificação da atividade fotodinâmica da Pheo, o teste com *Artemia salina*<sup>29</sup> foi adaptado para TFD. Os ovos do microcrustáceo foram deixados em água salina (NaCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>), a temperatura de aproximadamente 25 °C num recipiente retangular, constituído por duas partes interligadas (uma iluminada e outra mantida no escuro). Os ovos foram adicionados na parte protegida da luz. O outro lado, iluminado com lâmpada branca de 9 W (AG 6400 K Branca), foi utilizado para atrair as artemias.

Após 48 h, transferiram-se cerca de 20 larvas com água salina para cada tubo de ensaio, utilizando uma pipeta do tipo Pasteur. Posteriormente, adicionaram-se quantidades conhecidas de formulados de Pheo em P-123 para obter as concentrações desejadas em um volume total de 3 mL. Para avaliação da ação fotodinâmica realizou-se a iluminação com sistema de LED (emissão na região de 600-700 nm, potência de 5 mW), com máximo em 663 nm, sem incubação prévia. Ensaios controles foram realizados para analisar a toxicidade do surfactante e da luz sobre a *Artemia salina*. A contagem dos microcrustáceos vivos e mortos em cada tubo foi feita 1 h após a finalização da iluminação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados estão apresentados em termos de porcentagem de morte, cujos valores estão corrigidos pela morte natural. A fim de verificar a influência das variáveis experimentais sobre a morte dos microcrustáceos, trabalhou-se com o planejamento fatorial  $2^3$ . Avaliaram-se os efeitos das variáveis concentração de Pheo ([Pheo]), porcentagem de P-123 (%P) e o tempo de iluminação (t) em dois níveis. Utilizaram-se 1,0 x 10<sup>-6</sup> (-) e 2,0 x 10<sup>-6</sup> (+) mol L<sup>-1</sup> como concentração de feofitina inferior e superior, respectivamente. A porcentagem de P-123 foi de 0,1 (-) e 0,2 (+) %. O tempo de iluminação foi de 1 (-) e 2 (+) h. O cálculo dos efeitos foi realizado com o auxílio do programa Stat-ease (Design-expert® 6.0.6 Trial).

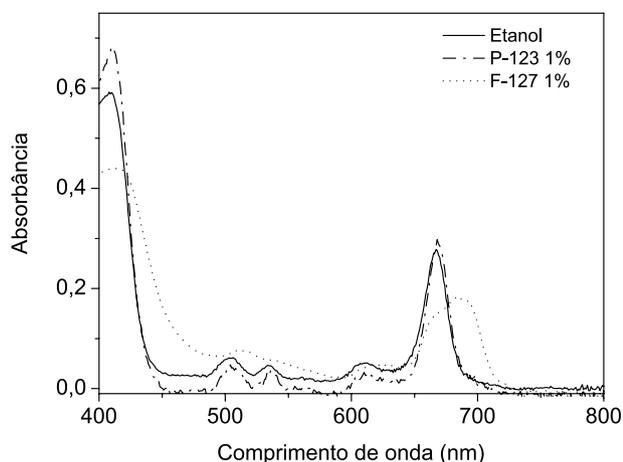
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Formulação de Pheo em micelas poliméricas para aplicação em TFD

A Pheo possui características adequadas como FS para a TFD, assim como o Pheid, seu derivado obtido pela retirada da cadeia fitil, com caráter hidrofílico potencializado, que vem sendo aplicado com êxito sobre várias linhagens de células cancerígenas.<sup>30-35</sup> Dessa maneira, a aplicação limitada da Pheo em TFD é associada à intensa agregação em meio aquoso.<sup>36</sup> Logo, esse problema pode ser resolvido por formulações da Pheo mantendo suas características fotoquímicas adequadas à técnica.

A monomerização da Pheo em surfactantes poliméricos foi investigada. Os espectros eletrônicos de absorção da Pheo em F-127 e P-123 são apresentados na Figura 2. Com o surfactante F-127 observou-se a presença de um ombro adicional na região da banda Q (690 nm), o que caracteriza a autoagregação da Pheo.<sup>37</sup> Além disso, verificou-se uma diminuição significativa na banda característica de monômeros (667 nm) em F-127. Essas alterações espectrais da Pheo foram observadas em toda a faixa de concentração estudada (1,00 x 10<sup>-6</sup> a 5,00 x 10<sup>-6</sup> mol L<sup>-1</sup>) em todas as porcentagens de F-127 (0,1; 0,2 e 1,0% (m/v)). Por outro lado, nos sistemas de P-123 apenas uma banda característica de monômeros foi observada em toda faixa de concentração estudada, semelhante à observada em solvente orgânico. A semelhança entre os espectros da Pheo em sistema micelar aquoso de P-123 e em etanol mostra que esse surfactante é adequado para monomerização da Pheo.

O valor de HLB de cada surfactante representa seu balanço hidrofílico-lipofílico.



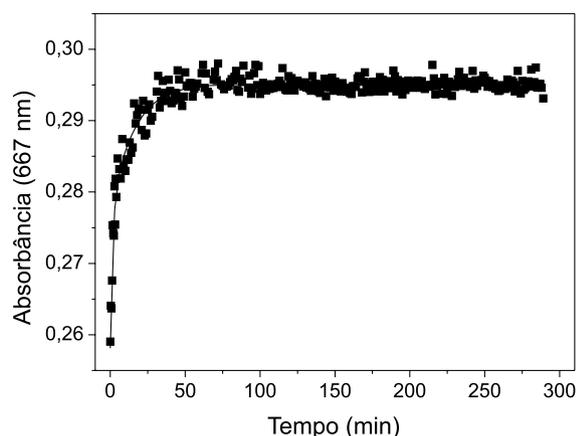
**Figura 2.** Espectros eletrônicos de absorção da Pheo ( $4,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em etanol e surfactantes poliméricos (F-127 e P-123 1%, m/v), a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$

O valor de HLB relativamente menor do P-123 (HLB = 8) em relação ao F-127 (HLB = 22)<sup>11</sup> mostra um maior balanço lipofílico do P-123. Assim, a maior capacidade de monomerização da Pheo no surfactante P-123 pode ser explicada em termos da composição estrutural de cada surfactante. O F-127 possui um maior número de unidades hidrofílicas (EO) em relação ao P-123, levando a micelas com uma camada interna hidrofóbica menor para o primeiro surfactante, limitando a capacidade de acomodar moléculas hidrofóbicas grandes como a Pheo.

Uma vez que as micelas de P-123 foram mais eficazes na monomerização da Pheo comparativamente às micelas de F-127, as primeiras são mais adequadas para formulações desse FS nos ensaios posteriores sobre *Artemia salina*.

### Cinética de incorporação da Pheo em micelas de P-123

A monomerização da Pheo em micelas de P-123 apresentou dependência temporal, observando-se uma cinética de incorporação relativamente lenta. Modelos cinéticos de primeira e segunda ordem foram testados e não apresentaram ajustes. A cinética de incorporação da Pheo em P-123 ajustou-se a um modelo exponencial de primeira ordem com duas etapas consecutivas (Figura 3).



**Figura 3.** Cinética de incorporação da Pheo ( $4,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) em micelas de P-123 (0,2%, m/v), a  $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$

Quanto à primeira etapa, a constante de velocidade desta ( $k_1 = 1,14 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), muito rápida, é atribuída à entrada do FS na camada externa das micelas. A segunda etapa, relativamente lenta ( $k_2 = 1,08$

$\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), é devida à incorporação do composto na parte interna da micela. As interações hidrofóbicas entre o FS e a região interna da micela atuam como uma força propulsora para incorporação.

### Ação fotodinâmica da Pheo sobre *Artemia salina*

O teste de toxicidade sobre *Artemia salina* vem sendo usado como modelo para atividade antitumoral, apresentando boas correlações.<sup>29</sup> Mediante a simplicidade desses ensaios, foram utilizados na avaliação da atividade fotodinâmica da Pheo formulada em P-123. Nos bioensaios controles foi verificado que isoladamente o surfactante e a luz não apresentaram efeito tóxico sobre esse microcrustáceo.

A princípio, para se avaliar a magnitude dos parâmetros experimentais de modo otimizado na porcentagem de morte das artemias aplicou-se o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. As variáveis experimentais concentração de feofitina [Pheo], porcentagem de P-123 (%P) e tempo de iluminação (t) foram analisadas em dois níveis. A estratégia mostrada na Tabela 1 para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup> foi a combinação de todos os níveis, de acordo com a matriz de planejamento. Na Tabela 1 são incluídas as respostas (média das porcentagens de morte real). A partir desses dados calcularam-se as magnitudes dos fatores para cada parâmetro investigado, juntamente com suas interações, apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 1.** Matriz de planejamento e resultados obtidos para o planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. Fatores: concentração de feofitina ([Pheo]), porcentagem de P-123 (% P) e tempo de iluminação (t)

Ensaio	Variáveis			% morte
	[Pheo]	% P	t	
1	-	-	-	12,0
2	+	-	-	6,3
3	-	+	-	1,9
4	+	+	-	1,9
5	-	-	+	15,0
6	+	-	+	18,3
7	-	+	+	30,0
8	+	+	+	50,0

**Tabela 2.** Intensidade dos efeitos e grupos de interação

% morte média	$16,9 \pm 0,78$
[Pheo]	$4,58 \pm 1,56$
% P	$7,92 \pm 1,56$
t	$22,92 \pm 1,56$
[Pheo] x % P	$5,42 \pm 1,56$
[Pheo] x t	$7,08 \pm 1,56$
% P x t	$15,42 \pm 1,56$
[Pheo] x % P x t	$2,92 \pm 1,56$

Os valores de mortalidade média mostram que o parâmetro que mais influenciou no extermínio dos microcrustáceos foi o tempo de iluminação. Os demais parâmetros experimentais investigados apresentaram efeitos semelhantes na mortandade destes organismos. Todos os resultados indicam que ao passar do nível inferior (-) para o nível superior (+) há aumento na morte das artemias. As interações de segunda ordem apresentam valores significativos, demonstrando a presença de efeitos cooperativos, com destaque para a interação %P x t. As interações de terceira ordem foram insignificantes.

Analisando-se o efeito da concentração da Pheo na ação fotodinâmica sobre as artemias, observa-se uma pequena contribuição deste fator. A elevação da concentração desta de  $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (-) para  $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  (+) acarreta aumento da mortalidade dos micro-organismos de  $4,58 \pm 1,56\%$ , que pode ser justificado pela maior quantidade de fotossensibilizador monomerizado no sistema. Estudos de monomerização da Pheo realizados previamente mostraram que as porcentagens de surfactantes empregadas são suficientes para monomerizar a Pheo em meio aquoso. Uma possível explicação para a pequena influência da concentração da Pheo na mortalidade dos microcrustáceos é o aumento da força iônica devido à presença de NaCl nos ensaios de *Artemia salina*, aumentando a tendência de autoagregação do FS.<sup>38</sup> Esse processo diminui a ação fotodinâmica do FS, uma vez que leva à autossupressão de energia, fenômeno que diminui o tempo de vida do estado excitado e, conseqüentemente, a formação de oxigênio singlete.

Em relação ao efeito da porcentagem de surfactante sobre a morte das artemias observa-se novamente pequena contribuição ( $7,92 \pm 1,56\%$ ). Essa pequena influência na letalidade dos microcrustáceos deve ser creditada à incorporação de mais moléculas de Pheo nas micelas poliméricas ao passar do nível inferior (-) para o superior (+), uma vez que o surfactante polimérico P-123 é atóxico.

O efeito exercido pelo tempo de iluminação foi o mais significativo na mortalidade das artemias ( $22,92 \pm 1,56\%$ ). A exposição do FS durante um maior período resulta em uma maior quantidade de fótons absorvidos, levando a um aumento na quantidade de Pheo no estado excitado capaz de transferir energia para o oxigênio, formando espécies ativas responsáveis pela morte das artemias.

A interação dos efeitos principais também foi significativa na inativação fotodinâmica das artemias. Analisando-se a Figura 4A onde se tem a interação dos efeitos [Pheo] x %P, no nível inferior de P-123 tem-se uma inclinação muito menor do que no nível superior do surfactante; essa diferença da inclinação das retas ilustra a forte interação entre os fatores, relacionada ao processo de monomerização do FS.<sup>39</sup>

A interação dos fatores [Pheo] x t é um ponto essencial para a eficácia da TFD que, por sua vez, depende diretamente da ativação do FS pela luz. Considerando o sistema de P-123 0,2% (Figura 4B), observa-se uma pequena inclinação da reta no nível inferior de iluminação (1 h) com o aumento da concentração de Pheo em relação ao nível superior de iluminação (2 h). Esse fato evidencia a interação entre os efeitos principais [Pheo] x t.

A interação de segunda ordem % P x t mostrou-se muito significativa, embora não possua uma explicação química, visto que o surfactante não possui interação fotoquímica com a luz aplicada (660 nm). O alto valor observado deve ser decorrente de processos paralelos referentes à cinética de incorporação da Pheo nas micelas de P-123. Nos experimentos sobre *Artemia salina*, realizados com o tempo de iluminação de 1 h, tem-se o processo de incorporação da Pheo durante grande parte do experimento. Dessa maneira, a ação fotodinâmica limitada deve-se ao fato de que o FS não se encontra completamente monomerizado. Por outro lado, quando o tempo de iluminação foi de 2 h, teve-se uma etapa inicial em que o FS estava se incorporando à micela e outra etapa em que a Pheo estava efetivamente incorporada e monomerizada. Assim, o valor encontrado para a interação dos efeitos % P x t não representa uma interação real, mas um efeito adicional decorrente de uma etapa paralela que está ocorrendo e que afeta diretamente a ação fotodinâmica do FS sobre as artemias.

Adicionalmente, para melhor visualização da magnitude de cada parâmetro, calcularam-se as porcentagens de variações para os fatores e para as interações cooperativas. Os efeitos médios da % de morte (%) nos níveis inferior (-) e superior (+) foram calculados por  $\Sigma(\%_i/4)$

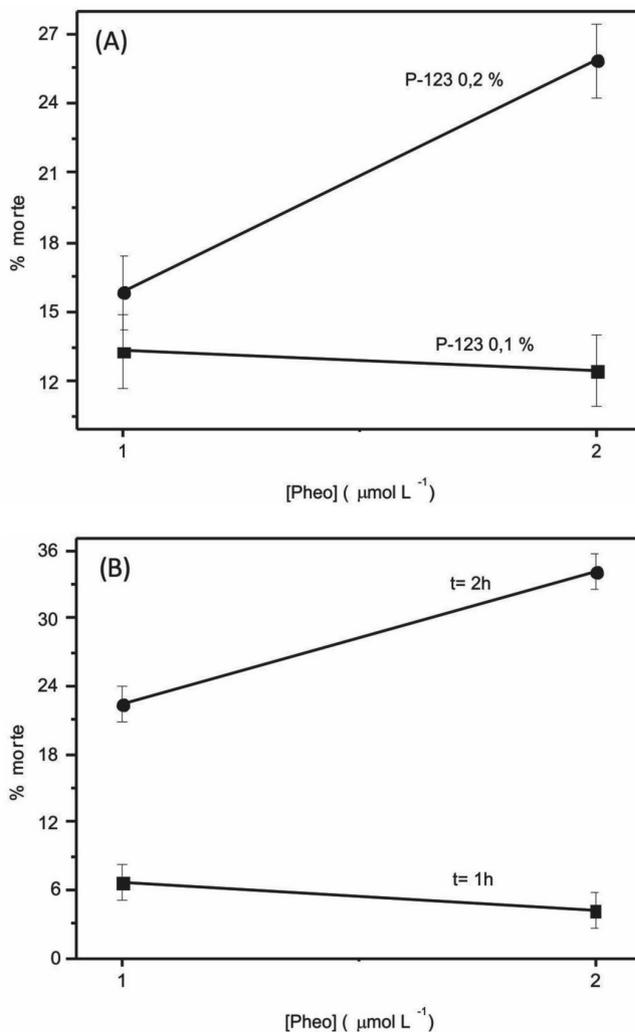


Figura 4. Interação entre os efeitos: (A) concentração de Pheo e porcentagem de P-123,  $t = 2 \text{ h}$ ; (B) concentração de Pheo e tempo de iluminação, P-123 0,2%

e  $\Sigma(\%_i/4)$  para cada parâmetro. A porcentagem de variação (Figura 5) foi obtida pela diferença entre a % de morte média (Tabela 2) e os efeitos médios calculados. Os resultados obtidos, assim como os discutidos anteriormente, mostraram que todos os efeitos principais e secundários foram significativos, e o tempo de iluminação é o fator que mais influenciou a morte dos microcrustáceos.

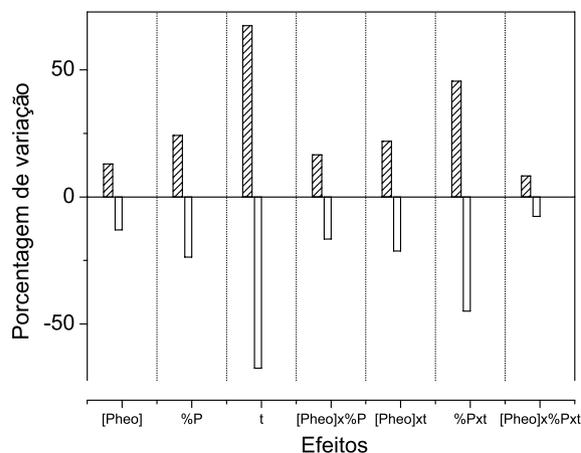


Figura 5. Porcentagens de variação da % morte para os fatores e para as interações cooperativas

## CONCLUSÃO

Os sistemas micelares de P-123 foram mais eficientes na formulação da Pheo do que os de F-127, sendo essa diferença atribuída ao menor balanço hidrofílico-lipofílico do primeiro. A formulação da Pheo em P-123 soluciona o problema de solubilidade desse FS em meio aquoso, mais adequado para aplicações clínicas, com manutenção das suas propriedades fotofísicas.

A cinética de incorporação da Pheo às micelas de P-123 ajustou-se ao modelo cinético de primeira ordem, com duas etapas consecutivas. A primeira etapa (rápida) é atribuída à partição da Pheo à interface micelar, seguida da incorporação lenta da mesma ao interior hidrofóbico da micela.

A utilização do planejamento fatorial  $2^3$  no bioensaio com *Artemia salina* mostrou a correlação entre os três fatores estudados. Os efeitos de [Pheo], %P e t foram significativos na ação fotodinâmica do FS, bem como a interação de segunda ordem entre eles, mostrando a importância desses fatores na otimização da ação fotodinâmica do sistema formulado para aplicação em TFD.

## AGRADECIMENTOS

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

## REFERÊNCIAS

1. Ion, R. M.; *Rev. Roum. Chim.* **2007**, *52*, 1093.
2. Machado, A. E.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 237.
3. Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 801.
4. Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Brückner, C.; *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4151.
5. Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X. H.; Childs, C.; Sibata, C. H.; *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2004**, *1*, 27.
6. Delmare, D.; Hioka, N.; Boch, R.; Sternberg, E.; Dolphin, D.; *Can. J. Chem.* **2001**, *79*, 1068.
7. Ricchelli, F.; Gobbo, S.; Jori, G.; Moreno, G.; Vinzens, F.; Salet, C.; *Photochem. Photobiol.* **1993**, *58*, 53.
8. Liu, R.; Forrest, M. L.; Kwon, G. S. Em *Water-insoluble drug formulation*; Liu, R., ed.; Taylor & Francis Group: New York, 2008, chap. 13.
9. Malmsten, M.; *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*, Marcel Dekker: New York, 2002.
10. Riess, G.; *Prog. Polym. Sci.* **2003**, *28*, 1107.
11. Kabanov, A. V.; Zhu, J. Em *Polymeric Drug Delivery Systems*; Kwon, G. S., ed.; Taylor & Francis Group: New York, 2005, chap. 14.
12. Sahu, A.; Kasoju, N.; Goswami, P.; Bora, U.; *J. Biomater. Appl.* **2011**, *25*, 619.
13. Yerramilli, U.; Bahadur, A.; Bahadur, P.; *Colloids Surf., B* **2011**, *83*, 49.
14. Siqueira, J. M.; Ziminiani, M. G.; Resende, U. M.; Boaventura, M. A. D.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 185.
15. Parra, A. L.; Yhebra, R. S.; Sardiñas, I. G.; Buela, I.; *Phytomedicine* **2001**, *8*, 395.
16. Siqueira, J. M.; Bomm, M. D.; Pereira, N. F. G.; Garcez, W. S.; Boaventura, M. A. D.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 557.
17. Michael, A. S.; Thompson, C. G.; Abramovitz, M.; *Science* **1956**, *123*, 464.
18. Lhullier, C.; Horta, P. A.; Falkenberg, M.; *Braz. J. Pharmacogn.* **2006**, *16*, 158.
19. Hisem, D.; Hrouzek, P.; Tomek, P.; Tomsícková, J.; Zapomelová, E.; Skácelová, K.; Lukesová, A.; Kopecký, J.; *Toxicol.* **2011**, *57*, 76.
20. Amarante, C. B.; Müller, A. H.; Póvoa, M. M.; Dolabela, M. F.; *Acta Amazônica* **2011**, *41*, 431.
21. Krishnarajua, A. V.; Rao, T. V. N.; Sundararajua, D.; Vanisreeb, M.; Tsayb, H.; Subbarajua, G. V.; *Int. J. Appl. Sci. Eng.* **2005**, *3*, 125.
22. Cavalcante, M. F.; Oliveira, M. C. C.; Velandia, J. R.; Echevarria, A.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 20.
23. MacRae, W. D.; Hudson, J. B.; *J. Ethnopharm.* **1988**, *22*, 143.
24. Scarmínio, I. S.; Lonni, A. S. G.; Longhini, R.; Lopes, G. C.; Mello, J. C. P.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *719*, 57.
25. Batistela, V. R.; Pellosi, D. S.; Souza, F. D.; Willian, F. C.; Santin, S. M.; Souza, V. R.; Caetano, W.; Scarmínio, I. S.; Hioka, N.; *Spectrochim. Acta, Part A* **2011**, *79*, 889.
26. Gottipati, R.; Mishra, S.; *Chem. Eng. J.* **2012**, *160*, 99.
27. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. M. C.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 338.
28. Svec, W. A. Em *The Porphyrins*; Dolphin, D., ed.; Academic Press: New York, 1978, vol. V, chap. 8.
29. Meyer, B. N.; Ferrigni, N. R.; Putman, J. E.; Jacobsen, L. B.; Nichols, D. E.; Laughin, J. L.; *Planta Med.* **1982**, *45*, 31.
30. Bergstrom, L. C.; Vucenik, I.; Hagen, I. K.; Chernomorsky, S. A.; Poretz, R.D.; *J. Photochem. Photobiol., B* **1994**, *24*, 17.
31. Park, Y. J.; Lee, W. Y.; Hahn, B. S.; Han, M. J.; Yang, W. I.; Kim, B. S.; *Yonsei Med. J.* **1989**, *30*, 212.
32. Lee, W. Y.; Lim, D. S.; Ko, S. H.; Park, Y. J.; Ryu, K. S.; Ahn, M. Y.; Kim, Y. R.; Lee, D. W.; Cho, C. W.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2004**, *75*, 119.
33. Jakus, J.; Farkas, O.; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 694.
34. Li, W. T.; Tsao, H. W.; Chen, Y. Y.; Cheng, S. W.; Hsu, Y. C.; *Photochem. Photobiol. Sci.* **2007**, *6*, 1341.
35. Goto, B.; Iriuchishima, T.; Horaguchi, T.; Tokuhashi, Y.; Nagai, Y.; Harada, T.; Saito, A.; Aizawa, S.; *Photomed. Laser Surg.* **2011**, *29*, 183.
36. Nyman, E. S.; Hynninen, P. H.; *J. Photochem. Photobiol., B* **2004**, *73*, 1.
37. Moreira, L. M.; Lima, A.; Soares, R. R. S.; Batistela, V. R.; Gerola, A. P.; Hioka, N.; Bonancin, J.; Severino, D.; Baptista, M. S.; Machado, A. E. H.; Rodrigues, M. R.; Codognoto, L.; Oliveira, H. P. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1653.
38. Wu, J. J.; Li, N.; Liu, F.; *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 8134.
39. Rocha, R. F.; Rosatto, S. S.; Bruns, R. E.; Kubota, L. T.; *J. Electroanal. Chem.* **1997**, *433*, 73.