

## UTILIZAÇÃO DE ENDOPERÓXIDOS DE DERIVADOS DE NAFTALENO COMO FONTES QUÍMICAS DE OXIGÊNIO SINGLETE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Glaucia R. Martinez, Marisa H. G. Medeiros e Paolo Di Mascio\*

Departamento de Bioquímica - Instituto de Química - Universidade de São Paulo - CP 26077 - 05513-970 - São Paulo - SP

Recebido em 16/7/99; aceito em 8/12/99

**NAPHTHALENE ENDOPEROXIDES AS CHEMICAL SOURCES OF SINGLET OXYGEN IN BIOLOGICAL SYSTEMS.** Molecular oxygen, in the first excited state (singlet oxygen,  $^1\text{O}_2$ ), has a substantial reactivity towards electron-rich organic molecules, such as biological targets, including unsaturated fatty acids, proteins, RNA and DNA. Considering the complexity of biological systems and the great variety of reactive species generated by photochemistry, efforts have been devoted to develop suitable  $^1\text{O}_2$  generators based on the thermolysis of water soluble naphthalene endoperoxides. These compounds are chemically inert and have been employed as versatile sources of  $^1\text{O}_2$ . The synthesis is based on structural modifications in position 1,4 of dimethylnaphthalene, grafting hydrophilic substituents. The correspondent endoperoxide can be generated using photochemical method, or molybdate-catalyzed disproportionation of hydrogen peroxide.

**Keywords:** singlet oxygen; naphthalene endoperoxides; biological systems.

## INTRODUÇÃO

O oxigênio molecular tem estado fundamental triplete ( $^3\Sigma_g^-$ ), ou seja, seu nível eletrônico ocupado de mais alta energia é constituído por dois orbitais degenerados  $\pi^*$  (orbitais diferentes com a mesma energia) ocupados por dois elétrons, sendo que cada elétron fica em um orbital  $\pi^*$  e eles estão com spin paralelos, constituindo assim um biradical, denotado por  $^3\text{O}_2$  (Fig. 1). Esta característica conferiria ao oxigênio uma alta reatividade, entretanto sua redução direta por dois elétrons com spins antiparalelos é proibida pela regra de conservação de spin, tornando-o relativamente inerte.

O oxigênio no estado excitado pode apresentar-se em duas formas o  $^1\Delta_g$  e o  $^1\Sigma_g^+$ , tendo o primeiro energia 22 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média alta (ca. 2-4  $\mu\text{s}$  em  $\text{H}_2\text{O}$ ) e o segundo tem energia de 37,5 kcal/mol acima do estado fundamental e vida-média muito menor, decaindo rapidamente para o estado  $^1\Delta_g$ . Considerando estas características, a única forma de oxigênio singlete que apresenta interesse em sistema biológicos é a forma  $^1\Delta_g$ , que será denotado por  $^1\text{O}_2$ .

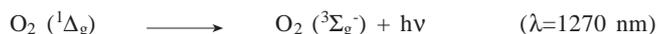
Estado	Orbitais $\pi^*$	Energia (kcal/mol)
$^1\Sigma_g^+$	$\uparrow \quad \downarrow$	37,5
$^1\Delta_g$	$\uparrow\downarrow$	22,5
$^3\Sigma_g^-$	$\uparrow \quad \uparrow$	

**Figura 1.** Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares ( $\pi^*$ ) do oxigênio no estado excitado singlete ( $^1\Sigma_g^+$ ,  $^1\Delta_g$ ) e no estado fundamental triplete ( $^3\Sigma_g^-$ ).

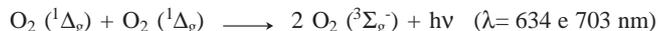
Sendo o oxigênio singlete uma molécula no estado eletrônico

excitado, ela pode decair emitindo luz. Existem dois tipos de emissões possíveis:

(i) Emissão Monomolecular



(ii) Emissão Bimolecular



A emissão monomolecular (i) pode ser detectada por um espectrômetro tendo como fotodetector um fotodiodo de Germânio. A intensidade da emissão é diretamente proporcional a concentração do  $^1\text{O}_2$  e fornece uma medida da quantidade produzida<sup>1</sup>.

A emissão bimolecular (ii) pode ser monitorada por meio de uma fotomultiplicadora sensível a região do vermelho, termoeletricamente resfriada, conectada a um sistema discriminador e amplificador<sup>2</sup>.

O  $^1\text{O}_2$  apresenta alta reatividade, oxida muitas funções orgânicas ricas em elétrons, como sulfetos, aminas e fenóis. Sendo assim, serão importantes alvos biológicos do  $^1\text{O}_2$  moléculas fundamentais como ácidos graxos insaturados, proteínas e DNA<sup>3-5</sup>.

A geração de  $^1\text{O}_2$  em meios biológicos pode ser feita por enzimas como as peroxidases e oxigenases, reação de peróxido de hidrogênio com hipoclorito ou peroxinitrito<sup>6</sup>, ou termodecomposição de dioetanos<sup>7,8</sup>. Tem sido mostrado que um dos papéis de geração de  $^1\text{O}_2$  em sistemas biológicos pode estar implicado no mecanismo de defesa contra vírus e bactérias por células responsáveis pela fagocitose<sup>9</sup>.

Existem várias formas químicas de gerar oxigênio singlete, como a oxidação e desproporcionamento do ânion superóxido<sup>10,11</sup>, a oxidação e desproporcionamento do peróxido de hidrogênio que pode ser feita pelo íon hipoclorito<sup>12</sup> ou pelo íon molibdato<sup>13</sup>, porém estes compostos são tóxicos e fortemente oxidantes. A fotossensibilização<sup>14</sup> também é uma das possíveis técnicas para gerar  $^1\text{O}_2$ , mas tem o inconveniente de gerar subprodutos. Com objetivo de desenvolver geradores de  $^1\text{O}_2$  compatíveis com as condições de meios biológicos (meio aquoso, pH neutro, temperaturas moderadas), a decomposição térmica de endoperoxidos tem se tornado uma ferramenta valiosa, pois não gera subprodutos e não necessita de condições drásticas de trabalho<sup>3,15,16</sup>.

e-mail: pdmascio@iq.usp.br

## TERMÓLISE DE ENDOPERÓXIDOS DE DERIVADOS DE NAFTALENOS COMO FONTE DE OXIGÊNIO SINGLETE

A ligação reversível de oxigênio a compostos aromáticos policíclicos foi descoberta em 1926 por Dufraisse<sup>17,18</sup>. Ele também demonstrou que o oxigênio liberado estava num estado "ativado", mas a natureza precisa das espécies envolvidas, isto é do  $^1\text{O}_2$ , foi estabelecida em 1972 por Wasserman e Larsen<sup>19</sup> usando o endoperóxido do 9,10-difenilantraceno. Quando este endoperóxido é aquecido a 80°C, ele se decompõe no composto de origem e oxigênio molecular, do qual 32% está no estado singlete<sup>20</sup>. O endoperóxido do 1,4-dimetilnaftaleno (DMN) gera  $^1\text{O}_2$  a uma temperatura menor (37°C) com um rendimento maior (76%)<sup>21</sup>.

Dessa maneira, derivados do DMN solúveis em água podem agir como geradores de  $^1\text{O}_2$  apresentando muitas vantagens. Eles reagem com  $^1\text{O}_2$  a baixa temperatura (0-5°C) gerando o endoperóxido correspondente, são estáveis por meses quando mantidos a -80°C e liberam uma quantidade definida de  $^1\text{O}_2$  quando aquecidos a 37°C em sistemas biológicos (Fig.2).

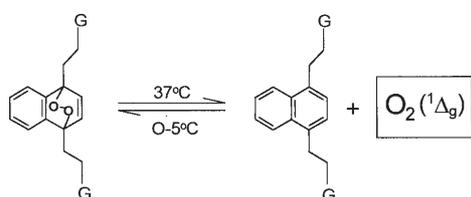


Figura 2. Termodecomposição de endoperóxido naftalênico e cicloadição de  $^1\text{O}_2$  na posição 1,4 do anel naftalênico substituído com grupo hidrofílico (G).

Os primeiros geradores de  $^1\text{O}_2$  que possuíam as propriedades descritas acima foram reportados<sup>20,22</sup> e são conhecidos como 3-(4-metilnaftil)propanoato de sódio (MNP) e 3,3'-(1,4-naftilideno)dipropanoato de sódio (NDP) (compostos 1 e 2, Fig.3). Os endoperóxidos correspondentes tem sido usados como fonte de  $^1\text{O}_2$  para estudar a reatividade dessa espécie em alvos químicos ou biológicos.

Apesar do fato destes compostos liberarem  $^1\text{O}_2$  em fase aquosa, nem sempre esse processo ocorre nas proximidades do alvo desejado. Neste caso, outras características devem estar presentes nos substituintes do naftaleno. Para este fim, uma segunda geração de geradores tem sido sintetizada. Eles carregam substituintes como sais quaternários de amônio<sup>23</sup>, cloreto de N,N,N-trimetil-N-2-(4-metilnaftil)etil amônio (MNEA, composto 3, Fig. 3), ou grupos hidrofílicos não-iônicos<sup>24,25</sup> como 1,4-dihidroximetil-naftaleno (HMN) e N,N'-di(2,3-dihidroxipropil)-3,3'-(1,4-naftilideno) dipropanoato (DHPN) (compostos 4 e 5, Fig. 3) para que estas moléculas apresentem uma afinidade particular por nucleotídeos, sítios carregados negativamente ou alvos intra-celulares.

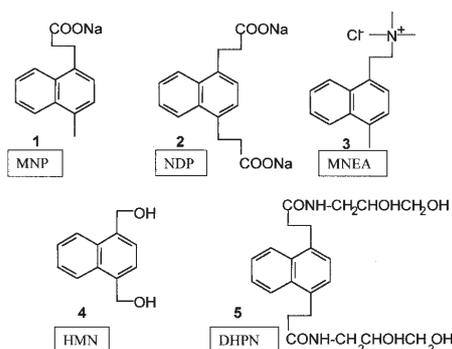


Figura 3. Derivados de naftaleno com substituintes hidrofílicos.

## ESTRATÉGIA DE SÍNTESE DE DERIVADOS NAFTALÊNICOS HIDROSOLÚVEIS

Algumas características importantes devem ser levadas em consideração quando deseja-se modificar os substituintes no naftaleno: os substituintes do naftaleno devem ser insensíveis ao  $^1\text{O}_2$  e ao fotosensibilizador ou às fontes químicas de  $^1\text{O}_2$  necessárias para preparar o endoperóxido correspondente.

Além disso, a função hidrofílica não deve desativar o oxigênio singlete como fazem grupos amino e fenol. O naftaleno em si não reage com  $^1\text{O}_2$ , e a ligação direta de grupos atraentes de elétrons no anel aromático diminuiria sua reatividade, sendo assim, pelo menos um, ou preferencialmente dois, grupos doadores de elétrons devem estar presentes nas posições 1,4 do anel para permitir a cicloadição [4+2] e estabilizar o endoperóxido.

A melhor posição para entrada de substituintes é a dos grupos metil do 1,4-dimetilnaftaleno, pois dessa forma há uma separação adequada entre o grupo hidrofílico e o anel naftalênico pela cadeia alquílica.

A Figura 4 mostra uma rota de síntese simples e versátil<sup>25-27</sup> e a Tabela 1 traz informações sobre solubilidade em água e constantes de velocidade de reação com  $^1\text{O}_2$  dos principais derivados de naftaleno com substituintes hidrofílicos.

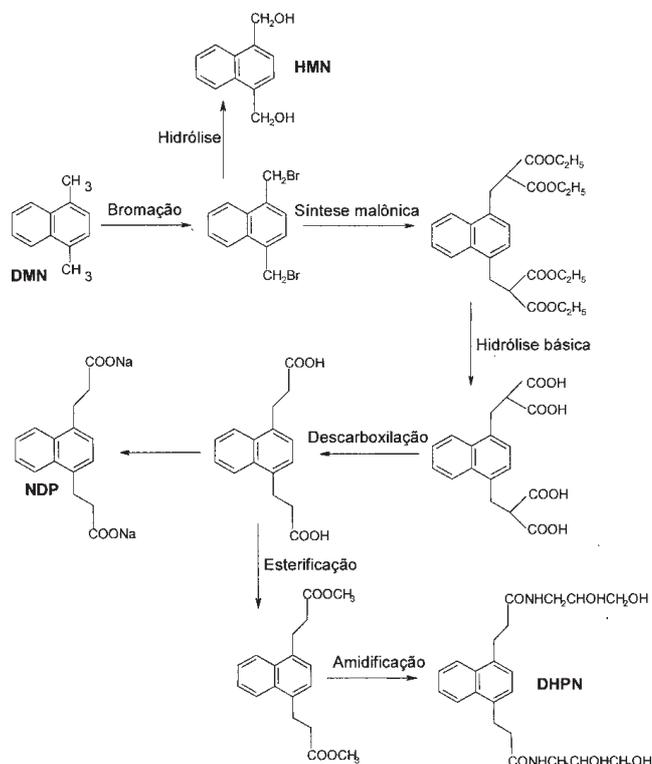


Figura 4. Estratégia de síntese para alguns derivados de naftaleno hidrossolúveis.

Tabela 1. Principais propriedades físico-químicas de alguns derivados de naftaleno.

	MNP	NDP	DHPN	MNEA	HMN
Solubilidade em água (M) <sup>a</sup>	10 <sup>-2</sup>	> 1	3.9x10 <sup>-2</sup>	> 1	0.95x10 <sup>-2</sup>
10 <sup>-5</sup> k <sub>t</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	70	28	10	14	4

a) Concentração em mol/L a temperatura de 20°C

b) constante de velocidade de reação (k<sub>t</sub>) dos derivados de naftaleno com  $^1\text{O}_2$  medidas por cinética rápida em água deuterada<sup>24,28</sup>.

Para explicar as diferenças de reatividade entre esses compostos, dois fenômenos devem ser considerados, a densidade eletrônica no anel naftalênico e efeitos estéricos dos substituintes.

Os efeitos eletrônicos devem ser considerados quando os grupos hidrofílicos estão muito próximos do anel naftalênico, pois dessa maneira o efeito atraente de elétron causados pelos átomos eletronegativos no MNEA e HMN tornam essas moléculas 5 e 17 vezes menos reativas com o  $^1\text{O}_2$  que o MNP, respectivamente.

Cadeias alquílicas mais longas (como no NDP e DHPN) aumentam a densidade eletrônica no anel, mas seu efeito estérico diminui sua reatividade quando comparados com o MNP.

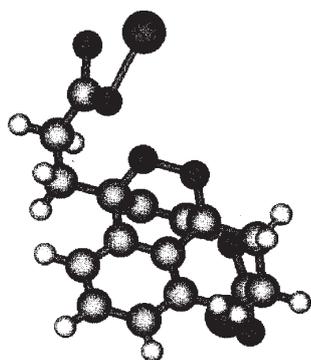
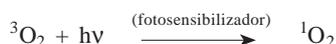


Figura 5. Estrutura tridimensional do NDPO<sub>2</sub> para exemplificar o efeito estérico do grupo substituinte na posição 1,4 do anel naftalênico.

## SÍNTESE DOS ENDOPERÓXIDOS A PARTIR DOS DERIVADOS DE NAFTALENO

Uma vez obtidos os derivados naftalênicos, duas fontes primárias de  $^1\text{O}_2$  podem ser usadas para preparar endoperóxidos em escala preparativa. O método fotoquímico convencional<sup>29</sup>:



E o método que emprega o desproporcionamento do peróxido de hidrogênio catalisado pelo molibdato<sup>30</sup>:



Em ambos os casos o processo de oxidação ocorre mais rapidamente em solventes deuterados (ex. água deuterada), uma vez que o tempo de vida do oxigênio singlete é maior nesse tipo de solvente<sup>31</sup>.

A escolha do método depende das propriedades físico-químicas do composto naftalênico. Para derivados de naftaleno com substituintes carboxilados, como MNP e NDP (Figura 3), o método químico é mais adequado, já que o endoperóxido formado pode ser recuperado por precipitação da forma ácida. Para outros derivados, a fotooxidação deve ser usada na condição que o fotosensibilizador possa ser eliminado no final do processo. Fotosensibilizadores mais usados são azul de metileno e rosa bengala.

A termólise do endoperóxido naftalênico ( $2\text{NO}_2 \rightarrow 2\text{N} + ^1\text{O}_2 + ^3\text{O}_2$ ) segue cinética de primeira ordem com constante de velocidade  $k$ , a Tabela 2 traz valores de  $t_{50\%}$  (tempo necessário para decompor 50% dos endoperóxidos) e  $t_{95\%}$  (tempo necessário para decompor 95% dos endoperóxidos). Os dados mostram que os endoperóxidos liberam seu oxigênio molecular dentro de 2h a 37°C; este valor é conveniente quando se trabalha com testes biológicos.

Uma parte do oxigênio formado durante a termólise está no estado excitado singlete e pode ser medido pela detecção do endoperóxido do rubreno-2,3,8,9-tetracarboxilato de tetrapotássio<sup>24,32</sup>. De maneira geral, pode-se dizer que todos endoperóxidos derivados de naftaleno liberam  $^1\text{O}_2$  com cerca de 50% de rendimento (Tabela 2).

Tabela 2. Termólise de endoperóxidos de derivados de naftaleno em água a 37°C.

	MNPO <sub>2</sub>	NDPO <sub>2</sub>	DHPNO <sub>2</sub>	MNEAO <sub>2</sub>	HMNO <sub>2</sub>
$t_{50\%}$ (min) <sup>a</sup>	23	23	23	22	70
$t_{95\%}$ (min) <sup>b</sup>	99	99	99	95	300
$^1\text{O}_2$ (%) <sup>c</sup>	45	50	59	65	51

<sup>a</sup> Tempo necessário para decompor 50% dos endoperóxidos

$t_{50\%} = \ln 2/k$

<sup>b</sup> Tempo necessário para decompor 95% dos endoperóxidos

$t_{95\%} = \ln 20/k$

<sup>c</sup> Rendimento acumulativo de  $^1\text{O}_2$  produzido na termólise.

## DANOS EM DNA PROMOVIDOS PELO OXIGÊNIO SINGLETE

Com o objetivo de caracterizar a natureza molecular dos danos em DNA e mutações em células de mamífero foi usado  $^1\text{O}_2$  gerado pela termodecomposição do NDPO<sub>2</sub><sup>15</sup>. A reatividade do  $^1\text{O}_2$  em relação aos ácidos nucleicos tem sido amplamente discutida<sup>3,33-35</sup> e quebras em fitas e sítios álcali-lábeis foram identificados em DNA exposto a diferentes fontes de  $^1\text{O}_2$ , incluindo NDPO<sub>2</sub><sup>15,36</sup>. Sítios de oxidação de guaninas foram encontrados adjacentes as quebras fosfodiéster<sup>34</sup>. Usando modelos "in vitro", tratados com NDPO<sub>2</sub>, foi mostrado que DNA polimerases podiam parar de replicar fitas simples de DNA que continham lesões induzidas por  $^1\text{O}_2$ <sup>37,38</sup>. Estas lesões em DNA são candidatas pré-mutagênicas "in vivo", e a mutagenicidade do  $^1\text{O}_2$  foi reportada em bactérias<sup>39</sup> e em células de mamíferos<sup>40</sup>. Assim como NDPO<sub>2</sub>,  $^1\text{O}_2$  pode ser gerado pela termodecomposição do DHPNO<sub>2</sub>, que libera  $^1\text{O}_2$  sob incubação a 37°C<sup>41</sup>.

Em DNA,  $^1\text{O}_2$  reage preferencialmente com resíduos de desoxiguanosina, levando a formação de diferentes produtos de reação (Figura 6): dois 4R\* e 4S\* diastereoisômeros de 4-hidroxi-8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (4-OH-8-oxodGuo) e a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) que uma vez produzida reage dez vezes mais rápido com  $^1\text{O}_2$  gerando ácido cianúrico, 2,2-diamino-4-[-(2-desoxi-β-D-eritropentafuranosil)amina]-5-(2H)-oxazolona (Oxazolona) e os diastereoisômeros 4R\* e 4S\* da 4-OH-8-oxodGuo<sup>42,43</sup>.

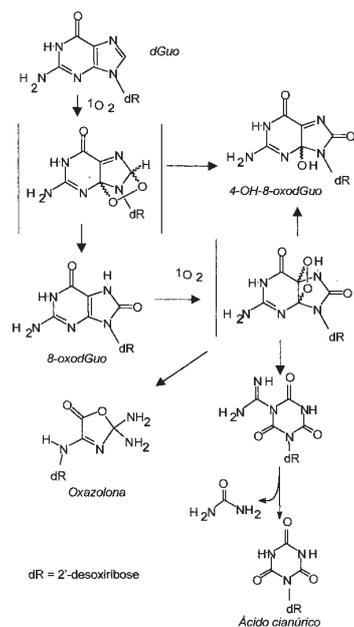


Figura 6. Principais produtos de oxidação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) gerados por oxigênio singlete.

Quando o objetivo é estudar, por exemplo a interação do  $^1\text{O}_2$  com membranas biológicas, o endoperóxido do DMN (Figura 4) torna-se uma ferramenta mais adequada para esse tipo de ambiente apolar<sup>44</sup>.

## CONCLUSÃO

Em função das dificuldades envolvidas em obter  $^1\text{O}_2$  livre de outros contaminantes reativos, existe uma escassez de estudos detalhados sobre os aspectos da bioquímica do  $^1\text{O}_2$ . O objetivo deste trabalho foi apresentar uma ferramenta útil para gerar  $^1\text{O}_2$ . Os endoperóxidos de derivados de naftaleno solúveis em água cumprem este papel, pois suas propriedades físico-químicas são adequadas para o uso como fonte química de  $^1\text{O}_2$  em meio biológico.

## AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa de Apoio aos Núcleos de Excelência (PRONEX/FINEP). G.R.M. é bolsista da FAPESP.

## REFERÊNCIAS

1. Frimer, A. A. In *Singlet O<sub>2</sub>*, CRC Press; Boca Raton, 1985, Vol. I, II.
2. Boveris, A.; Cadenas, E.; Chance, B.; *Fed. Proc.* **1981**, 40, 195.
3. Sies, H.; *Mut. Res.* **1993**, 299, 183.
4. Menck, C. F. M.; Di Mascio, P.; Agnez, L. F.; Ribeiro, D. T.; Oliveira, R. C.; *Quim. Nova* **1993**, 16, 328.
5. Di Mascio, P.; Medeiros, M. H. G.; Bechara, E. J. H.; Catalani, L. H.; *Ciência e Cultura* **1995**, 47, 297.
6. Di Mascio, P.; Bechara, E. J. H.; Medeiros, M. H. G.; Briviba, K.; Sies, H.; *FEBS Lett.* **1994**, 355, 287.
7. Briviba, K.; Saha-Möller, C. R.; Adam, W.; Sies, H.; *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1996**, 38, 647.
8. Cilento, G. In *Chemical and biological generation of excited states*; Adam, W.; Cilento, G., Eds.; Academic Press; New York, 1982, p. 279.
9. Steinbeck, M. J.; Khan, A. U.; Karnovsky, M. J.; *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 15649.
10. Corey E. J.; Mehrotra M. M.; Khan A. U.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, 145, 842.
11. Fridovich, I.; Handler, P.; *J. Biol. Chem.* **1958**, 233, 1581.
12. Held, A. M.; Halko, D. J.; Hurst J. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 5732.
13. Aubry, J. M.; Cazin, B.; *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 2013.
14. Foote, C. S. In *Free rad. biol.*, Pryor, W. A. Ed.; Academic Press, N. Y., 1986; vol. 2, p. 85.
15. Di Mascio, P.; Sies, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 2909.
16. Sies, H.; Menck, C. F. M.; *Mut. Res.* **1992**, 275, 367.
17. Moureu, C.; Dufraisse; Dean, P. M.; *C R Acad. Sci.* **1926**, 182, 1584.
18. Dufraisse; Velluz, L.; *C R Acad. Sci.* **1939**, 208, 1822.
19. Wasserman, B. H.; Larsen, D. L.; *J. Chem. Soc. Comm.* **1972**, 253.
20. Aubry, J. M.; In *Membrane Lipid Oxidation*; Vigo-Pelfrey, C., Ed., CRC Press, Boca Raton, 1991, Vol 2, p 65.
21. Müller, K.; Zierys, K.; *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1992**, 325, 219.
22. Nieuwint, A. W. M.; Aubry, J. M.; Arwert, F.; Kortbeek, H.; Herzberg, S.; Joenje, H.; *Free Rad. Res. Commun.* **1985**, 1, 1.
23. Matsuura, T.; Inoue, K.; *Free Rad. Res. Commun.* **1987**, 2, 327.
24. Pierlot, C.; Hajjam, S.; Barthélémy, C.; Aubry, J. M.; *J. Photochem. Photobiol. B* **1996**, 36, 31.
25. Dewilde, A.; Pellieux, C.; Pierlot, C.; Wattré P.; Aubry, J. M.; *Biol. Chem.* **1998**, 379, 1377.
26. Marvel, C. S.; Wilson, B. D.; *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 726.
27. Lock, G.; Walter, E.; *Chem. Ber.* **1942**, 75B, 1158.
28. Aubry, J. M.; Mandard-Cazin, B.; Rougee, M.; Bensasson, R. V.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9159.
29. Wasserman, B. H. In *Singlet oxygen*, Murray, R. W., Ed., Academic Press, New York, 1979.
30. Aubry, J. M.; Cazin, B.; Duprat, F.; *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 726.
31. Kajiwarra, T.; Kearns, D. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 5886.
32. Aubry, J. M.; Rigaudy, J.; Nguyen, K. C.; *J. Photochem. Photobiol.* **1981**, 33, 149.
33. Di Mascio, P.; Wefers, H.; Do-Thi, H-P.; Lafleur, M. V. M.; Sies, H.; *Biochem. Biophys. Acta.* **1989**, 1007, 151.
34. Cadet, J.; Berger, M.; Douki, T.; Morin, B.; Raoul, S.; Ravanat, J-L.; Spinelli, S.; *Biol. Chem.* **1997**, 378, 1275.
35. Briviba, K.; Klotz, L. O.; Sies, H.; *Biol. Chem.* **1997**, 378, 1259.
36. Blazek, E. R.; Peak, J. G.; Peak, M. J.; *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 606.
37. Piette, J.; Calberg-Bacq, C.M.; Lopez, M.; Van de Vorst, A.; *Biochem. Biophys. Acta.* **1984**, 781, 257.
38. Ribeiro, D. T.; Bourre, F.; Sarasin, A.; Di Mascio, P.; Menck, C. F. M.; *Nucleic. Acids Res.* **1992**, 20, 2465.
39. Di Mascio, P.; Menck, C. F. M.; Nigro, R. G.; Sarasin, A.; Sies, H.; *Photochem. Photobiol.* **1990**, 51, 293.
40. Ribeiro, D. T.; Madzak, C.; Sarasin, A.; Di Mascio, P.; Sies, H.; *Photochem. Photobiol.* **1992**, 55, 39.
41. Pierlot, C.; Aubry, J. M.; Briviba, K.; Sies, H.; Di Mascio, P.; *Methods Enzymol.* **2000**, 319, 3.
42. Ravanat, J-L.; Cadet, J.; Araki, K.; Toma, H. E.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P.; *Photochem. Photobiol.* **1998**, 68, 698.
43. Sheu, C.; Foote, C. S.; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6439.
44. Di Mascio, P.; Catalani, L. H.; Bechara, E. J. H.; *Free Rad. Med.* **1992**, 12, 471.