

Marcos Aires de Brito*, Ademir Neves e Luiz R. Zilli

Departamento de Química - UFSC - 88040-900 - Florianópolis - SC

Recebido em 1/7/96; aceito em 19/9/96

MODELING THE COORDINATION OF PHOSPHATE TO THE ACTIVE SITE OF PURPLE ACID PHOSPHATASES. We present a new binuclear complex, $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{OH})(\text{O}_2\text{P}(\text{OPh})_2)]\text{ClO}_4 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$, **3**, where BBPMP is the anion of 2,6-bis[(2-hydroxybenzyl)(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methylphenol, as a suitable model for the chromophoric site of purple acid phosphatases coordinated to phosphate. The complex was obtained by the reaction of complex **2**, $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{O}_2\text{P}(\text{OPh})_2)_2]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, in CH_3CN with one equivalent of triethylamine. Based on the chromophoric properties of the model complex, $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$; $\epsilon = 4480 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/\text{Fe}_2$ compared to the enzyme coordinated to phosphate, we can speculate about a possible mechanism of fixing this oxyanion by the oxidized form of the enzymes.

Keywords: purple acid phosphatases; model complexes; bioinorganic chemistry.

INTRODUÇÃO

Fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são metaloenzimas do tipo não-heme envolvidas na hidrólise de monoésteres de fosfato em pH \blacktriangle 4,9-6,0 ($\text{RCH}_2\text{O} - \text{PO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH}_2\text{OH} + \text{HPO}_4^{2-}$) e no controle fisiológico dos níveis de fosfato¹. Uteroferrina e "bovine spleen", extraídas do útero de suínos e do pâncreas de bovinos, respectivamente, são as PAPs mais estudadas. Essas enzimas apresentam massas molares \blacktriangle 35 kDa e um sítio binuclear contendo ferro em dois estados de oxidação: a forma oxidada, $[\text{Fe}(\text{III})-\text{Fe}(\text{III})]$ de cor púrpura, $\lambda_{\text{max}} = 550\text{-}570\text{nm}$; $\epsilon = 4000\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/\text{Fe}_2$, inativa para a hidrólise e a forma reduzida, $[\text{Fe}(\text{II})-\text{Fe}(\text{III})]$ de cor rosa, $\lambda_{\text{max}} = 505\text{-}515$; $\epsilon = 4000\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/\text{Fe}_2$, enzimaticamente ativa. A adição de fosfato a uma solução da forma rosa dessas enzimas produz um complexo que facilita a oxidação pelo ar, resultando na cor púrpura, típica da forma oxidada das PAPs. O mesmo espectro é obtido via coordenação direta de fosfato com a forma oxidada das fosfatases ácidas púrpuras^{1c}. As cores das PAPs estão associadas a processos de transferência de carga tirosinato $\rightleftharpoons \text{Fe}^{\text{III}}$, e o fato do coeficiente de absorvidade molar ser idêntico para ambas as espécies sugere um sítio ativo não simétrico. Embora já se tenha conseguido algum progresso na caracterização da uteroferrina e "bovine spleen" (espectroscopia eletrônica^{1b,c}, difracto circular², ¹HRNM³, espectroscopia Mössbauer^{4a} e EPR⁴, Raman Ressonante⁵, EXAFS⁶, susceptibilidade magnética^{1c,7} e eletroquímica⁸), ainda não se conseguiu monocristais adequados dessas enzimas para a resolução da estrutura via difração de raios X. Entretanto, das análises realizadas pode-se inferir que existem restos de tirosinatos e histidinas, bem como carboxilatos^{3b} e grupos hidróxidos^{8,9} ligados ao sítio binuclear de ferro nas PAPs. Vários pesquisadores têm contribuído através de análogos sintéticos dessas metalobiomoléculas e pode-se encontrar, na literatura, complexos contendo ligantes binucleantes com braços que apresentam piridinas¹⁰, 1-metilimidazóis¹¹, piridinas-fenolatos^{12a-d} e 1-metilimidazóis-fenolato^{12c}. Entretanto, a maioria desses complexos não exibe as propriedades espectroscópicas, nem as de redox das fosfatases ácidas púrpuras. Portanto, o ambiente de coordenação do sítio ativo das PAPs e PAPs coordenadas a fosfato ainda não está definido e, assim, a síntese e caracterização de novos complexos modelo, com ligantes N,O-doadores, continua sendo uma área de grande relevância bioinorgânica.

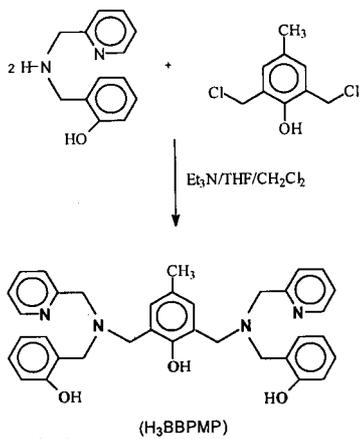
Recentemente, publicamos a síntese e caracterização de um

novo ligante binucleante não simétrico, 2-[[[(2-metilpiridil)amino]metil]-6-[[[(2-hidróxibenzil)(2-metilpiridil)amino]metil]-4-metilfenol -(H₂BBPMP)- e o primeiro exemplo de um complexo binuclear de valência mista, $[\text{Fe}(\text{II})-\text{Fe}(\text{III})]$, contendo pontes acetato que apresenta potencial redox, $E^{\circ} = 0.38 \text{ V}$ versus NHE (-0,02V vs Fc^+/Fc^0)¹³ similar ao acoplamento $\text{Fe}_2^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$, na uteroferrina⁸, $E^{\circ} = 0.37 \text{ V}$ versus ENH (-0,03 V vs Fc^+/Fc^0). Entretanto, esse complexo, em CH_3CN , $\lambda_{\text{max}} = 556\text{nm}$; $\epsilon = 4560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/\text{Fe}_2$, não simula o cromóforo da enzima natural. Mais recentemente, sintetizamos e caracterizamos vários outros novos complexos binucleares de ferro com o ligante binucleante simétrico, 2,6-bis[(2-hidróxibenzil)(2-metilpiridil)aminometil]-4-metilfenol -(H₃BBPMP)- onde as piridinas e os fenóis simulam histidinas e tirosinas, respectivamente, que contribuem para o entendimento do sítio ativo das PAPs. Por exemplo, os complexos $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})]^+$, em CH_3CN , $\lambda_{\text{max}} = 568\text{nm}$; $\epsilon = 4760\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/\text{Fe}_2$ e $[\text{Fe}^{\text{II}} \text{Fe}^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{OH})(\text{CH}_3\text{COO})]$, em CH_3CN , $\lambda_{\text{max}} = 516\text{nm}$; $\epsilon = 4560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}/\text{Fe}_2$, são bons modelos para o cromóforo da uteroferrina e "bovine spleen" nas formas oxidada e reduzida, respectivamente, mas diferem ($E^{\circ} = -0,57\text{V}$ vs Fc^+/Fc^0)^{14,15} do potencial redox da uteroferrina⁸. Devemos mencionar, também, que demonstramos, via análogos sintéticos^{13,15}, existir uma relação 2:3 entre o número de tirosinatos e histidinas coordenadas no sítio binuclear da uteroferrina. Neste artigo, pretendemos modelar o ambiente de coordenação da forma oxidada das PAPs em interação com fosfato, utilizando um novo complexo do ligante H₃BBPMP.

PARTE EXPERIMENTAL

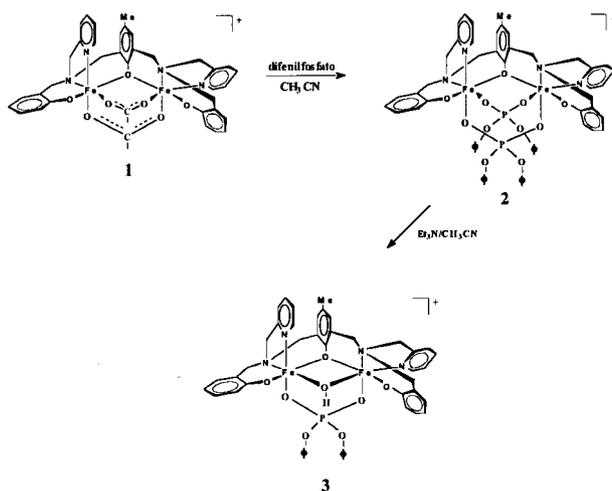
1. Sínteses e Caracterização

O ligante H₃BBPMP foi sintetizado de acordo com a rota apresentada no esquema 1. Sua caracterização bem como os detalhes da síntese já se encontram publicados^{12a,14,15}. Um novo complexo, $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{OH})(\text{O}_2\text{P}(\text{OPh})_2)]\text{ClO}_4 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$, **3**, foi sintetizado a partir do precursor, $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{O}_2\text{P}(\text{OPh})_2)_2]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, **2**, via hidrólise básica, utilizando-se um equivalente de trietilamina em acetonitrila. O complexo **2** foi obtido através de uma rota sintética, diferente da síntese realizada por Krebs e colaboradores^{12c}, que envolve a substituição dos grupos acetato no complexo $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{CH}_3\text{COO})_2]\text{ClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ^{12a,14,15}, **1**, em acetonitrila, por difenilfosfato.



Esquema 1. Síntese do ligante H_3BBPMP .

O esquema 2 resume a rota de síntese para os complexos **2** e **3**.



Esquema 2. Síntese dos complexos **2** e **3**.

$[Fe_2^{III}(BBPMP)(O_2Ph)_2]_2ClO_4 \cdot H_2O$, **2**. Dissolveram-se 0,95g (1 mmol) do complexo **1** em 30 mL de acetonitrila, sob agitação magnética. Elevou-se a temperatura para 40°C e em seguida adicionaram-se 0,5g (2 mmol) de difenilfosfato. A solução azul, foi mantida, sob agitação, até o surgimento da absorção em $\lambda_{max} = 632$ nm, que corresponde à banda de absorção do complexo de Krebs^{12c} em CH_3CN . A solução, então foi evaporada e o sólido foi recristalizado em isopropanol, filtrado e seco com éter etílico. A análise de CHN, encontrado, %: C= 54,73; H= 4,31; N= 4,33. Calculado para $C_{59}H_{55}N_4O_{16}P_2Fe_2Cl$, %: C= 55,14; H= 4,31; N= 4,36. Rendimento ▲ 45%.

$[Fe_2^{III}(BBPMP)(OH)(O_2P(OPh)_2)]ClO_4 \cdot CH_3OH$, **3**. Dissolveram-se 0,5g (0,4 mmol) do complexo **2** em 30 mL de acetonitrila, sob agitação magnética e temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados lentamente 54 μ L (0,4 mmol) de trietilamina e através de monitoramento por espectroscopia eletrônica, quando a solução púrpura apresentou $\lambda_{max} = 560$ nm, imediatamente foi evaporada e o sólido lavado com água, recristalizado em metanol, filtrado e seco com éter etílico. A análise de CHN, encontrado, %: C= 54,34; H= 4,52; N= 5,31. Calculado para $C_{48}H_{47}N_4O_{13}PF_2Cl$, %: C= 54,08; H= 4,44; N= 5,26. Rendimento ▲ 60%.

2. Instrumentação

As análises de CHN foram realizadas com um equipamento Perkin-Elmer 2400 e os espectros de absorção foram obtidos

em um espectrofotômetro L19 da Perkin-Elmer. Utilizamos, também, o L19 para monitorar as sínteses dos complexos **2** e **3**. Para a obtenção dos desdobramentos espectrais, na interconversão entre os complexos em solução, utilizamos 90 segundos entre cada espectro. Na análise eletroquímica dos complexos em CH_3CN contendo 0,1M de hexafluorofosfato de tetrabutilamônio, $[TBA][PF_6]$, como eletrólito suporte, utilizamos um potenciostato/galvanostato da Princeton Applied Research (PAR), modelo 273 equipado com um computador IBM/AT-386 acoplado a uma registradora HP-7445, para o registro dos voltamogramas cíclicos. Os voltamogramas cíclicos, sob argônio e a temperatura ambiente, foram obtidos em uma célula padrão com três eletrodos: um eletrodo de trabalho (platina), um eletrodo auxiliar (fio de platina) e um eletrodo de referência (eletrodo de calomelano saturado), construído em nossos laboratórios. Para monitorar o potencial do eletrodo de referência, utilizamos o par redox Ferrocínio/Ferroceno (Fc^+/Fc^0), como referência interna, que se encontrava em + 0,27 V. Os potenciais de meia onda foram calculados a partir da média dos potenciais de pico anódico e catódico e utilizados como critério de reversibilidade para os processos de transferência de elétrons¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Sínteses

Demonstramos, em publicações recentes^{14,15}, que é possível ajustar-se o cromóforo de um complexo precursor, obtendo-se um novo complexo, mediante substituições adequadas para simular as propriedades espectroscópicas em espécies de interesse biológico Utilizando o complexo $[Fe_2^{III}(BBPMP)(CH_3COO)_2]ClO_4 \cdot H_2O$, **1**, que é azul em acetonitrila, $\lambda_{max} = 601$ nm; $\epsilon = 7700 M^{-1}cm^{-1}/Fe_2$, e cuja estrutura já foi resolvida^{12a,14,15}, substituímos os grupos acetatos por difenilfosfatos, obtendo-se o complexo de Krebs^{12c}, $[Fe_2^{III}(BBPMP)(O_2P(OPh)_2)]_2ClO_4 \cdot H_2O$, **2**, que também é azul em acetonitrila, $\lambda_{max} = 632$ nm; $\epsilon = 5920 M^{-1}cm^{-1}/Fe_2$. A partir de ensaios, via espectroscopia eletrônica, encontramos as condições experimentais para a síntese do complexo $[Fe_2^{III}(BBPMP)(OH)(O_2P(OPh)_2)]ClO_4 \cdot CH_3OH$, **3**, utilizando o precursor **2** em acetonitrila/trietilamina. Esse complexo é púrpuro em CH_3CN , $\lambda_{max} = 560$ nm; $\epsilon = 4480 M^{-1}cm^{-1}/Fe_2$, e desse modo conseguimos ajustar o cromóforo do análogo sintético, obtendo-se um modelo para a forma oxidada das PAPs coordenadas a fosfato.

2. Espectroscopia eletrônica

Conforme descrito anteriormente, o complexo **3** foi obtido a partir do complexo **2** em acetonitrila/trietilamina. A reação foi acompanhada por espectroscopia eletrônica, e como ilustrado na figura 1, a presença de pontos isobstéticos sugere equilíbrios

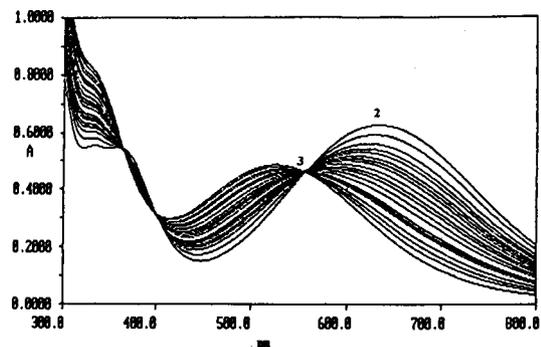


Figura 1. Desdobramento espectral durante a conversão do complexo $[Fe_2^{III}(BBPMP)-(O_2P(OPh)_2)]_2ClO_4 \cdot H_2O$, **2**, no complexo $[Fe_2^{III}(BBPMP)(OH)(O_2P(OPh)_2)]ClO_4 \cdot CH_3OH$, **3**, em CH_3CN/Et_3N , com 90 segundos entre cada espectro.

sucessivos¹⁷ com três espécies em solução^{17,18}: o complexo **2**, $\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm}$; $\epsilon = 5540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}/\text{Fe}_2$; $\lambda_{\text{max}} = 354 \text{ nm}$; $\epsilon = 5500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}/\text{Fe}_2$ e $\lambda_{\text{max}} = 632 \text{ nm}$; $\epsilon = 5920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}/\text{Fe}_2$, o complexo **3**, $\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm}$; $\epsilon = 7620 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}/\text{Fe}_2$ e $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$; $\epsilon = 4480 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}/\text{Fe}_2$, e uma terceira espécie, provavelmente, $[\text{Fe}_2^{\text{III}}(\text{BBPMP})(\text{OH})_2]^+$ que absorve em 525 nm devido ao excesso de base que foi utilizada nesse experimento. Essas transições eletrônicas estão associadas a processos de transferências de carga, Fenolato $\leftrightarrow \text{Fe}^{\text{III}}$. O deslocamento hipsocrômico do complexo **3**, em relação ao complexo **2**, provavelmente reflete um distanciamento das ligações fenolato- Fe^{III} , no complexo **3**, devido a substituição de um difenilfosfato por hidróxido no complexo **2**. A adição de difenilfosfato à solução do complexo **3**, em CH_3CN , reproduz o espectro do complexo **2**, o que demonstra a reversibilidade do processo.

3. Eletroquímica

As propriedades redox do complexo **3**, em acetonitrila/ $[\text{TBA}][\text{PF}_6]$, foram investigadas por voltametria cíclica. O voltamograma do complexo se encontra na figura 2 e exibe uma onda reversível em -0.29 V versus SCE (-0.56 V versus Fc^+/Fc^0) e outra irreversível em potencial mais catódico. Essas ondas estão associadas aos acoplamentos $\text{Fe}_2^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}} \text{Fe}^{\text{III}}$ e $\text{Fe}^{\text{II}} \text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}_2^{\text{III}}$, respectivamente. Comparando o potencial redox do complexo **3** com -0.20 V versus SCE (-0.47 V versus Fc^+/Fc^0) para o complexo **2**, nas mesmas condições experimentais, nota-se um deslocamento catódico de 90 mV , de acordo com o previsto, considerando que o grupo hidróxido é mais básico que o difenilfosfato. É interessante destacar a correlação encontrada entre as energias das bandas de transferência de carga na região do visível e os respectivos potenciais redox dos complexos **2**, 15857 cm^{-1} ; $E^0 = -0.47 \text{ V}$ versus Fc^+/Fc^0 , e **3**, 17857 cm^{-1} ; $E^0 = -0.56 \text{ V}$ versus Fc^+/Fc^0 . O complexo **3**, absorvendo em maior energia, apresenta um potencial redox mais negativo em relação ao precursor **2**, como era de se esperar. Entretanto, ambos os complexos não simulam as propriedades eletroquímicas da uteroferrina⁸, devido a relação fenolatos: piridinas no ligante simétrico^{13,15}. A partir das propriedades do novo complexo, **3**, e comparando-se com o complexo **2** que teve sua estrutura resolvida por Krebs e colaboradores^{12c}, propomos uma representação da estrutura para o complexo $[\text{Fe}_2(\text{BBPMP})(\text{OH})(\text{O}_2\text{P}(\text{OPh})_2)]^+$, conforme apresentada no esquema 2.

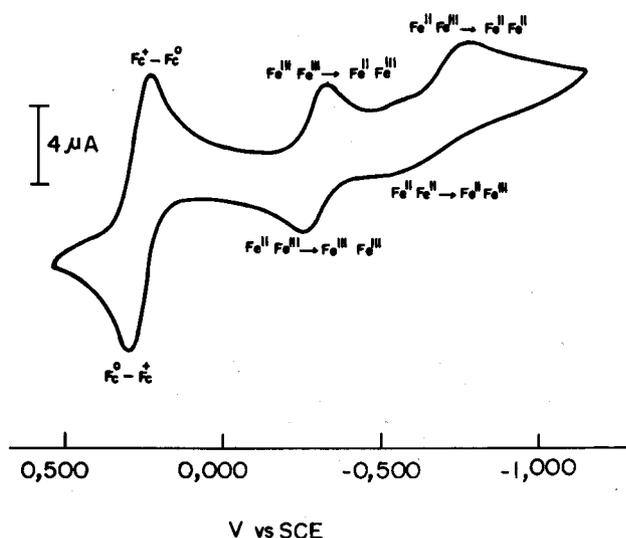


Figura 2. Voltamograma cíclico do complexo **3** em CH_3CN ($0,1 \text{ M}$ $[\text{TBA}][\text{PF}_6]$). Eletrodo de trabalho (platina); eletrodo auxiliar (fio de platina) e eletrodo de referência (SCE); duas varreduras sucessivas com velocidade de 200 mVs^{-1} , sob argônio e ferroceno como referência interna.

CONCLUSÕES

Um novo complexo, $[\text{Fe}_2(\text{BBPMP})(\text{OH})(\text{O}_2\text{P}(\text{OPh})_2)]\text{ClO}_4 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$, foi sintetizado e caracterizado como modelo para o cromóforo da forma púrpura das PAPs coordenadas a fosfato. Este complexo púrpuro, **3**, foi obtido a partir do complexo azul, **2**, demonstrando que nossa estratégia sintética foi adequada para a obtenção de um modelo bioinorgânico. A partir da comparação das propriedades do complexo modelo, **3**, com as PAPs e PAPs-fosfato, podemos especular que a função da forma oxidada das fosfatases ácidas púrpuras seria a de fixar fosfato, regulando os níveis fisiológicos deste oxoanion. Havendo necessidade de fosfato no organismo, um dos sítios de Fe^{III} na enzima ligada a fosfato seria reduzido por algum redutor biológico, NADH ou NADPH?, com liberação de fosfato e, consequentemente, a metaloenzima seria regenerada em sua forma ativa.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida a L.R.Zilli (processo nº 350797/91-9), FINEP, PAD-CT e CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. a) Cowan, J. A.; *Inorganic Biochemistry*, VCH publ., New York, 1993. b) Doi, K.; Antanaitis, B. C.; Aisen, P.; *Structure and Bonding* **1988**, *70*, 1. c) Vincent, J. B.; Oliver-Lilley, G. L.; Averill, B. A.; *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 1447.
2. Antanaitis, B. C.; Aisen, P.; Lilienthal, H. R.; *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 3166.
3. a) Laufer, R. B.; Antanaitis, B. C.; Aisen, P.; Que, L. Jr.; *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 14212. b) Scarrow, R. C.; Pyrz, J. W.; Que, L. Jr.; *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 657.
4. a) Debrunner, P. C.; Hendrich, M. P.; de Jersey, J.; Keough, D. T.; Sage, J. T.; Zerner, B.; *Biochim. Biophys. Acta* **1983**, *745*, 103. b) Antanaitis, B. C. Peisach, J.; Mins, W. B.; Aisen, P.; *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 4572.
5. Averill, B. A.; Davis, J. C.; Burman, S.; Zirino, T.; Sanders-Loehr, J.; Sage, J. T.; Debrunner, P. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3760.
6. Hanzlarich, S. M.; Teo, B. K.; Zirino, T.; Burman, S.; Davis, J. C.; Averill, B. A.; *Inorg. Chem.* **1986**, *25*, 2781.
7. Gehring, S.; Fleischhauer, P.; Haase, W.; Dietrich, M.; Witzel, H.; *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1990**, *371*, 786.
8. Wang, D. L.; Holz, R. C.; David, S. S.; Que, L. Jr., Stankovich, M. T.; *Biochemistry* **1991**, *30*, 8187.
9. Dietrich, M.; Münstermann, D.; Snerbann, H.; Witzel, H.; *Eur. J. Bioch.* **1991**, *199*, 105.
10. a) Suzuki, M.; Uehara, A.; Oshio, H.; Endo, K.; Yanaga, M.; Kida, S.; Saito, K.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3547. b) Yan, S.; Que, L. Jr.; Taylor, L. F.; Anderson, O. P.; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5222. c) Borovik, A. S.; Papaefthymiou, V.; Taylor, L. F.; Anderson, O. P.; Que, L. Jr.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6183. d) Maeda, Y.; Tanigawa, Y.; Matsumoto, N.; Oshio, H.; Suzuki, M.; Takashima, Y.; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 125. e) Schepers, K.; Bremer, B.; Krebs, B.; Henkel, G.; Althaus, E.; Mosel, B.; Müller-Walurmurth, W.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 531.
11. a) Mashuta, M. S.; Webb, R. J.; Oberhausen, K. J.; Richardson, J. F.; Buchanan, R. M.; Hendrickson, D. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2745. b) Mashuta, M. S.; Webb, R. J.; McCusker, J. K.; Schmitt, E. A.; Oberhausen, K. J.; Richardson, J. F.; Buchanan, R. M.; Hendrickson, D. N.; *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3815.
12. a) Neves, A.; de Brito, M. A.; Vencato, I.; Drago, V.;

- Griesar, K.; Haase, W.; Mascarenhas, Y. P.; *Inorg. Chim. Acta* **1993**, 214, 5. b) Campbell, V. D.; Parsons, E. J.; Pennington, W. T.; *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 1773. c) Krebs, B.; Schepers, K.; Bremer, B.; Henkel, G.; Althaus, E.; Müller-Warmuth, W.; Griesar, K.; Haase, W.; *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 1907. d) Bernard, E.; Moneta, W.; Laugrier, J.; Clarden Nobat, S.; Deronzier, A.; Tuchagues, J. P.; Latourz, J. M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 887. e) Nie, H.; Aubin, S. M. J.; Mashuta, M. S.; Wu, C. C.; Richardson, J. F.; Hendrickson, D. N., Buchanan, R. M.; *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 2382.
13. Neves, A.; de Brito, M. A.; Drago, V.; Griesar, K.; Haase, W.; *Inorg. Chim. Acta* **1995**, 237, 131.
14. Neves, A.; de Brito, M. A.; Vencato, I.; Drago, V.; Griesar, K.; Haase, W.; *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 2360.
15. De Brito, M. A.; Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 1994.
16. Nicholson, R. S.; Shain, I.; *Anal. Chem.* **1964**, 36, 706.
17. Harris, D. C.; Bertolucci, M. D.; *Symmetry and Spectroscopy*, Oxford University Press. Inc., 1978.
18. Coleman, J. S.; Varga, L. P.; Mastin, S. H.; *Inorg. Chem.* **1970**, 9, 1015.