

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOQUÍMICA E GENOTÓXICA DE

AMINONAFTOQUINONAS

LUIS FERNANDO DA COSTA MEDINA

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre

2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOQUÍMICA E GENOTÓXICA DE
AMINONAFTOQUINONAS

LUIS FERNANDO DA COSTA MEDINA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientador: João Antonio Pêgas Henriques

Co-orientador: Adriano Brandelli

Porto Alegre, novembro de 2006

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA - UFRGS), Laboratório de Novos Materiais Orgânicos do Instituto de Química (IQ – UFRGS) e do Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia – Instituto de Biociências (IB – UFRGS). O projeto foi subvencionado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia (GENOTOX) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho
aos meus filhos Lucas e Arthur
e a minha esposa Edyane

AGRADECIMENTOS

Aos Professores João Henriques, Adriano Brandelli e Valter Stefani, pela contribuição na minha formação acadêmica e principalmente pela amizade.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao Prof. Aldo, pelos ensinamentos.

Ao Elmo e Ellen por estarem sempre prontos a ajudar.

As amigas Amanda e Florência do laboratório 218 do ICTA e a todos os demais colegas que passaram por lá nestes seis anos de convivência.

Aos amigos Fabiano e Lê e aos demais integrantes do laboratório K204.

À amiga Jaqueline Cardone (Tia Jaque) pela oportunidade de aprender a respeitar o sentimento do próximo.

À amiga Cassiana, porque as vezes vale a pena...

Aos amigos do ICTA Júlio, Luis Henrique, Bitu, Gordilo, Eduardo e Plinho.

Aos colegas do grupo de Radiobiologia Nico, Rafael, Nupi, Renato, Jaque, Fabrício, Renata, Cláudio, Ana Catarina, Ana, Albanin, Diego e em especial a Dinara Moura.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia Irina, Paulo, Milton, Ricardo, Giancarlo e meninas do Lab. de Bio. Mol. Vegetal.

À Renata Medina (prima) pela nova amizade e apoio neste trabalho.

Ao Edy, Vera, Gabi, Zé, Caco, Daniel, Marta e a Bisa, pelo apoio em todas as horas.

Ao meu irmão, tios e primos, prontos a me apoiar, especialmente nos momentos difíceis.

Ao prof. Dr Zé Cláudio e Alfeu Zanotto, pelo apoio nos experimentos de NBT e pelas novas perspectivas.

À minha esposa Edyane e ao Lucas e Arthur, por cada instante desta trilha que percorremos juntos e continuaremos por muitos e muitos anos...

Tudo tem um início. Ninguém jamais leria esta tese se em 1986 eu não assistisse a palestra da Prof. Nance e também ao conselho da amiga Mercedes. Muito obrigado.

INDICE GERAL

INDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	14
1 Introdução.....	15
1.1 Naftoquinonas.....	15
1.2 Ocorrência das naftoquinonas.....	16
1.3 Atividade antimicrobiana das naftoquinonas.....	17
1.4 Mecanismo de ação das naftoquinonas.....	19
1.5 Atividade mutagênica das naftoquinonas.....	22
1.6 Atividade mutagênica das naftoquinonas em procariotos.....	24
1.7 Atividade mutagênica das naftoquinonas em eucariotos.....	26
1.7.1 Mutagênese e toxicidade em leveduras.....	26
1.7.2 Mutagênese em células de mamíferos.....	27
1.8 Aminonaftoquinonas.....	29
CAPÍTULO II – OBJETIVOS.....	33
CAPÍTULO III.....	35
“Aminonaphthoquinones induces oxidative stress in <i>Staphylococcus aureus</i> ”	
CAPÍTULO IV.....	44
“Genotoxicity of aminonaphthoquinones in bacteria, yeast and mammalian cells”	
CAPÍTULO V- DISCUSSÃO GERAL.....	75
5 Discussão geral.....	76
5.1 Citotoxicidade das aminonaftoquinonas.....	77

5.2 Mutagênese e recombino gênese das naftoquinonas.....	78
5.3 Atividade bioquímica da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona e 1,4-naftoquinona na bactéria <i>Staphylococcus aureus</i>	79
5.4 Ensaio cometa.....	81
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....	83
CAPITULO VII – PERPECTIVAS.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da 1,2-naftoquinona (A) e 1,4-naftoquinona (B).....	15
Figura 2 -Estrutura química da atovaquona.....	18
Figura 3 - Estrutura química da buparvaquona.....	19
Figura 4 - Processo de redução enzimático das naftoquinonas. A reação I demonstra o processo de redução que é realizado pela DT-diaphorase e na reação II pelo citocromo P-450 reductase.....	20
Figura 5 - Ligação do 1,2-naftoquinona com a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina. Adaptado de MacCoull <i>et al.</i> (1999).....	23
Figura 6 - Síntese da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona e 5-amino-2,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona.....	30
Figura 7 - Redução da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona promovida pelo <i>Staphylococcus aureus</i>	32
Figura 8 - Mecanismo citotóxico proposto para ANQ. Modificado de Bolton <i>et al.</i> (2000).....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

NQ	1,4-naftoquinona
ANQ	5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona
ANQ-OH	5-amino-2,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona
NTZ	5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona
ERO	espécies reativas de oxigênio
HIV	<i>humam immunodeficiency virus</i> (vírus da imunodeficiência humana)
ATP	Adenina trifosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
8-oxo-dGua	8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
SOD	superóxido dismutase
GSH	glutathiona
tk	timidina quinase
<i>hprt</i>	hipoxantina fosforibosil-transferase
CHO	células de ovário de hamster Chinês
FPG	formamidopirimidina glicosilase
ENDOIII	endonuclease III

RESUMO

As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza e várias destas moléculas tem um papel importante na produção de energia, através da fotossíntese e respiração celular. No entanto, a atividade biológica de naftoquinonas com grupamentos amino é pouco investigada em células procarióticas e eucarióticas.

No presente trabalho nós estudamos a atividade biológica da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (ANQ) em comparação com a 1,4-naftoquinona (NQ) na bactéria *Staphylococcus aureus*. ANQ e NQ inibem o crescimento do *S. aureus* nas concentrações de 50 e 10 µg/mL, respectivamente. O efeito antimicrobiano das naftoquinonas diminui na presença de ascorbato de sódio, por outro lado o ácido 4,5-dihidroxi-1,3-benzeno-sulfônico (Tiron), um antioxidante específico para o ânion superóxido foi capaz de proteger o *S. aureus* somente dos efeitos da ANQ. A ANQ e NQ bloqueiam o consumo de oxigênio e com a cadeia respiratória bloqueada com cianeto induzem o consumo de oxigênio. Os ensaios realizados com a presença das naftoquinonas se verificou que estes compostos induzem peroxidação de lipídios, sendo demonstrado pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobabútrico. Estes resultados mostram que estes compostos atuam como aceptores de elétrons e induzem a formação de espécies reativas de oxigênio, que são tóxicas para o *S. aureus*.

Com a proposta de elucidar a atividade mutagênica da ANQ e da 5-amino—2,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona (ANQ-OH) em comparação com a NQ, nós utilizamos o ensaio *Salmonella*/microsoma. A genotoxicidade e o potencial recombinogênico foram analisados nas linhagens haplóide e diplóide da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. No ensaio *Salmonella*/microsoma a NQ não foi mutagênica, enquanto as aminonaftoquinonas apresentaram uma fraca mutagênese nas linhagens TA98 e TA102. Na linhagem haplóide, somente NQ induziu mutagênese. Na diplóide, as naftoquinonas não induziram eventos recombinacionais. Os resultados sugerem que as aminonaftoquinonas são fracos agentes mutagênicos em células procarióticas. Além disto, a genotoxicidade destes compostos foi determinada utilizando o ensaio Cometa (*single cell gel* – SCG) e o ensaio Cometa modificado com as enzimas formamidopirimidina DNA-glicosilase (FPG) e endonuclease III (ENDOIII) em células de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês (células V79). Em

nosso estudo foi demonstrado que ANQ e NQ induzem danos oxidativos no DNA das células V79, como apresentado no ensaio na presença de enzimas. O pós-tratamento com ENDOIII e FPG não reconhecem danos promovidos pela ANQ-OH, quando comparado com o ensaio cometa padrão. Além disso, todas as naftoquinonas apresentaram genotoxicidade nas células V79 em presença de ativação metabólica. Nas células de mamíferos, NQ e ANQ são agentes genotóxicos, enquanto ANQ-OH é genotóxico somente com metabolização.

O conjunto destes resultados reforça que ANQ e NQ produzem o radical superóxido e demonstra que o grupamento amino na posição 5 não elimina a capacidade da ANQ em produzir espécies reativas de oxigênio. Por fim, nós podemos afirmar que a citotoxicidade e genotoxicidade destes compostos é pela produção de danos oxidativos em todos os sistemas celulares.

ABSTRACT

Naphthoquinones are widely distributed in nature and some of these molecules have an important role in the biochemistry of microbial energy production, by means of photosynthesis and respiratory chain. However, the biological activity of naphthoquinones amino derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells is poorly investigated.

In the present work we have studied the biological activity of 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone (ANQ) on *Staphylococcus aureus* in comparison with unsubstituted 1,4-naphthoquinone (NQ). Complete inhibition of microbial growth was observed with ANQ and NQ at 50 and 10 µg/mL, respectively. The antibacterial effect of naphthoquinones decrease in presence of sodium ascorbate, but the superoxide scavenger 4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid (Tiron) was able to protect *S. aureus* only from the harmful effect of ANQ. Naphthoquinones blocked oxygen uptake and induced-cyanide insensitive oxygen consumption. Assays in presence of naphthoquinones induced an increase of lipid peroxidation in *S. aureus*, as determined by thiobarbituric acid reactive substances. These results showed that 1,4-naphthoquinones effectively act as electron acceptor and induced an increase in reactive oxygen species that are toxic to *S. aureus* cells.

In order to elucidate the mutagenic activity of ANQ and 5-amino-2,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (ANQ-OH) in comparison with the unsubstituted 1,4-naphthoquinone (NQ) we have employed the *Salmonella* microsome/assay. The genotoxic and recombinogenic potential effects were analysed in haploid and diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains. In *Salmonella* microsome/assay the NQ was not mutagenic while the aminonaphthoquinones were weakly mutagenic in TA98 and TA102 stains. In haploid yeast, only NQ showed a mutagenic response. In diploid yeast, the naphthoquinones did not induce any recombinogenic events. All these results suggest that aminonaphthoquinones are weak mutagenic agents only in prokaryotic cells. Moreover, the genotoxicity of these compounds was determined using standard Comet assay (single-cell gel – SCG) and modified Comet assay with bacterial enzymes formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG) and endonuclease III (ENDOIII) in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells. Our study demonstrated that ANQ and NQ induced oxidative DNA damage in V79 cells as shown in comet assay with the lesion-specific enzymes. Post-treatment with

ENDOIII and FPG proteins had not significant effect on ANQ-OH-induced oxidative DNA damage when compared to standard alkaline comet assay. Besides, all naphthoquinones showed genotoxic effect on V79 cells in presence of metabolic activation. In mammalian cells, NQ and ANQ are genotoxic agents and ANQ-OH is genotoxic only in presence of metabolic activation. Taken together these results reinforce that ANQ and NQ produce superoxide radicals and reveal that amino group in position 5 does not abolish the ability of ANQ in producing reactive oxygen species. Finally, we were able to affirm that cytotoxicity and genotoxicity of these compounds is promoted by oxidative damage despite the cell system.

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1 Naftoquinonas

As naftoquinonas são compostos dicetônicos derivados do naftaleno que pertencem à família das quinonas. Estes compostos possuem dois grupos carbonílicos normalmente nas posições 1,2 ou 1,4 do anel naftaleno (Figura 1).

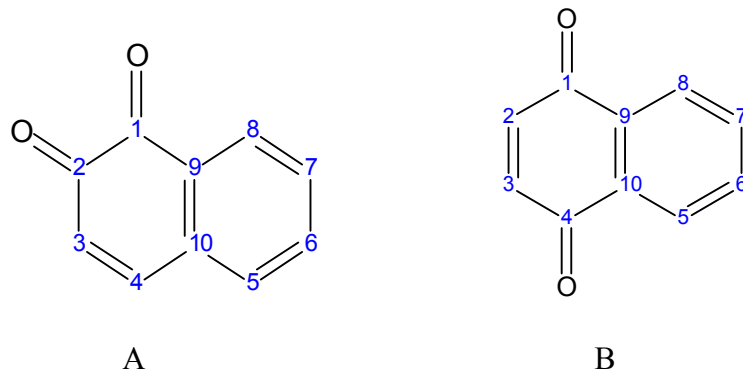


Figura 1: Estrutura química da 1,2-naftoquinona (A) e 1,4-naftoquinona (B).

Os primeiros relatos da utilização pelo homem de extratos de plantas que possuem naftoquinonas datam do antigo Egito (cerca de 4000 anos). O extrato da folha de *Lawsonia*

inermis que contém a lawsona era empregado como “cosmético”, sendo utilizado na pintura de cabelos, pele e unhas. Posteriormente, o extrato também passou a ser aproveitado no tratamento de micoses e feridas. Na Grécia, entre os séculos V e IV a.C., o uso do extrato obtido a partir da raiz de *Alkanna tinctoria*, rico em chiconina, era utilizado no tratamento de úlceras, feridas, ferimentos de guerra e picadas de cobra (para revisão ver, Papageorgiu *et al.* 1999; Simões, 2004). A partir do século XIX, estes compostos adquiriram importância para a indústria, sendo empregados como corantes de alimentos, indicadores de pH e, posteriormente, como produto de partida para síntese de cristais líquidos (Santos, 1998).

1.2 Ocorrência das naftoquinonas

As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, fungos, animais, e principalmente em vegetais, participando de diversos processos biológicos (Simões, 2004).

Nas eubactérias e arquea estas substâncias são constituintes da membrana plasmática, possuindo papel fundamental no transporte de elétrons da cadeia respiratória e no dobramento de proteínas de vários gêneros (Collins, 1981; Bader *et al.* 1999). Estes compostos também são encontrados no centro de reação fotossintética de bactérias púrpuras (anoxigênica) e das cianobactérias (oxigênicas). Na fotossíntese, assim como na cadeia respiratória, atuam como carreador intermediário dos elétrons (Breton, 1997; Sakuragi *et al.* 2002).

Em fungos, as naftoquinonas são produzidas para realizar atividades específicas. O fungo lignolítico *Pleurotus eryngii* utiliza naftoquinonas para gerar espécies reativas de

oxigênio no meio extracelular para auxiliar na degradação de lignina. Neste processo, o *P. eryngii* reduz, via enzimática, a quinona a semiquinona e pelo ciclo redox gera o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Guillen *et al.* 1997). Por outro lado, Heiser *et al.* (1998) observaram que o *Fusarium sp* emprega as naftoquinonas para facilitar a invasão em plantas cítricas como limoeiros e laranjeiras.

Nos vegetais, as naftoquinonas apresentam atividade biológica mais diversificada. Estão presentes no fotossistema II, realizando a fotossíntese, como descrito acima para as bactérias fotossintéticas. Além desta importante atividade, estes compostos são produzidos pelas plantas para a defesa de agentes infecciosos (Brigham *et al.* 1999), metabólicos secundários, processos alelopáticos e como precursora de isoprenóides (Gaisser, 1996).

Em relação à distribuição entre os vegetais, a maior parte das naftoquinonas conhecidas ocorre nas famílias Bignoniaceae, Juglandaceae, Plumbaginaceae e Droseraceae, entre outras. A extração a partir do material vegetal geralmente não apresenta problemas, sendo realizada com clorofórmio ou acetona (Simões, 2004).

1.3 Atividade antimicrobiana das naftoquinonas

As naftoquinonas e seus derivados, de modo geral, são antimicrobianos de amplo espectro de ação frente a microrganismos procarióticos, inibindo bactérias Gram-negativas tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora* (Alake, 1994; Medina *et al.* 2004) e Gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, incluindo isolados metilina resistentes (Riffel *et al.* 2002; Machado *et al.* 2003; Brandelli *et al.* 2004).

O estudo destes compostos contra microrganismos eucarióticos é de grande importância, uma vez que, para muitos protozoários ainda não existem tratamentos plenamente satisfatórios. Entre estes compostos a atovaquona (Figura 2) se destaca por ser a única naftoquinona a inibir vários protozoários. Ela é especialmente efetiva no tratamento de infecções de *Pneumocystis carinii* e em combinação com proguanil no tratamento da malária (Baggashi & Hill, 2002).

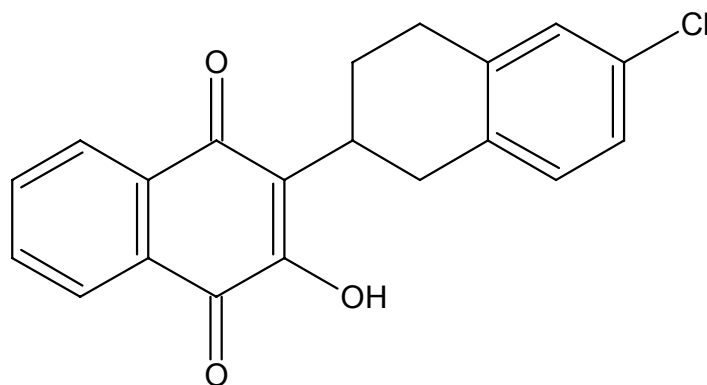


Figura 2: Estrutura química da atovaquona.

Outra substância que possui aplicação no tratamento contra protozoários é a buparvaquona (Figura 3). Este composto inibe *Leishmania dovani in vitro*, embora perca a capacidade de proteger camundongos infectados, devido a sua baixa solubilidade (Croft *et al.* 1992). No entanto, a sua elaboração como buparvaquona-3-fosfato, uma forma mais solúvel, demonstrou-se efetiva para inibir as formas promastigota e amastigota de *Leishmania sp. in vivo*, inclusive sendo rapidamente absorvida pela pele humana (Mantylã *et al.* 2004).

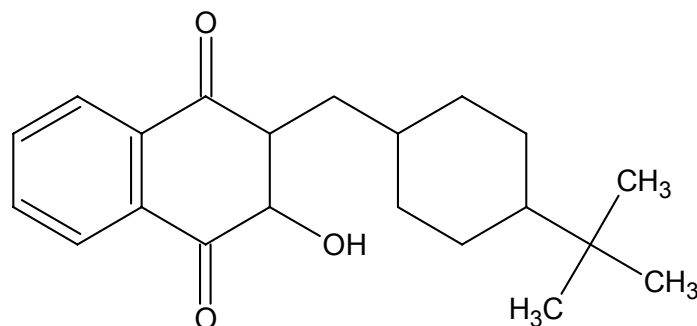


Figura 3: Estrutura química da buparvaquona.

Em relação a naftoquinonas com atividade antiviral, foram realizados inúmeros trabalhos identificando compostos capazes de inibir enzimas virais como protease do HIV, *Herpes simplex*, citomegalovirus e a integrase do HIV (Ertl *et al.* 1999; Tadon *et al.* 2004; Tnadon *et al.* 2005; Stagliano *et al.* 2006).

1.4 Mecanismo de ação das naftoquinonas

O mecanismo de ação das naftoquinonas nos sistemas biológicos ainda não foi totalmente elucidado. A citotoxicidade é explicada pela capacidade destas substâncias de: (i) produzirem espécies reativas de oxigênio (ERO) como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), (ii) reagirem com componentes eletrofílicos das células como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Nutter *et al.* 1992; Öllinger & Brunk, 1993; Silva *et al.*, 2003, Cojocel *et al.* 2006).

O processo de formação de ERO pelas naftoquinonas nas células ocorre porque estes compostos são reduzidos enzimaticamente (Figura 4), formando uma semiquinona pelo ganho de um elétron. A semiquinona formada apresenta a capacidade de autooxidar-se

e de reagir com o oxigênio para oxidar a quinona (Jarabak & Jarabak, 1995). Este processo normalmente é promovido pelo citocromo P-450 redutase. Por outro lado, as naftoquinonas também podem ser reduzidas pela DT-diaforase ou NAD(P)H:quinona oxireductase (EC 1.6.99.2). Neste caso, ocorre a transferência de dois elétrons, formando uma hidroxiquinona, que é menos reativa, sendo esta uma das formas de eliminação destes compostos (Zhou *et al.*, 2003).

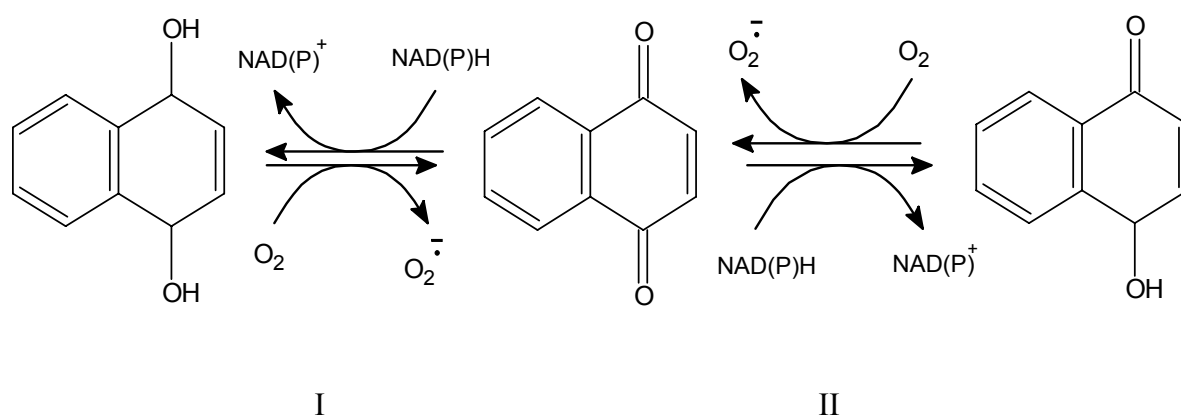


Figura 4: Processo de redução enzimática das naftoquinonas. A reação I demonstra o processo de redução que é realizado pela DT-diaforase e na reação II pelo citocromo P-450 redutase.

A capacidade destes compostos produzirem ERO está associada a várias propriedades da molécula, tais como: o seu potencial de redução, os substituintes presentes, bem como a posição em que se encontram. Öllinger & Brunmark (1991), avaliando a presença do substituinte hidroxila ligado em diferentes posições na molécula 1,4-naftoquinona em hepatócitos de rato, observaram que: (i) a capacidade de produzir ERO é influenciada pela quantidade de substituintes presentes na molécula, (ii) a substituição no

anel quinônico com hidroxila diminui a toxicidade, enquanto no anel benzeno aumenta, (iii) a polaridade da molécula interfere no consumo de oxigênio, (iv) os compostos com hidroxila no anel benzeno causam alta oxidação da glutathione, formando a glutathione dissulfeto, diminuindo a capacidade da célula na remoção de radicais livres. Outro trabalho que ilustra a importância dos substituintes na toxicidade destes compostos foi realizado por Munday *et al.* (1995). Neste estudo, foram analisados diferentes substituintes ligados aos carbonos C2 e C3, e foi verificado que as dialquilnaftoquinonas, ao contrário das monoalquilnaftoquinonas, não oxidavam a glutathione.

Outra propriedade interessante das naftoquinonas é a capacidade de interferir na cadeia de transporte de elétrons. Além de serem componentes da cadeia respiratória de vários gêneros bacterianos, estes compostos inibem o transporte de elétrons em várias espécies de protozoários, levando o organismo à morte. O seu uso interrompe seletivamente a passagem dos elétrons entre a ubiquinona e o citocromo *bc1* (complexo III) nestes organismos. Conseqüentemente a esta inibição, ocorre a perda de potencial de membrana da mitocôndria levando a perda de produção de ATP pela célula e por fim, a morte (Baggish & Hill, 2002). Contrariamente ao bloqueio da cadeia respiratória, Bogdanov *et al.* (1996) e Hariguchi *et al.* (1997) demonstraram que as naftoquinonas também podem “estimular” a cadeia respiratória de bactérias. Ao incubar o microrganismo com os compostos, estes autores observaram que ocorria o aumento do consumo de oxigênio dissolvido no meio. Ao bloquear a cadeia respiratória com cianeto de potássio e na presença da naftoquinona havia ainda consumo de oxigênio, indicando que o consumo era realizado extra cadeia respiratória. Considerando a característica destas moléculas, foi sugerido que o oxigênio consumido tenha doado elétrons para elas, transformando-se no ânion superóxido.

1.5 Atividade mutagênica das naftoquinonas

As propriedades citotóxicas das naftoquinonas, embora não totalmente elucidadas, são melhores compreendidas que os mecanismos mutagênicos. Inicialmente o interesse por obter informações quanto à mutagenicidade era porque extratos de plantas ricos nestes compostos eram empregados na medicina popular, como corantes e pela semelhança aos policíclicos aromáticos, que já eram bem conhecidos como agentes causadores de câncer (Tikkanen *et al.* 1983).

Chesis *et al.* (1984) utilizando a linhagem TA104 de *Salmonella typhimurium*, que é sensível a danos oxidativos e a enzima DT-diaforase, demonstraram que a menadiona não induzia mutagênese nesta linhagem. Entretanto, ao realizar o mesmo experimento na presença da enzima NADPH-citocromo P-450 redutase, verificaram que a menadiona causava danos no DNA pela produção de espécies reativas de oxigênio. Recentemente, Lin *et al.* (2005) demonstraram que a 1,2- e a 1,4-naftoquinonas em combinação com NADPH ou íons de cobre causam a formação de sítios abásicos em DNA de timo bovino. Em adição, a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dGua) pela 1,2-naftoquinona é aumentada na presença de NADH ou íons cobre. Neste processo, o consumo de oxigênio e NADPH estão diretamente relacionados a geração da 8-oxo-dGua (Park *et al.* 2005).

Ao estudar a capacidade de aromáticos policíclicos de reagir com o DNA, MacCoull e colaboradores (1999) purificaram e caracterizaram a reação entre a 1,2-naftoquinona e a base guanina. O produto identificado foi a 7-(1,2-naftoquinona-4-il)-guanina. Portanto, o carbono da posição 4 da 1,2-naftoquinona reage com o nitrogênio 7 da guanina (Figura 5).

Além deste produto, os autores sugerem que outras reações possam ocorrer também, embora estas não tenham sido caracterizadas.

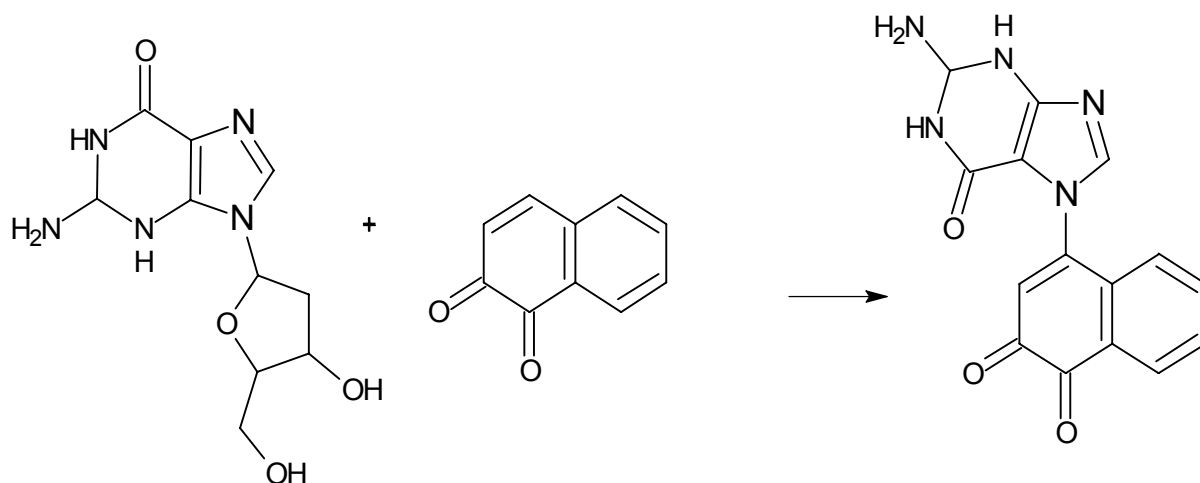


Figura 5: Ligação do 1,2-naftoquinona com a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina.

Adaptado de MacCoull *et al.* 1999.

Por fim, em ensaios *in vitro*, empregando 1,2-naftoquinona foi demonstrado que este composto interage fracamente com o DNA e pode promover quebras duplas (Afrasiabi *et al.* 2005).

1.6 Atividade mutagênica das naftoquinonas em procariotos

Vários trabalhos investigando a atividade mutagênica das naftoquinonas em células procarióticas foram realizados nas últimas décadas. Entre os mais importantes está o ensaio com *Salmonella/microsoma*. Este teste mede a indução de mutações reversas em diferentes linhagens auxotróficas de *Salmonella typhimurium*. A mutação reversa fundamenta-se na restauração do gene que codifica para a enzima requerida na síntese do aminoácido histidina. As linhagens mais empregadas neste ensaio são a TA97a e TA98, que detectam agentes mutagênicos que induzem mudança no quadro de leitura (mutação *frameshift*). As linhagens TA100 e TA102 detectam mutagênicos que causam substituição de pares de bases no DNA, sendo que a TA102 é sensível principalmente a agentes mutagênicos oxidativos, formas ativas de oxigênio e agentes alquilantes (para revisão, ver Mortelmans & Zeiger, 2000).

Em relação a atividade mutagênica das naftoquinonas, o mecanismo proposto por Chesis e colaboradores (1984) é que estes compostos causam mutações por danos oxidativos. Estes autores observaram que a redução da menadiona por um elétron, promovido pela enzima NADPH-citocromo P-450 redutase, aumentava a mutagênese na linhagem TA104 no ensaio *Salmonella/microsoma*. Além disto, ao adicionar as enzimas superóxido dismutase e catalase notaram que a mutagênese promovida pela menadiona era reduzida, demonstrando que este processo produzia o radical superóxido e peróxido de hidrogênio.

Por outro lado, Tikkanen *et al.* (1983) demonstram que a presença de um ou dois grupamentos hidroxila e/ou metila, bem como a posição em que estão ligados na naftoquinona são importantes para induzir mutações na linhagem TA98 (alteração do

quadro de leitura) com ativação metabólica. Em adição, Hakura *et al.* (1994) mostraram que a magnitude da mutagenicidade das naftoquinonas dependia dos substituintes presentes na molécula. A presença de halogênios (2,3-dicloro-1,4-naftoquinona) aumentava a atividade mutagênica na linhagem TA104 (sensível a agentes oxidantes), seguido pelas naftoquinonas sem substituintes e com as que apresentam o grupamento hidroxila (5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona).

Em relação à atividade mutagênica de dois importantes compostos (henna e menadiona), os resultados descritos na literatura foram conflitantes. Tikkanen *et al.* (1983) observou que a henna induzia mutações na linhagem TA98 com ativação metabólica e a menadiona não apresentava mutagenicidade para a linhagem TA100 sem S9-mix. Contrariamente, Hakura *et al.* (1994) não constataram efeito mutagênico para a henna com ativação metabólica na linhagem TA98 e que a menadiona induzia mutações do tipo *frameshift* na linhagem TA100 sem ativação metabólica. Estes resultados contraditórios foram associados a componentes da fração de fígado de rato (S9-mix), empregado no ensaio com ativação metabólica e a componentes envolvidos na mutagênese das naftoquinonas, presentes nas linhagens testadas (Hakura *et al.* 1994).

Por fim, o conjunto dos resultados obtidos por diferentes autores, sugere de modo geral que estes compostos são agentes mutagênicos fracos para células procarióticas. (Tikkanen *et al.* 1983, Sakai *et al.* 1984; Hakura *et al.* 1994, Chatterjee *et al.* 1998; Kirkland & Marzin, 2003).

1.7 Atividade mutagênica das naftoquinonas em eucariotos

1.7.1 Mutagênese e toxicidade em levedura

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo eucariótico de crescimento rápido e genoma conhecido e por ser empregado em diversos processos industriais, há um grande conhecimento acumulado de sua genética e fisiologia, sendo de grande utilidade na determinação de agentes mutagênicos ambientais ou farmacológicos (Poli *et al.* 1999, Teerziyska *et al.* 2000).

Os ensaios de mutação reversa são os mais empregados com a levedura *S. cerevisiae*. Baseiam-se na restauração ou compensação de um gene responsável por um determinado aminoácido (Zimmermann, 1975, Boeira *et al.* 2002). Além deste ensaio, linhagens diplóides heterozigotas de *S. cerevisiae* podem ser empregadas para detecção de eventos recombinacionais como *crossingover* e conversão gênica (Kupiec, 2000).

No estudo da atividade mutagênica da mitomicina c em levedura, Rossi e colaboradores (1997) constataram que a reversão e conversão gênica aumentavam com alta concentração citocromo P-450 redutase. Posteriormente, Rodriguez *et al.* (2001) avaliaram a toxicidade da 1,2- e 1,4-naftoquinona em mutantes de levedura para a enzima superóxido dismutase (SOD). Estes dois compostos foram mais tóxicos para o duplo mutante, que não possui SOD citoplasmática e mitocondrial, do que para o simples mutante deficiente em SOD citoplasmática. Além disto, a linhagem selvagem, que produz SOD, foi mais sensível aos compostos em condições aeróbias do que anaeróbias, indicando que o radical superóxido está envolvido na toxicidade das naftoquinonas em levedura.

Recentemente, Letavayova *et al.* (2006) estudando o reparo do DNA por eventos recombinacionais, utilizou a 3-metil-1,4-naftoquinona (menadiona) nas linhagens deficiente

em recombinação homóloga (mutante *rad52*) e não homóloga (mutante *yku70*) e no duplo mutante (*rad52,yku70*), mostrou que o mutante *rad52* e o duplo mutante eram sensíveis, mas ao analisar a indução de quebras cromossômicas, por eletroforese de campo pulsado verificou que a menadiona não promovia quebras duplas no DNA, sugerindo outro mecanismo de dano ao material genético da levedura.

1.7.2 Mutagênese em células de mamíferos

Entre os ensaios com células de mamíferos, os hepatócitos de rato são o modelo para estudar a citotoxicidade destes compostos (O'Brien, 1991). Estas células apresentam uma grande quantidade de enzimas tais como citocromo P-450 redutase, glutatona redutase, entre outras e que estão envolvidas na metabolização de uma série de substâncias, incluindo as naftoquinonas. Além disto, permitem correlacionar eventos mutagênicos aos toxicológicos (Silva *et al.* 2003).

Nas últimas décadas, inúmeros estudos demonstraram que as naftoquinonas promovem diferentes tipos de danos no DNA das células de mamíferos, como quebras simples e/ou duplas do DNA, formação de bases oxidadas (Morrison *et al.* 1985; Martil & Meneghin, 1990; Morgan *et al.* 1992). A menadiona, por ser um importante co-fator na formação de fatores de coagulação, recebeu grande atenção. A ação clastogênica deste composto gerou diferentes trabalhos. Apesar de mostrar que ocorre quebra cromossômica a formação de bases oxidadas não foi demonstrada (Nielse *et al.* 1995). Além disto, no estudo realizado por Denda *et al.* (1991) os hepatócitos de ratos tratados que ingeriram menadiona não apresentavam quantidade de elevadas de 8-oxodG, quando comparado com os hepatócitos dos animais não tratados. Por outro lado, quando os animais foram tratados

com fenobarbital (para depletar GSH) e/ou dicumarol (para inibir a DT-diaforase) foi constatado um aumento de até 75 % na formação de 8-oxodG.

Recentemente, Kirkland & Marzin (2003) utilizando a lawsona ou henna (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) realizaram dois estudos para indústrias européias de corantes de cabelo. Neste trabalho eles avaliaram a capacidade da henna de induzir mutagênese em diferentes linhagens de células de mamíferos. Os resultados para a mutação *tk* (timidina quinase) em linfoma de camundongo indicam que a lawsona induz um aumento na frequência de mutação, com e sem ativação metabólica. Para a linhagem de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês (células V79), aonde foi avaliada a mutação para *hprt* (hipoxantina fosforibosil-transferase) os resultados foram controversos. No primeiro experimento foi observado mutação, mas no segundo não, levando os autores a concluir que a henna não é mutagênica neste sistema.

Na avaliação sobre a indução de quebras cromossômicas foram empregadas células de ovário de hamster Chinês (CHO) (Marzin & Kirkland 2004). Nestes testes a lawsona foi clastogênica somente em doses elevadas na presença de ativação metabólica. Por fim, ao administrar este composto por via oral em camundongo, ele não aumentou significativamente a formação de micronúcleos na medula óssea nos animais testados. No ensaio Cometa, as células CHO tratadas com henna e a enzima FPG (formamidopirimidina glicosilase), que reconhece bases oxidadas não aumentou o índice de dano, sugerindo que o efeito clastogênico observado nestas células é por um outro processo, não envolvendo espécies reativas de oxigênio.

1.8 Aminonaftoquinonas

As aminonaftoquinonas são derivadas das naftoquinonas e apresentam pelo menos um grupamento amino. Os primeiros compostos desta classe (entre eles o 2-amino-1,4-naftoquinona) foram sintetizados em 1924 por Korczynski e foram identificados e caracterizados por Fieser (1935). Nesta época, tinha-se a intenção de obter compostos para combater a *Leishmania*. Posteriormente, direcionado para o setor de corantes Farina *et al.* (1985) caracterizaram, a partir da síntese da naftazarina (5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona), o composto 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (ANQ) (Figura 6). A presença do grupamento amino na ANQ confere características peculiares a molécula, tais como ser assimétrica, ser facilmente cicloadicionada e apresentar cor intensa.

De modo geral, estes compostos são obtidos apenas por síntese. Até o momento, somente um trabalho descreveu a ocorrência destes compostos na natureza. Obtida do arbusto *Goniothalamus marcanii* a 5-hidroxi-3-amino-2-aceto-1,4-naftoquinona foi isolada e caracterizada quimicamente. Esta substância foi considerada uma intermediária da 1-aza-antraquinona, que possui grande atividade citotóxica contra vários tipos de tumores (Soonthornchareonnon *et al.* 1999).

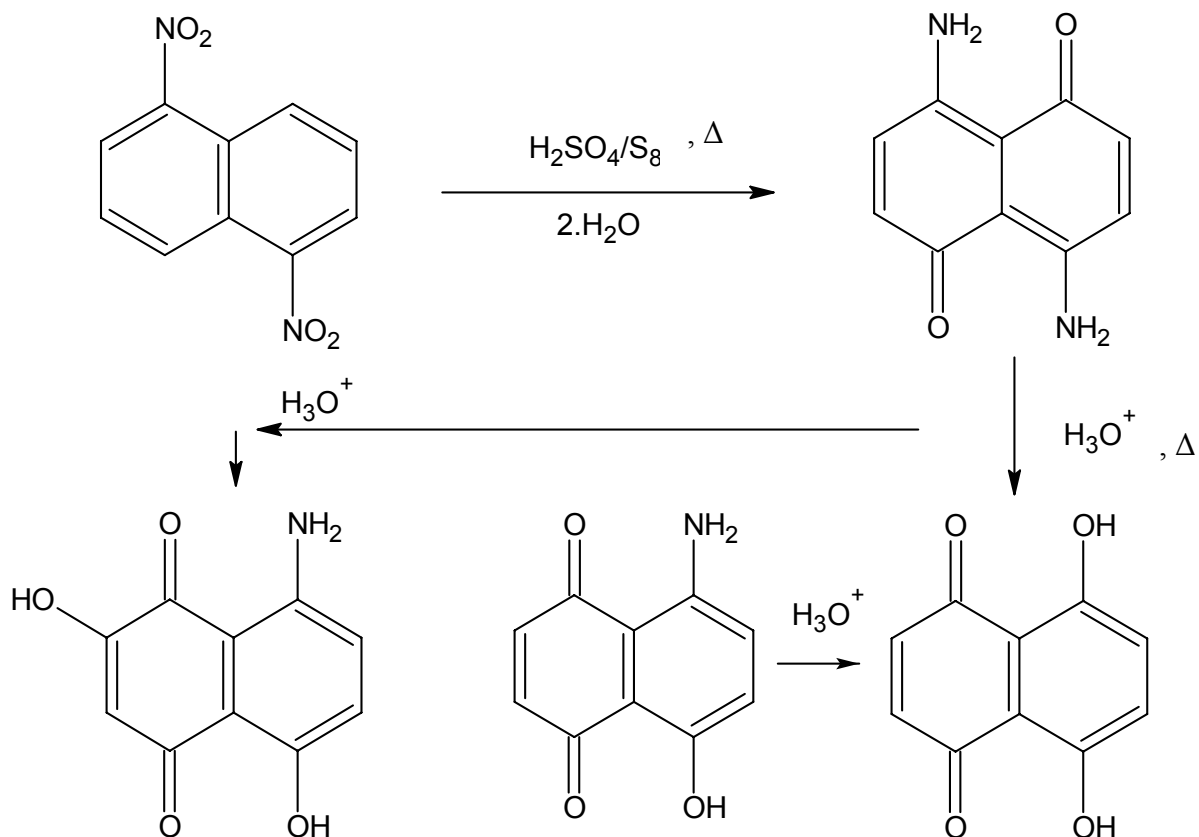


Figura 6: Síntese da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona e 5-amino-2,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona.

A atividade biológica da 2-amino-1,4-naftoquinona foi descrita por Munday (2001). Neste trabalho, foi demonstrado que este composto é capaz de formar espécies reativas de oxigênio, sendo reduzido pela DT-diaforase. Mais recentemente Munday *et al.*, (2005), realizaram ensaios de toxicidade com este composto. Em ratos foi observado um aumento da hemólise, embora tenha sido menos nefrotóxica que a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lawsona).

As aminonaftoquinonas, de modo geral, não inibem bactérias Gram-negativas, nem fungos (Medina *et al.* 2004; Tandon *et al.* 2005), no entanto, inibem várias espécies de

gêneros diferentes de bactérias Gram-positivas tais como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, entre outras (Riffel *et al.*, 2002). Quanto a sua ação frente a protozoários, as aminonaftoquinonas começam a despertar atenção por sua atividade contra *Plasmodium falciparum*. Kapadia *et al.* (2001) avaliando a capacidade das naftoquinonas inibir *P. falciparum*, verificaram que os compostos 4-amino-1,2-naftoquinona e 2-amino-3-cloro-1,4-naftoquinona apresentavam grande atividade contra este organismo *in vitro*.

O fato destas substâncias apresentarem cor intensa permite observar algumas transformações químicas muito facilmente. Recentemente, foi demonstrado por nosso grupo que a 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona interage com *S. aureus* (Medina *et al.* 2006). O microrganismo promove uma redução incomum nesta molécula (Figura 7), aonde a insaturação entre os carbonos 2 e 3 do anel quinônico é reduzida. Esta nova molécula foi purificada e caracterizada por métodos espectroscópicos confirmando a presença dos grupamentos carbonílicos, sendo esta uma redução incomum para estas moléculas, que como já foi citado anteriormente tem as carbonilas reduzidas por enzimas.

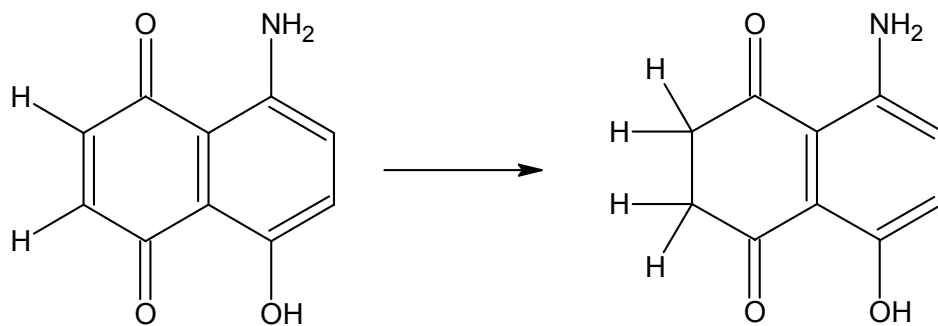


Figura 7: Redução da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona promovida pelo *S. aureus*.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

A proposta do presente trabalho foi a de avaliar o potencial genotóxico dos compostos 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (ANQ) e 5-amino-2,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona (ANQ-OH) em células procarióticas e eucarióticas e a atividade bioquímica da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona na bactéria *Staphylococcus aureus*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar se a 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona produz espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido).
- Avaliar o crescimento de *Staphylococcus aureus* em presença de ANQ e em ausência e presença de antioxidantes.
- Determinar se ANQ interfere no processo respiratório e causa peroxidação de membrana na bactéria *Staphylococcus aureus*.
- Analisar o potencial mutagênico em células procarióticas, utilizando o teste *Salmonella*/microssoma.
- Determinar o potencial genotóxico e recombinogênico das aminonaftoquinonas em linhagens haplóide e diplóide da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Verificar *in vitro* a atividade citotóxica destes compostos em culturas de fibroblasto de pulmão de hamster Chinês (células V79).
- Avaliar os danos no DNA provocado pelas aminonaftoquinonas em células V79 utilizando ensaio Cometa padrão e modificado (empregando as enzimas formamidopirimidina DNA-glicosilase – FPG e endonuclease III – ENDOIII).

CAPÍTULO III

Aminonaphthoquinones induces oxidatives stress in

Staphylococcus aureus

CAPÍTULO IV

Genotoxicity of aminonaphthoquinones in bacteria, yeast

and mammalian cells

artigo a ser submetido ao periódico Mutation Research

Genotoxicity of aminonaphthoquinones in bacteria, yeast and mammalian cells

Luis Fernando da Costa Medina^a, Dinara Jaqueline Moura^a; Cassiana Macagnan Viau^a, Jenifer Saffi^{a,b}, Valter Stefani^c, Adriano Brandelli^d and João Antonio Pêgas Henriques^{a,b,*}

^a Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^b Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil

^c Laboratório de Novos Materiais Orgânicos, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author:

Prof. João Antonio Pegas Henriques

Centro de Biotecnologia – UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, Brazil

FAX +55 51 3316-6069

e-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The biological activity of 1,4-naphthoquinone amino derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells is poorly investigated. We have determined the mutagenic activity of (5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone, ANQ; and 5-amino-2,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone, ANQ-OH) in comparison with the unsubstituted 1,4-naphthoquinone (NQ) in *Salmonella* microsome/assay. The genotoxic and recombinogenic potential effects were analysed in haploid and diploid yeast *Saccharomyces cerevisiae* cultures. In *Salmonella* microsome/assay the NQ was not mutagenic while the aminonaphthoquinones were weakly mutagenic in TA98 and TA102 strains. In haploid yeast, only NQ showed a mutagenic response at the *his1*, *lys1* and *hom3* loci at higher doses during growth conditions. However, in STAT this mutagenic response was observed for *hom3* locus in the highest NQ dose. In diploid yeast, the naphthoquinones did not induce any recombinogenic events. All these results suggest that aminonaphthoquinones are weak mutagenic agents only in prokaryotic cells. Moreover, the genotoxicity of these compounds was determined using standard Comet assay (single-cell gel – SCG) and modified Comet assay with bacterial enzymes formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG) and endonuclease III (ENDOIII) in V79 Chinese hamster lung fibroblast cells. Our study demonstrated that ANQ and NQ induced oxidative DNA damage in V79 cells as shown in comet assay with the lesion-specific enzymes. Post-treatment with ENDOIII and FPG proteins had no significant effect on ANQ-OH-induced oxidative DNA damage when compared to standard alkaline comet assay. Besides, all naphthoquinones showed genotoxic effect on V79 cells in presence of metabolic activation. In mammalian cells, NQ and ANQ are genotoxic agents and ANQ-OH is genotoxic only in presence of metabolic activation.

Key words: *Salmonella*, ROS, mutagenic, ENDOIII, Comet assay

1. Introduction

The naphthoquinones and its derivatives present an important role in different biological processes like photosynthesis, energy production in respiratory chain, allelopathy and defense [1-3]. In the last decades, a great number of naturally and synthesized naphthoquinones and derivatives have been extensively studied regarding their antitumoral [4], antiparasitary [5], and antimicrobial [6-9] activities.

The classical mechanism of naphthoquinones toxicity is to produce reactive oxygen species (ROS). The naphthoquinones can be reduced to semiquinone by NADPH-cytochromes P-450 reductase or to hydroquinones by DT-diaphorase (NAD(P)H:quinoneoxireductase (EC 1.6.99.2)). In the presence of oxygen reduced naphthoquinones autooxidize to form superoxide anion radical. This redox cycling of quinones promoted conditions of oxidative stress, resulting in lysosomal destabilization, release of cathepsin D and decrease in mitochondrial membrane potential [10,11]. Furthermore, the capacity to produce free radicals is dramatically influenced by the nature and position of substituents on quinone molecule [12].

The naphthoquinones are often permeable to cell membranes and may form adducts with DNA, resulting in single or double strand breaks and creating abasic sites [13,14]. Besides, these compounds react with proteins and lipids, followed by loss of their function, leading to cell death [15].

Studies on mutagenic activity of naphthoquinones have been developed in prokaryotic cells. Tikkanen et al. [16] investigated the influence of substituents, like hydroxyl, methyl or both in different positions of the molecule. Their study showed that naphthazarin (5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone) and plumbagin (2-methyl-5-hydroxy-1,4-naphthoquinone) induced frameshift mutations in TA98 strain with metabolic activation. However, few studies were conducted with amino substituents in this class of compounds. Hakura et al. [17] demonstrated that 4-amino-1,2-naphthoquinone induced mutagenicity in TA97, TA100 and TA104 of *Salmonella typhimurium* strains.

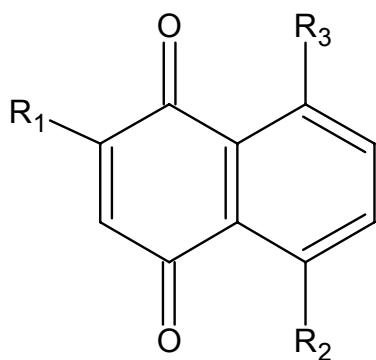
Considering the use of some quinones like antineoplastic agents and their skill to promote adducts in DNA, the aim of this study was to verify the mutagenic activity of two aminonaphthoquinones, 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone (ANQ) and 2,8-dihydroxy-5-amino-1,4-naphthoquinone (ANQ-OH), in *Salmonella* microsome/assay

(*Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 and TA102), in the *Saccharomyces cerevisiae* (strains XV185-4c and XS2316) and cytotoxicity in Chinese hamster lung fibroblasts (V79 cells). Moreover, the genotoxicity of these compounds was determined using standard Comet assay (single-cell gel – SCG) and to verify the effects of exposure to naphthoquinones on ROS generation and oxidative DNA damage in modified Comet assay with bacterial enzymes formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG, also known as MUTM) which is specific for oxidized purines, specially 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) and endonuclease III (ENDOIII, also known as NTH), which recognizes oxidized pyrimidines [18.19].

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

The 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone (ANQ) and 5-amino-2,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (ANQ-OH) were synthesized as described elsewhere [20]. The structures were confirmed by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, infrared (IR) spectroscopy, UV-Vis and mass spectroscopy (MS) and the degree of purity was determined by standard procedures (t.l.c., m.p., elemental analysis). The structures of compounds are shown in Figure 1. The 1,4-naphthoquinone (NQ), was purchased from ACROS (New Jersey, USA). The, D-biotin, aflatoxin B1, aminoacids (L-histidine, L-threonine, L-metionine, L-tryptophan, L-leucine, L-lysine), nitrogen bases (adenine and uracil), cycloheximide, methyl methane sulfonate (MMS), 4-nitroquinoline-oxide (4-NQO), cyclophosphamide (CP) and sodium azide were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Formamidopyrimidine DNA-glycosylase (FPG, also known MutM) and endonuclease III (ENDOIII, also known as NTH) were obtained from BioLabs (New England, www.neb.com). Nutrient broth No. 2 was obtained from Oxoid (Maryland, USA) and Yeast extract, Bacto-peptone and Bacto-agar were acquired from Difco Laboratories (Detroit, MI, USA). For all treatments, 5 mg/mL stock solutions of naphthoquinones were prepared immediately prior to use in dimethylsulfoxide (DMSO) (Merck, Darmstadt).



	I	II	III
R ₁	H	H	OH
R ₂	H	NH ₂	NH ₂
R ₃	H	OH	OH

Fig 1. Chemical structures of 1,4-naphthoquinones tested. (I) 1,4-naphthoquinone, (II) 5-amino-8-hydroxi-1,4-naphthoquinone and (III) 2,8-dihydroxi-5-amino-1,4-naphthoquinone.

2.2 S9 fraction

The S9 fraction, prepared from livers of Sprague-Dawley rats pre-treated with the polychlorinated biphenyl mixture Araclor 1254, was purchased from Moltox (Annapolis, MD, USA). The S9 metabolic activation mixture (S9 mix) was prepared according to Maron et al. [21].

2.3 Strains

Salmonella typhimurium TA97, TA98, TA100 and TA102, described in [21], were kindly provided by B. M. Ames (University of California, Berkeley, CA, USA). The *Saccharomyces cerevisiae* XV185-14c (MAT α *ade2-2 arg4-17 his1-7 lys1-1 trp5-48 hom3-10*) [22] were used in mutagenic assay. Induced mitotic recombination assay was measured in diploid strain XS2316 (MAT a/α *his1-1/his1-1 leu1-1/leu1-12 +/-cyh2 trp5-48 +/-met13*) [23].

2.4 *Salmonella*/microsome mutagenic assay

Mutagenicity was assayed by the pre-incubation procedure proposed by [24]. The appropriated concentrations of naphthoquinones were obtained by dilution of stock solution in DMSO. One Hundred microliter of test bacterial cultures ($1-2 \times 10^9$ cells/mL) were incubated in the dark at 37 °C with different amounts of naphthoquinones (0.01 to 20 μ g per plate) in the presence or absence of S9 mix for 20 min, without shaking. Subsequently, 2 mL of soft agar (0.6% agar, 0.5% NaCl, 50 μ M histidine, 50 μ M biotin, pH 7.4, 42 °C) were added to the test tube and poured immediately onto a plate of minimal agar (1.5% agar, Vogel-Bonner E medium, containing 2% glucose). Aflatoxin B1 (0.5 μ g per plate) was used as positive control for all strains in the metabolic assay with S9 mix. In the absence of S9 mix, the positive control was 4-NQO (0.5 μ g per plate), except to TA 100 its was sodium azide (5 μ g per plate). The plates were incubated in the dark at 37 °C for 48 h before counting the revertant colonies.

2.5 Yeast culture media

Media, solutions and buffers were prepared as previously described [25]. Complete medium YPD containing 0.5% yeast extract, 2% bacto-peptone and 2% glucose was used for routine growth of yeast cells. For plates, the medium was solidified with 2% bactoagar. The minimal medium (MM) contained 0.67% yeast nitrogen base without aminoacids, 2% glucose and 2% bacto-agar was supplemented with the appropriate amino acids. The synthetic complete medium (SC) was MM supplemented with 2 mg adenine, 2 mg arginine, 5 mg lysine, 1 mg histidine, 2 mg leucine, 2 mg methionine, 2 mg uracil, 2 mg tryptophan and 24 mg threonine per 100 mL MM. For mutagenesis in the strain XV-185-14c, the

omission media lacking lysine (SC-lys), histidine (SC-his), or homoserine (Sc-hom) were used. For recombinogenesis, leucine was omitted from the synthetic complete medium (SC-leu) or supplemented with 0.2 % (w/v) cycloheximide (SC + Cyh). Cells were harvested and washed with Phosphate buffer saline (PBS; 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.8 g per litre $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4). Cells concentration and percentage of budding were determined by microscopic counts using a Neubauer chamber.

2.6 Growth of yeast

Stationary-phase (STAT) cultures were obtained by inoculation of liquid YPD with isolated colony. After 48 h incubation at 30 °C with aeration by shaking, the cultures contained $1-2 \times 10^8$ cells/mL. Cells were harvested and washed with PBS. Cells concentration and percentage of budding were determined by microscopic counts using a Neubauer chamber.

2.7 Survival assay in Saccharomyces cerevisiae

The sensitivity to naphthoquinones was assayed by suspending 2×10^8 cells/mL of STAT in PBS containing various concentrations of the compounds and incubation with aeration by rotary shaking at 30 °C for 4 h. Cytotoxicity of naphthoquinones was also monitored in grow conditions, where 5×10^6 cells/mL of STAT were inoculated in freshly liquid SC medium in presence the various concentrations of the compounds with aeration as describe above during 24 h. Cell number was determined by microscopic count and colony formation on solid SC. Plates were incubated at 30 °C for 3-5 days before counting.

2.8 Detection of aminonaphthoquinones induced reverse mutation in Saccharomyces cerevisiae

Mutagenesis was measured in haploid strain XV185-14c in STAT and during growth as described in survival conditions. A suspension of 2×10^8 cells/mL in STAT was incubated for 4 h at 30 °C with various concentrations of naphthoquinones. In growth condition, cells were exposed to naphthoquinones during 24 h. Cell survival was determined on SC (3-5 days, 30 °C) and mutation induction (LYS, HIS or HOM revertants) on appropriate omission media (5-7 days, 30 °C). Whereas *his 1-7* is a non-suppressible

missense allele and reversions result from mutation at the locus itself [26], *lys1-1* is a suppressible ochre nonsense mutant allele [27] which can be reverted either by locus-specific or by forward mutation in a suppressor gene [22,28]. True reversions and forward (suppressor) mutations at *lys1-1* locus were differentiated according to Schuller and von Borstel [29]. It is believed that *hom3-10* contains a frameshift mutation due to a range of diagnostic mutagens [22]. Assays were repeated at last three times and plating was in triplicate for each dose.

2.9 Detection of induced mitotic recombination in Saccharomyces cerevisiae

Suspension of STAT cells of diploid strain XS2316 (2×10^7 cells/mL) were incubated for 4 h at 30 °C in PBS that contained various concentrations of naphthoquinones. Treated cells were diluted in PBS, plated on three different media (SC, SC-leu and SC+cyh) and incubated for 5-7 days at 30 °C. Colonies grown on SC medium indicated cell survival and colonies grown on SC-leu and SC+cyh were scored for intragenic mitotic recombination (gene conversion) and intergenic recombination (crossing-over), respectively. In order to measure that the exact frequency of reciprocal crossing-over, it was necessary to eliminate the possible revertants to cyclohexamide-resistant resulting from reversion at the *CYH2* locus, as well as from monosomy of chromosome VII. Therefore, cyclohexamide-resistance colonies were replica-plated on a series of plates with SC-lys, SC-met and SC-ade media to confirm the recombination origin of *cyh2* homozygosity. Positive control was performed with irradiation of UV 254 nm (30 J and 60 J) as describe by Andrade et al. [30]. Assays were repeated three times and plates were done in triplicate for each dose.



2.4 Treatment of cells V79

Chinese hamster lung fibroblast (V79 cells) was cultivated under standard conditions in MEM with Earle's salts and 2 mM L-glutamine, supplemented with 10 % foetal bovine serum [31]. Cells were maintained in tissue culture flasks at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂ and were harvested by treatment with 0.15 % trypsin and 0.08 % of EDTA PBS. The cells (2×10^5 cells/mL) were seeded into each flask

and culture one day prior treatment. The assays in presence of metabolic activation were performed with 3 % at final concentration of S9-mix.

The cells were treated for 3 h with substances, washed with PBS solution. Cells were stained with crystal violet (1 %) and counted. The concentrations used for each sample were based on plating efficiency, which was determined as described by [32]. The dose was considered cytotoxic when cell survival was <70 %.

2.5 Comet assay

The alkaline Comet assay was performed as described by Sigh et al. [32], with minor modifications [33]. At the end of the treatment, cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized with 100 µl trypsin (0.15 %). After 30 sec, 100 µl complete medium was added and the cells were gently resuspended. Immediately after, cells suspension (10^6 cells/mL) were dissolved in 0.75 % low melting point agarose (LMA) and spread on agarose-precoated microscope slides. The cells were lysed (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 10.0, with freshly added 1 % Triton X-100 and 10 % DMSO) for 24 h at 4 °C. In the modified comet assay, the slides were removed from the lysing solution and washed three times in enzyme buffer (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0.5 Mm Na₂EDTA, 0.2 mg/mL BSA, Ph 8.0), drained and incubated with 70 µL of FPG (30 min 37°C) and ENDOIII (45 min 37°C). The slides were placed in a horizontal electrophoresis box, containing freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13.0) for 20 min at 4 °C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 20 min to electrophoresis the DNA. The slides were neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver [34]. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed per group. Cells were also scored visually into five classes, according to tail size (from undamaged – 0, to maximally damaged – 4).

International guidelines and recommendations for the Comet assay consider that visual scoring of comets is a well-validated evaluation method. It has a high correlation with computer-based image analysis [35,36]. The damage index is based on the length of migration and on the amount of DNA in the tail and is considered a sensitive measure of DNA. According to [35], the damage frequency, or the proportion of cells that show tails after the electrophoresis, is less informative than the damage index (DI), because it does not

consider the extent of the DNA damage in the cells. Image length or migration length gives information only about the size of DNA fragments and is largely dependent upon electrophoresis conditions (i.e. voltage and duration) [37]. Thus, damage index (DI) is emphasized in our analyses. Damage index (DI) thus was assigned to each comet according to its class and ranged from 0 (completely undamaged: 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage: 100 cells x 4) [38,39]. Results are presented as mean and range of three independent experiments. The vehicle (DMSO) was used as negative control, MMS and CP was used as positive control, without and with metabolic activation, respectively.

2.7 Statistical analysis

Mutagenicity data were analyzed with Salmonel software [40]. A compound was considered positive for mutagenicity only when: (a) the number of revertants was at least double the spontaneous yield ($MI \geq 2$; mutagenic index (MI): number of induced colonies in the sample/number of spontaneous in negative control); (b) a significant response for analysis of variance ($P \leq 0.05$) was found; and (c) a reproducible positive dose response ($P \leq 0.01$) was present, evaluated by *Salmonel* software. A cytotoxic effect was considered when $MI \leq 0.6$.

Descriptive statistical analysis for mutagenesis assays in *S. cerevisiae* and Comet assay were expressed as means and standard deviation from three independent experiments performed using One-way ANOVA and Turkey's Multiple Comparison Test using GraphPad Prism version 4.00, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

3 Results

3.1 Salmonella/microsome assay

No mutagenicity of naphthoquinones was seen at concentrations tested in TA97a (detects frameshift mutations in C-C-C-C-C-C; + 1 cytosine), nor TA100 (base pair substitution mutation results from the substitution of a leucine [GAG] by a proline [GGG]), in absence or presence of metabolic activation. However, at higher concentration toxicity was observed in TA100 without metabolic activation (Table 1). Negative results for

mutagenicity were also observed in TA102 (Table 2) in the absence of metabolic activation, which detected oxidative, alkylating mutagens and ROS [21]. Furthermore, ANQ and ANQ-OH were able to induce positive mutagenic response in TA102 in presence of metabolic activation. Mutagenic response was also observed in TA98 (detect frameshift in DNA target –C-G-C-G-C-G-C-G) for ANQ compound in presence and absence of metabolic activation, whereas for ANQ-OH this effect was only detected in absence of S9mix.

Table 1. Induction of his⁺ revertants in *S. typhimurium* TA100 and TA97 by naphthoquinones, with and without metabolic activation (S9 mix).

Substance	Dose μg/plate	TA100 -S9		TA100 +S9		TA97 -S9		TA97 +S9	
		Rev/plate ^a	MI ^b	Rev/plate	MI	Rev/plate	MI	Rev/plate	MI
NC ^c		208 ± 6		175 ± 10		287 ± 31		203 ± 68	
PC ^d	0.5	592 ± 62**	3.38	362 ± 21**	2.12	751 ± 33**	2.62	509 ± 24**	2.51
NQ	0.1	240 ± 28	1.15	199 ± 11	1.06	362 ± 27	1.26	301 ± 51	1.48
	0.5	232 ± 16	1.12	193 ± 10	1.11	360 ± 30	1.27	358 ± 59	1.76
	1	124 ± 19	0.58	187 ± 11	1.07	361 ± 10	1.26	340 ± 41	1.68
	2	97 ± 41	0.47	204 ± 8*	1.17	267 ± 16	0.93	345 ± 27	1.70
ANQ	1	216 ± 2	1.04	185 ± 12	1.06	324 ± 10	1.13	315 ± 63	1.55
	5	154 ± 44	0.74	175 ± 9	1.00	388 ± 12	1.35	320 ± 43	1.58
	10	155 ± 34	0.75	213 ± 23	1.22	347 ± 26	1.21	314 ± 53	1.54
	20	61 ± 28	0.30	271 ± 29	1.55	324 ± 30	1.09	366 ± 104	1.80
ANQOH	1	263 ± 2	1.27	161 ± 14	0.92	361 ± 33	1.26	280 ± 43	1.38
	5	328 ± 44	1.58	218 ± 25	1.25	375 ± 24	1.31	284 ± 51	1.40
	10	323 ± 35	1.55	222 ± 22	1.27	335 ± 55	1.17	275 ± 53	1.35
	20	367 ± 28	1.77	330 ± 27	1.89	338 ± 63	1.18	284 ± 38	1.40

^a Number of revertants/plate: mean of three independent experiments ± S.D.

^b MI mutagenic index: number of his⁺ induced in the sample/number of spontaneous his⁺ in the negative control.

^c Negative control: dimethylsulfoxide

^d Positive control (4NQO - S9mix to TA98 and TA102 and aflatoxin B1 + S9)

* data significant in relation to negative control (solvent) at P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

Table 2. Induction of his⁺ revertants in *S. typhimurium* TA102 and TA98 by naphthoquinones, with and without metabolic activation (S9 mix).

Substance	Dose μg/plate	TA102 -S9		TA102 +S9		TA98 -S9		TA98 +S9	
		Rev/plate ^a	MI ^b	Rev/plate	MI	Rev/plate	MI	Rev/plate	MI
NC ^c		310 ± 31		380 ± 5		32 ± 1		46 ± 4	
PC ^d	0.5	2910 ± 300***	9.38.3	1173 ± 15***	3.08	301 ± 35***	9.40	562 ± 31***	12.2
NQ	0.1	400 ± 3	1.29	719 ± 70	1.89	27 ± 2	0.85	49 ± 6	1.06
	0.5	421 ± 5	1.35	681 ± 21	1.79	29 ± 3	0.90	42 ± 1	0.91
	1	462 ± 10	1.49	516 ± 42	1.36	32 ± 8	1.00	44 ± 5	0.95
	2	429 ± 5	1.38	509 ± 53	1.33	25 ± 6	0.78	49 ± 7	1.07
ANQ	1	287 ± 30	0.93	838 ± 72*	2.21	42 ± 1	1.31	47 ± 2	1.02
	5	255 ± 20	0.82	781 ± 54*	2.06	60 ± 7	1.88	53 ± 4	1.15
	10	290 ± 4	0.94	1106 ± 64**	2.91	59 ± 4	1.84	93 ± 14	2.02
	20	268 ± 15	0.86	1155 ± 140**	3.04	119 ± 20	3.71	144 ± 6	3.11
ANQOH	1	309 ± 27	0.99	891 ± 128**	2.35	34 ± 3	1.06	47 ± 9	1.02
	5	302 ± 26	0.97	790 ± 151**	2.08	48 ± 5	1.50	39 ± 3	0.84
	10	281 ± 21	0.91	844 ± 88**	2.22	76 ± 3	2.37	48 ± 8	1.04
	20	308 ± 39	0.99	886 ± 122**	2.33	159 ± 4	4.96	60 ± 7	1.30

^a Number of revertants/plate: mean of three independent experiments ± S.D.

^b MI mutagenic index: number of his⁺ induced in the sample/number of spontaneous his⁺ in the negative control.

^c Negative control: dimethylsulfoxide

^d Positive control (4NQO - S9mix to TA98 and TA102 and aflatoxin B1 + S9)

* data significant in relation to negative control (solvent) at P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

3.2 Cytotoxic and mutagenic effects in *Saccharomyces cerevisiae*

The results of cytotoxicity and mutagenicity tests are shown in Table 3. The cytotoxicity was significant at highest dose for NQ in *Saccharomyces cerevisiae* during STAT and growth conditions, while aminonaphthoquinones presented a slightly cytotoxicity in all treatments in both conditions. In mutagenesis assay, the frequency of point (*HIS1*⁺, *LYS1*⁺) and frameshift (*HOM3*⁺) mutations during treatment in PBS (STAT) is not significant for all naphthoquinones tested (Table 3, upper panel), except to locus *hom3*⁺ for NQ at highest concentrations. However, for culture treated during growth-phase (Table 3, lower panel) the mutations frequencies at the *his1*, *lys1* and *hom3* loci were significant only for NQ at highest dose.



3.3 Recombinogenic effects in *Saccharomyces cerevisiae*

The recombinogenic effect of naphthoquinones was investigated in diploid in STAT. In Table 4, (it can be observed that naphthoquinones did not able to induce any recombinogenic events in STAT phase of growth.

Table 3. Induction of forward mutation in haploid XV185-14c strain of *Saccharomyces cerevisiae* by treatments with aminonaphthoquinones in stationary phase and growth conditions.

Agent	Treatment	Survival (%)	His1/10 ⁷ survivors ^a	Hom3/10 ⁷ survivors ^a	Lys1/10 ⁷ survivors ^b
STAT					
DMSO ^b	0	100	7.73 ± 0.87	1.19 ± 0.06	4.36 ± 0.62
4NQO ^c	1 µg/mL	86.8	275.5 ± 1.36***	4.91 ± 2.60**	51.42 ± 2.61**
NQ	1 µg/mL	85.7	7.51 ± 1.76	1.05 ± 0.67	5.11 ± 1.05
	10 µg/mL	80.2	6.23 ± 2.74	3.05 ± 0.95	4.82 ± 0.86
	15 µg/mL	86.5	5.85 ± 2.51	1.44 ± 1.01	3.45 ± 0.45
	30 µg/mL	4.5	8.86 ± 2.04	8.86 ± 2.00**	7.74 ± 0.84
ANQ	1 µg/mL	103.0	4.14 ± 0.92	1.63 ± 0.55	5.03 ± 2.02
	10 µg/mL	92.7	6.82 ± 2.29	1.45 ± 0.27	4.23 ± 1.55
	30 µg/mL	97.9	7.03 ± 1.53	2.01 ± 1.17	5.12 ± 0.48
	60 µg/mL	97.0	8.31 ± 1.93	1.70 ± 0.79	4.12 ± 0.41
ANQ-OH	1 µg/mL	96.4	5.01 ± 0.85	1.45 ± 0.29	5.18 ± 0.61
	10 µg/mL	101.0	4.38 ± 0.83	1.48 ± 0.65	6.30 ± 0.41
	30 µg/mL	103.1	4.38 ± 1.35	0.71 ± 0.02	3.66 ± 1.16
	60 µg/mL	99.1	5.66 ± 2.21	1.16 ± 2.60	5.85 ± 0.54
Growth conditions					
4NQO	0 µg/mL	100	6.60 ± 0.31	3.26 ± 1.40	2.20 ± 0.10
	1 µg/mL	88.0	18.8 ± 1.77**	10.3 ± 0.75**	5.14 ± 0.37*
NQ	0.5 µg/mL	95.1	10.9 ± 3.78	2.37 ± 0.47	2.37 ± 0.47
	1 µg/mL	73.8	10.4 ± 1.45	5.98 ± 0.38	2.99 ± 0.19
	2 µg/mL	68.3	11.2 ± 1.26	3.24 ± 0.30	2.24 ± 0.30
	5 µg/mL	35.2	21.8 ± 4.42**	9.38 ± 4.40*	6.25 ± 0.15**
ANQ	1 µg/mL	101.0	9.78 ± 1.54	2.17 ± 0.25	2.17 ± 0.27
	5 µg/mL	78.0	9.82 ± 1.41	2.82 ± 0.17	2.82 ± 0.10
	10 µg/mL	79.3	11.1 ± 0.10	2.78 ± 0.53	2.78 ± 0.17
	15 µg/mL	80.6	10.6 ± 3.72	6.58 ± 1.86	2.63 ± 0.11
ANQ-OH	1 µg/mL	102.8	7.45 ± 1.50	2.13 ± 0.50	2.18 ± 0.10
	5 µg/mL	96.5	9.97 ± 3.22	3.32 ± 1.07	3.58 ± 2.18
	10 µg/mL	92.0	5.67 ± 5.24	2.54 ± 0.82	3.52 ± 0.56
	15 µg/mL	99.1	7.86 ± 4.96	5.58 ± 1.75	3.36 ± 1.68

^a Locus-specific revertants;

^b Locus non-specific revertants (forward mutation)

^c Mean and standard deviation per three independent experiments.

* data significant in relation to negative control group (solvent) at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;

*** $P < 0.001$ /one-way ANOVA with Turkey's post test.

Table 4. Effects of naphthoquinones in diploid XS2316. Induction of crossing-over (+/*cyh2*) and gene conversion (*leu-1/leu1-12*)

Substance	Treatment	Survival %	Crossing-over/ 10^5 survivors ^a	Gene conversion/ 10^5 survivors ^a
NC		100	56 ± 1.00	22 ± 1.07 ^c
UVC (J/m ²) ^b	30 J	77.9	708 ± 44.0**	691 ± 85.3**
UVC (J/m ²) ^b	60 J	56.3	1150 ± 32.0***	1210 ± 87.1***
NQ	0.5 µg/mL	79.1	20.2 ± 13.0	20.8 ± 8.3
	1 µg/mL	71.0	42.0 ± 3.43	17.1 ± 1.53
	2 µg/mL	2.03	1180 ± 21***	50.0 ± 10.0
ANQ	1 µg/mL	79.7	30.2 ± 12.5	33.1 ± 1.59
	5 µg/mL	85.1	35.9 ± 10.7	14.4 ± 7.00
	10 µg/mL	81.2	42.8 ± 18.2	10.0 ± 1.00
	30 µg/mL	81.0	71.5 ± 18.4	24.4 ± 12.0
ANQ-OH	1 µg/mL	84.3	48.4 ± 0.45	26.8 ± 6.10
	10 µg/mL	72.0	33.6 ± 0.19	27.6 ± 5.40
	30 µg/mL	68.0	47.9 ± 1.29	23.9 ± 2.60

^a Mean and standard deviation per three independent experiments.

^b Positive control;

* data data significant in relation to negative control group (solvent) at $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ /one-way ANOVA with Turkey's post test.

3.4 Relative plating efficiency

Fig. 2 depicts the cytotoxicity in V79 cells after treatment with different concentrations of naphthoquinones for 3 h without S9mix. Significant induction of cytotoxicity response was detected in cells treated with NQ at concentration 5 µg/mL or above. ANQ and ANQ-OH did not increase cytotoxicity in concentration tested.

3.5 Concentration-response Comet assay for naphthoquinones

Table 5 shows the DNA damage by naphthoquinones tested in V79 cells without metabolic activation. The data of cellular comet assay clearly show with increasing concentrations of both NQ and ANQ there are a significant increase in damage index and damage frequency. When compared to negative control, concentration upper than 0.1 µg/mL to NQ and 1 µg/mL to ANQ induce significant damage in DNA. In contrast, V79 cells treated with 0.1 – 10 µg/mL of ANQ-OH didn't show significant damage on DNA. It can be seen in the Table 6 that all naphthoquinones showed genotoxic effect on V79 cells in presence of metabolic activation. Fig. 3A and 3B shows that post-treatment with ENDOIII and FPG proteins increase the DNA-damaging effect of NQ and ANQ, respectively in the modified comet assay with V79 cells. In both treatment was induced dose-dependent DNA-damaging. DNA-damage was observed at all concentration with maximum of significantly difference at concentration 1 µg/mL ($P<0.001$) for NQ in both treatments (Fig 3A). Figure 3B shows that post-treatment with ENDOIII and FPG proteins increase the DNA-damaging effect of ANQ in the comet assay with V79 cells at the 1 µg/mL ($P<0.05$) ANQ concentration and at the intermediate concentrations 1 µg/mL ($P<0.001$) and 5 µg/mL ($P<0.01$), respectively. Post-treatment with ENDOIII and FPG proteins had not significant effect on ANQ-OH-induced oxidative DNA damage when compared to standard alkaline comet assay (Fig. 3C).

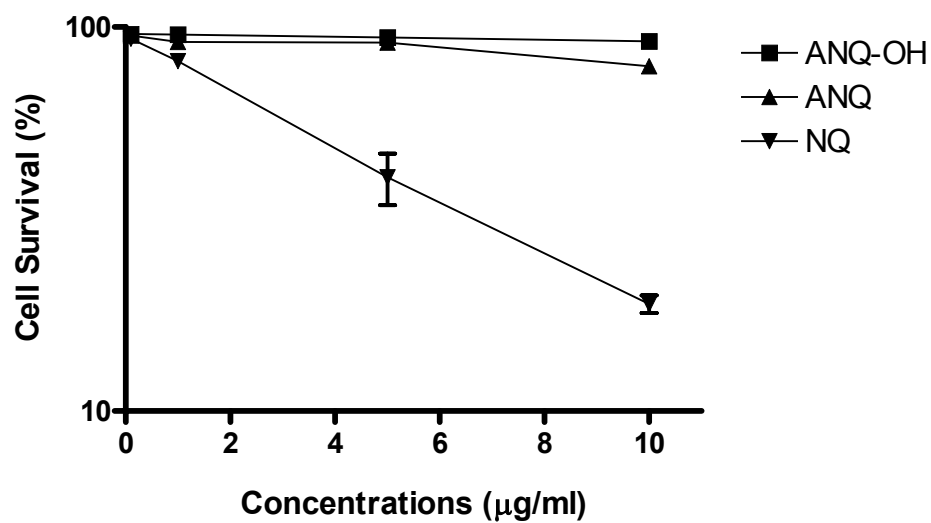


Fig 2. Cell survival of V79 after exposure to 1,4-naphthoquinones for 3 h in absence of metabolization. (ANQ-OH) 5-amino-2,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone, (ANQ) 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone and (NQ) 1,4-naphthoquinone

Table 5. Effect of naphthoquinones in V79 cells exposed for 3 h and evaluated by

Comet assay.

Substance	Treatment	Damage Index ^c	Damage Frequency (%) ^c
NC ^a		66.67 ± 3.51 ^c	51.33 ± 7.37 ^c
MMS ^b	4.0 x 10 ⁻⁵ M	318.33 ± 92.1***	100.00 ± 0.0***
NQ	0.01 µg/mL	63.66 ± 26.57	48.33 ± 14.01
	0.1 µg/mL	147.33 ± 40.20**	76.66 ± 5.03
	1 µg/mL	316.66 ± 75.08***	97.33 ± 4.61***
	5 µg/mL	341.00 ± 70.15***	99.33 ± 1.15***
ANQ	0.1 µg/mL	27.00 ± 4.24	21.00 ± 1.41
	1 µg/mL	34.00 ± 19.79	28.00 ± 16.97
	5 µg/mL	145.50 ± 44.54**	75.50 ± 23.30
	10 µg/mL	325.50 ± 4.95***	100.00 ± 0.0***
ANQ-OH	0.1 µg/mL	41.66 ± 25.85	32.66 ± 18.58
	1 µg/mL	66.67 ± 15.00	48.00 ± 7.55
	5 µg/mL	80.00 ± 40.28	49.33 ± 18.14
	10 µg/mL	166.00 ± 36.37	81.00 ± 9.6

^a Negative control.

^b Positive control;

^c Mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experimental – total of three experiments for each substance.

* data significant in relation to negative control (DMSO - solvent) group at P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001/one-way Turkey's Multiple Comparison Test.

Table 6. Effect of naphthoquinones in V79 cells exposed for 3 h and evaluated by Comet assay in presence of metabolic activation.

Substance	Treatment	Damage Index ^c	Damage Frequency (%) ^c
NC ^a		33.3 ± 8.28	23.0 ± 5.79
CP ^b	4.5 x 10 ⁻⁵ M	272.5 ± 9.19***	87.0 ± 1.10***
NQ	0.01 µg/mL	63.3 ± 7.45	50.6 ± 1.41
	0.1 µg/mL	142.6 ± 4.24**	75.5 ± 2.12**
	1 µg/mL	244.3 ± 12.16***	88.3 ± 0.70***
	5 µg/mL	282.0 ± 1.41***	93.7 ± 2.0***
ANQ	0.1 µg/mL	45.0 ± 0.08	36.3 ± 3.24
	1 µg/mL	93.5 ± 12.02*	62.0 ± 4.55*
	5 µg/mL	223.0 ± 12.72***	92.3 ± 4.95***
	10 µg/mL	268.5 ± 0.70***	90.6 ± 4.24***
ANQ-OH	0.1 µg/mL	27.8 ± 5.65	21.3 ± 2.12
	1 µg/mL	150.6 ± 3.53**	77.5 ± 0.70**
	5 µg/mL	189.6 ± 2.82***	84.3 ± 1.41***
	10 µg/mL	212.0 ± 15.86***	88.5 ± 0.7***

^a Negative control.

^b Positive control;

^c Mean values and standard deviation obtained from average of 100 cells per experimental – total of three experiments for each substance.

* data significant in relation to negative control (DMSO - solvent) group at P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001/one-way Turkey's Multiple Comparison Test.

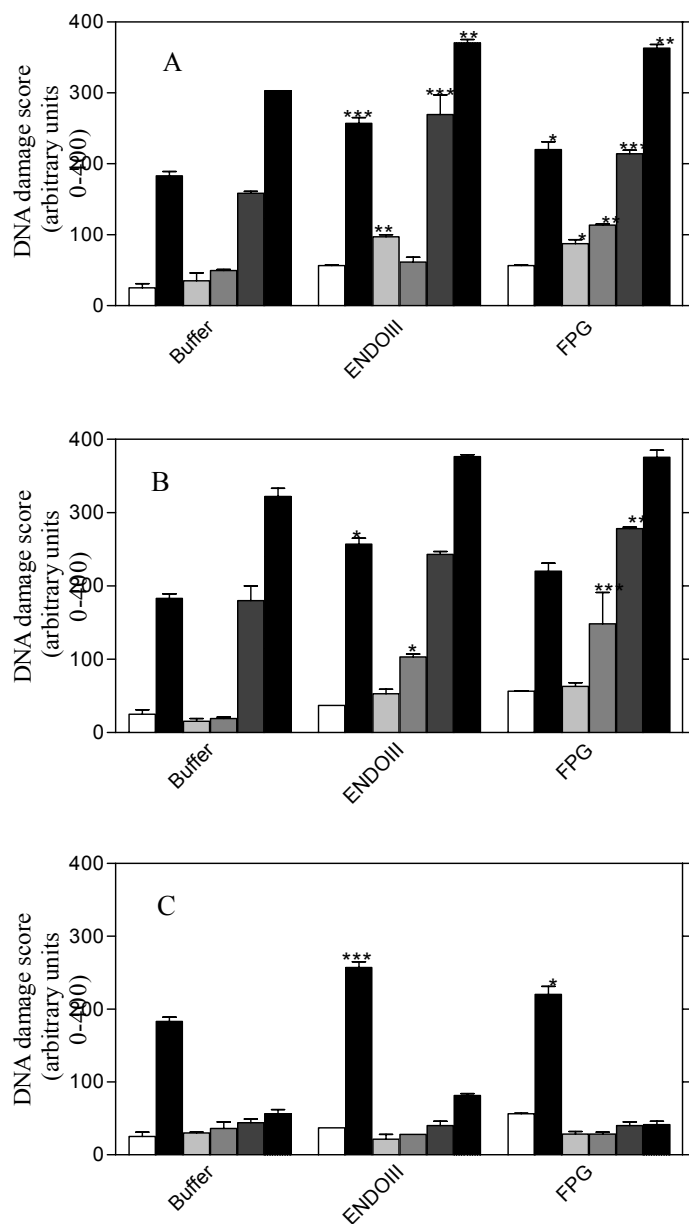


Fig 3. (A) The effect of ENDOIII and FPG post-treatment on 1,4-naphthoquinone (NQ) induced DNA migration in modified comet assay. Columns from left to right: Solvent; positive control (H₂O₂ 10 μM); NQ 0.01 μg/mL; NQ 0.1 μg/mL; NQ 1 μg/mL; NQ 5 μg/mL; The effect of ENDOIII and FPG post-treatment on 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone, ANQ induced DNA migration in modified comet assay. Columns from left to right: Solvent; positive control (H₂O₂ 10 μM); ANQ 0.1 μg/mL; ANQ 1 μg/mL; ANQ 5 μg/mL; ANQ 10 μg/mL; (C) The effect of ENDOIII and FPG post-treatment on 5-amino-2,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone, (ANQ-OH) induced DNA migration in modified comet assay. Columns from left to right: Solvent; positive control (H₂O₂ 10 μM); ANQ-OH 0.1 μg/mL; ANQ-OH 1 μg/mL; ANQ-OH 5 μg/mL; ANQ-OH 10 μg/mL. Mean ± S.E.M. of two independent experiments. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001/one-way Turkey's Multiple Comparison Test.

4. Discussion

The substituted 1,4-naphthoquinones is ubiquitous in the nature. The toxicity of these compounds has been extensively studied and is generally accepted to be a function of (a) the capacity of quinones to produce ROS and (b) the electrophilicity of quinones, which enables them to form adducts to cellular macromolecules [10,12,41,42]. On the other hand, the mutagenesis of aminonaphthoquinones is poorly studied [17]. In the present paper, we investigated mutagenic activities of aminonaphthoquinones in different cells systems.

In *Salmonella*/microsome assay, ANQ and ANQ-OH induced mutagenesis, in presence of S9-mix, for strain TA102 which is sensitive to oxidative mutagens [21]. The mutagenic activity of aminonaphthoquinones to TA102 was expected in presence of metabolic activation. Indeed, the reduction of these compounds by cytochrome P-450 form a radical semiquinone and in presence of oxygen most semiquinone rapidly autooxidize, producing the radical hydroxyl and superoxide anion radical [43,44]. Furthermore, it has been demonstrated that ANQ interact and produce superoxide radical in *Staphylococcus aureus* [41]. The ANQ and ANQ-OH were mutagenic for TA98 (sensitive to frameshift mutagens) without metabolic activation. In presence o S9-mix only ANQ was mutagenic for TA98. Concerning aminonaphthoquinones induced frameshift mutations in TA98 (Table 2), we associated the ability of intercalation non-covalent into DNA of polycyclic aromatics and the presence of a cationic substituent amino group on these molecules [24,45]. For NQ, our data shown that this compound did not induce mutagenesis in all *Salmonella* strain tested, in presence and absence of metabolic activation. In agreement with our results, Sakai et al [46] also shown that NQ did not induce mutagenesis in TA97, TA98 and TA100 with and without S9-mix. However, Hakura et al. [17] observed mutagenic activity for NQ in TA100 in presence and absence of metabolic activation and for TA97 and TA102 with metabolic activation. These controversial results can be explained by the mutagenicity of naphthoquinones is relatively small when compared to the cytotoxicity [17].

When we investigated the citotoxicity of naphthoquinones in *Saccharomyces cerevisiae* it was observed that all strains were more sensitive for NQ than aminonaphthoquinones. The cytotoxicity of quinones is influenced by nature and position

of substituent on quinone molecule [17]. The concentrations tested for ANQ and ANQ-OH were higher than NQ, indicating that amino group leads to decreased toxicity in all yeast strain used. In addition of this idea, Rodriguez and co-workers [42] suggest that the mechanism of naphthoquinones toxicity depends on not only superoxide production but also the electrophilicity of quinone molecule. That is why the NQ data for toxicity is highest than ANQ and ANQ-OH-toxicity (Fig. 1, Table 3). The ANQ and ANQ-OH compounds are not mutagenic and recombinogenic agent in the yeast cells. The NQ is the only compound that induces a weakly mutagenesis but not induces recombinogenic events. Considering these results, the absence of amino and hydroxyl group in NQ decrease its electrophilicity and, consequently, it can bypass biological membranes easily and reach the nucleus and interact with DNA.

The alkaline SCG assay is sensitive procedure to quantify DNA lesions in cells, which includes single and double DNA strands breaks [35]. The comet assay shows significant increase of DNA damage for NQ and ANQ in presence and absence of metabolic activation and ANQ-OH only in presence of S9-mix. It was demonstrated that one-electron reduction by cytochrome P-450 of quinones to semiquinones induced mutagenesis [43] and increase the cytotoxicity [10], which explain the DNA damage of ANQ-OH in presence of metabolic activation. Our results clearly indicate that ENDOIII and FPG proteins usually applied in the comet assay for the detection of oxidative damage could elucidate the mechanisms of action of naphthoquinones in ROS production. The first one recognizes and removes 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (Fapy-Ade), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Fapy-Gua) and 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua, also known as 8-oxo-Gua) from high-molecular weight DNA with multiple lesions [47]. A small activity for 8-hydroxyadenine (8-OH-Ade) has also been detected. Fpg also excises 8-OH-Gua, the methylation product of guanine 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-methylformamidopyrimidine (Me-FapyGua), and pyrimidine-derived lesions such as 5-hydroxycytosine (5-OH-Cyt) and 5-hydroxyuracil (5-OH-Ura) from duplex oligonucleotides with a single lesion [48-50]. On the other hand, some substrates of ENDOIII are thymine glycol, 5-hydroxy-6-hydrothymine, alloxan, cytosine glycol, 5-hydroxyuracil (for structures and more details see [51,52]). One interesting thing is that

both enzymes excised purine-derived lesion FapyAde and can have overlapping substrate specificities for this kind of lesion [51].

Dramatic increases in both ENDOIII and FPG recognized break sites were induced in V79 cells following treatment with NQ. The increase of oxidative DNA damage found in ANQ (Fig. 3B) was noted. It appears from the data that ANQ induces damage predominantly to purines at intermediate concentrations and it can bring about pyrimidine-derived lesions at 1 $\mu\text{g/mL}$ concentration. It is known that 8-oxoG is mutagenic [53] and it can explain the mutagenic activity in prokaryotic cells for ANQ compound. The ROS generated by this process could attack DNA, leading to base damage and DNA strand excision. The true strand breaks and/or the strand breaks formed as an intermediate step in excision repair of altered bases could explain the increased DNA migration in the comet assay in V79 cells after NQ and ANQ treatments.

Finally, the absence of sensitive sites for both enzymes (FPG and ENDOIII), after their incubation with ANQ-OH, indicate that this compound could not promote oxidative damage (Fig. 3C). It is suggested that the presence of hydroxyl group in position C2 can stabilize the quinoid form, can modify the one electron reduction of ANQ-OH, which can be associated a lesser efficient one-electron reduction. Similar effect was described in 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone [12]. Furthermore, Roberg et al [54] showed that 5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone (NTZ) induced oxidative stress in human foreskin fibroblast, which cause lysosomal membrane destabilization releasing proteases and loss of membrane potential in mitochondria, resulting in cell death. Considering the structural similarities with NTZ we suggest similar effects in V79 cells may also occur in NQ and ANQ.

Our results show that the presence of amino in C5 and hydroxyl group present in different position of 1,4-naphthoquinone decrease the toxicity of molecule in all cells tested. Moreover, aminonaphthoquinones are weak mutagenic agents in prokaryotic cells. In mammalian, NQ and ANQ are genotoxic agents and ANQ-OH is genotoxic only in presence of metabolic activation. Finally, the effect of these compounds in DNA is by oxidative damage.

Acknowledgments

We are grateful for financial support and scholarships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and GENOTOX.

References

- [1] M.N. Silva, V. F. Ferreira, M.C.B.V. Souza, An overview of chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on β -lapachone and derivatives, *Quim. Nova* 26 (2003) 407-416.
- [2] L. Thöny-Meyer, Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (1997) 337-376.
- [3] L.A. Brigham, P.J. Michaels, H.E. Flores, Cell-Specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizo*, *Plant Physiol.* 119 (1999) 417-428.
- [4] R.M. Phillips, M. Jaffar, D.J. Maitland, P.M. Loadman, S.D. Shnyder, G. Steans, P.A. Copper, A. Race, A.V. Patterson, I.J. Stratford, Pharmacological and biological evaluation of a series of substituted 1,4-naphthoquinone bioreductive drugs, *Biochem. Pharmac.* 68 (2004) 2107-2116.
- [5] A.L. Baggish, D.R. Hill, Antiparasitic agent atovaquone, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (2002) 1163-1173.
- [6] T. Tran, E. Saheba, A.V. Arcerio, V. Chavez, Q. Li, L.E. Martinez, T.P. Primm, Quinones as antimycobacterial agents, *Bioorganic & Med. Chem.* 12 (2004) 4809-4813.
- [7] A. Riffel, L.F.C. Medina, V. Steffani, D. Bizani, A. Brandelli, Antimicrobial activity of a new series of naphthoquinones, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 811-818.
- [8] T.B. Machado, A.V. Pinto, M.C.F.R. Pinto, I.C.R. Leal, M.G. Silva, A.C.F. Amaral, R.M. Kuster, K.R. Netto-dos Santos, In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Internat. J. Antimicro. Agents.* 21 (2003) 279-284.
- [9] L.F.C. Medina, V. Stefani, A. Brandelli, Use of 1,4-Naphthoquinones for Control of *Erwinia carotovora*, *Canad. J. Microb.* 50 (2004) 951-956.
- [10] J.L. Bolton, M.A. Trush, T.M. Penning, G. Dryhurst, T.J. Monks, Role of quinones in toxicology, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 135-160.
- [11] K. Öllinger, U.T. Brunk, Oxidative stress-induced cellular injury is mediated through lysosomal damage, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 565-574.
- [12] K. Öllinger, A. Brunmark, Effect of hydroxy substituent position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 21496-21503.

- [13] P.H. Lin, W.C. Pan, Y.W. Kang, Y.L. Chen, C. H. Lin, M.C. Lee, Y.H. Chou, J. Nakamura, Effects of naphthalene quinonoids on the induction of oxidative DNA damage and cytotoxicity in calf thymus DNA and in human cultured cells, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 1262-1270.
- [14] R. Zangh, O. Hirsch, M. Mohsen, A. Samuni, Effects of nitroxide stable radicals on juglone citotoxicity, *Arch. Biochem. Biophys.* 312 (1994) 385-391.
- [15] G.D. Buffiton, K. Öllinger, A. Brunmark, E. Cadenas, DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates, *Biochem. J.* 257 (1989) 561-571.
- [16] L. Tikkanen, T. Matsushima, S. Natori, K. Yoshihira, Mutagenicity of natural naphthoquinones and benzoquinones in *Salmonella*/microsoma test, *Mutat. Res.* 124 (1983) 25-34.
- [17] A. Hakura, H. Mochida, Y. Tseutsui, K. Yamatsu, Mutagenic and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains, *Chem. Res. Toxicol.* 7 (1994) 559-567.
- [18] G. Speit, P. Schütz, I. Bonzheim, K. Trenz, H. Hoffmann, Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay, *Toxicol. Lett.* 146 (2004) 151-158.
- [19] A.R. Collins, S.J. Duthie, V.L. Dobson, Direct enzymatic detection of endogenous base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis* 14 (1993) 1733-1735.
- [20] F. Fariña, M. Martinez-Utrilla, M. Paredes, V. Stefani, Synthesis of 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone and derivatives, *Synthesis* 8 (1985) 781-784.
- [21] D.M. Maron, B.N. Ames, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test, *Mutat. Res.* 113 (1983) 173-215.
- [22] R.C. von Borstel, K.T. Cain, C.M. Steinberg, Inheritance of spontaneous mutability in yeast, *Genetics* 69 (1971) 17-27.
- [23] I. Machida, S. Nakai, Induction of spontaneous and UV-induced mutations during commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut. Res.* 73 (1980) 59-68.
- [24] K. Mortelmans, E. Zeiger. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.* 455 (2000) 29-60.
- [25] D. Burke, D. Dawson, T. Stearns, Methods in yeast genetics, in: Cold Spring Harbour Laboratory Course Manual, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 2000.

- [26] S. Snow, Absence of suppressible alleles at the *his 1* locus of yeast, *Mol. Gen. Genet.* 164 (1978) 341-342.
- [27] D.C. Hawthorne, Identification of nonsense codons in yeast, *J. Mol. Biol.* 43 (1969) 71-75.
- [28] D.C. Hawthorne, R. K. Mortimer, Suppressors in yeast. *Genetics* 48 (1963) 617-620.
- [29] R.C. Schuller, R.C. von Borstel, Spontaneous mutability in yeast. I. Stability of lysine reversion rates to variation of adenine concentration, *Mutat. Res.* 24 (1974) 17-23.
- [30] H.H.R. Andrade, E. Moustacchi, J.A.P. Henriques, The PSO3 gene is involved in an error-prone intragenic recombinational DNA repair in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 219 (1989) 75-80.
- [31] G. Speit, B. Habermeier, R. Helbig, Differences in the response to mutagens between two V79 sublines, *Mutat. Res.* 325 (1994) 105-111.
- [32] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Scheider, A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191.
- [33] A. Hartmann, G. Speit, The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (Comet assay), *Toxicol. Lett.* 90 (1997) 183-188.
- [34] S.B. Nadin, L.M.V. Roig, D. R. Ciocca, A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1183-1186.
- [35] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- [36] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud, R.R. Tice, Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, in: *Proceedings of the Fourth International Comet Assay Workshop, Mutagenesis*, 18 (2003) 45-51.
- [37] S.I.R. Franke, D. Prá, J. Da Silva, B. Erdtmann, J.A.P. Henriques, Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and Cu SO₄ in mouse blood cells in vivo, *Mutat. Res.* 583 (2005) 75-84.

- [38] A.R. Collins, The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.* 26 (2004) 249–261.
- [39] J. Silva, T.R.O. Freitas, V. Heuser, J.R. Marinho, B. Erdtmann, Genotoxicity biomonitoring in coal regions using wild rodent *Ctenomys torquatus* by assay and micronucleus test, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 270–278.
- [40] L. Myers, N. Adams, L. Kier, T.K. Rao, B. Shaw, L. Williams, Microcomputer software for data management and statistical analysis of the Ames/*Salmonella* test. In: Krewski, D. and C.A. Franklin (Eds.), *Statistics in Toxicology*, Gordon and Breach, New York, 1991, pp. 265-279.
- [41] L.F.C. Medina, P. Hertz, V. Stefani, J.A.P. Henriques, A. Zanotto-Filho, A. Brandelli, Aminonaphthoquinone induced oxidative stress in *Staphylococcus aureus*, *Biochem. Cell Biol.* 84 (2006) 720-727.
- [42] C.E. Rodriguez, M. Shinyashiki, J. Froines, R.C. Yu, J.M. Fukuto, A.K. Cho, An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system, *Toxicology* 201 (2004) 185-496.
- [43] P.L. Cheis, D.E. Levin, M.T. Smith, L. Ernester, B.N. Ames, Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolic activation and detoxification, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81 (1984) 1696-1700.
- [44] K. Öllinger, J. Llopois, E. Cadenas, Study of redox properties of naphtharazin (5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone) and its glutathionyl conjugate in biological reactions: one- and two-electron enzymatic reduction, *Arch. Biochem. Biophys.* 275 (1989) 514-530.
- [45] R.D. Snyder, M.R. Arnone, Putative identification of functional interactions between DNA intercalating agents and topoisomerase II using V79 in vitro micronucleus assay, *Mutat. Res.* 503 (2002) 21-35.
- [46] M. Sakai, D. Yoshida, S. Mizusaki, Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97, *Mutat. Res.* 156 (1985) 61-67.
- [47] S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval, M. Dizdaroglu, Substrate specificity of the *Escherichia coli* FPG protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization, *Biochemistry* 31 (1992) 106-110.

- [48] J. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M.-H. Chung, J. Laval, A.P. Grollman, S. Nishimura, 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 4690-4694.
- [49] S.S. Wallace, Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA, Radiat. Res. 150 (1998) S60-79.
- [50] J. Laval, J. Jurado, M. Saparbaev, O. Sidorkina, Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage, Mutat. Res. 402 (1998) 93-102.
- [51] M. Dizdaroglu, Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases, Mutat. Res. 591 (2005) 45-59.
- [52] M. Dizdaroglu, C. Bauche, H. Rodrigues, J. Laval, Novel substrates of *Escherichia coli* Nth protein and its kinetics for excision of modified bases for DNA damage by free radicals, Biochemistry 39 (2000) 5586-5592.
- [53] J. Brozmanová, A. Dudás, J.A.P. Henriques, Repair of oxidative DNA damage – an important factor reducing cancer risk. Neoplasma 48 (2001) 85-93.
- [54] K. Roberg, U. Johanson, K. Öllinger, Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome C and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress, Free Radic. Biol. Med. 27 (1999) 1228-1237.

CAPÍTULO V

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO GERAL

Os derivados da 1,4-naftoquinona são encontrados em inúmeros organismos, participando de vários processos biológicos. A capacidade de algumas destas substâncias de inibirem protozoários e inativar proteínas do ciclo celular, como a ciclina cinase (CDK25), torna-as de grande interesse para obtenção de novos medicamentos (Bagashi & Hill, 2002; Brun *et al.* 2005). As naftoquinonas também são importantes para indústria de cosméticos, sendo empregadas como pigmento (henna) para cabelo e em tatuagem (Marzin & Kirkland, 2004). Além disso, estes compostos apresentam papel fundamental na fotossíntese de plantas e bactérias e na respiração de vários gêneros bacterianos, despertando interesse para elucidar os processos bioenergéticos, bem como as enzimas que participam destes eventos (McNamara & Proctor, 2000; Sakuragi *et al.* 2002; Zouh *et al.* 2003). Por outro lado, as naftoquinonas podem ser formadas nas células hepáticas a partir da metabolização de poliaromáticos, substâncias essas liberadas pelo escapamento de automóveis, fumaça de cigarro, indústria petroquímica, entre outras fontes, sendo associadas à formação de tumores (Rothrman *et al.* 1990; Xue & Warshawsky, 2006).

A natureza eletroquímica destas moléculas permite que elas sejam reduzidas por várias enzimas, tais como a DT-diaforase e a citocromo P-450 redutase. Neste processo de redução, é amplamente aceito que ao se oxidarem novamente as naftoquinonas formam espécies reativas de oxigênio (ERO) como superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e hidroxila (-OH). As

naftoquinonas podem ainda reagir com componentes eletrofílicos das células como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Nutter *et al.* 1992; Öllinger & Brunk, 1993; Silva *et al.* 2003, Cojocel *et al.* 2006).

No presente estudo, foi investigada a genotoxicidade de duas aminonaftoquinonas (ANQ e ANQ-OH) obtidas por síntese em células procarióticas e eucarióticas e a ação da ANQ sobre a bactéria *Staphylococcus aureus*.

5.1 A citotoxicidade das aminonaftoquinonas

A citotoxicidade das naftoquinonas, como já mencionado, está associada à produção de espécies reativas de oxigênio (Cojocel *et al.* 2006). No capítulo I foi demonstrado que ANQ e NQ produzem o ânion superóxido na bactéria *S. aureus*, confirmando a capacidade de ANQ gerar ERO. Nos experimentos de crescimento com *S. aureus*, ANQ foi bacteriostática nas primeiras 6 horas nas concentrações entre 10 µg/mL e 50 µg/mL. A adição dos antioxidantes ascorbato de sódio ou Tiron juntamente com ANQ diminuíram os efeitos tóxicos deste composto para a bactéria. A capacidade dos antioxidantes protegerem os microrganismos durante o crescimento na presença de derivados de naftoquinonas também foi observado por Bogdanov *et al.* (1996) e Medina *et al.* (2004), indicando que estas substâncias produzem ERO. Salienta-se ainda que o *S. aureus* promoveu a redução da ANQ nas primeiras horas como descrito por Medina *et al.* (2006), mostrando que o microrganismo precisa transformar o ANQ em uma forma menos tóxica para poder crescer.

A toxicidade da NQ foi maior que a da ANQ (capítulo I e II) e da ANQ-OH (capítulo II) em todas as células testadas. A capacidade das naftoquinonas formarem ERO é influenciada pela natureza e posição dos substituintes na molécula (Tikkanen *et al.* 1983;

Bolton *et al.* 2000). NQ possui um valor de potencial redox que permite a redução com um elétron realizado por enzimas como a citocromo P-450 redutase formando uma semiquinona. Esta semiquinona formada é instável e se autooxida produzindo ERO, resultando em danos na célula. Por outro lado, a naftazarina (5,8-dihidroxi-1,4-naftoquinona) igualmente possui um potencial redox que permite ser reduzida pela citocromo P-450 redutase. No entanto, este composto forma uma semiquinona mais estável, aumentando a eficiência na produção de ERO e aumentando sua toxicidade em hepatócitos de rato (Ollinger & Brunmark, 1991). Medina (2002), avaliando a atividade antimicrobiana da naftazarina, observou que este composto foi mais tóxico para *S. aureus*, *Xanthomonas axonopodis* e *Erwinia carotovora*, quando comparada com ANQ, sugerindo que o grupamento amino diminua a toxicidade de ANQ.

O grupamento hidroxila ligado ao carbono 2 do anel quinônico da henna diminui muito o seu potencial redox, dificultando a redução desta molécula por um elétron promovida pela citocromo P-450 redutase (Ollinger & Brunmark, 1991). Este efeito é associado a ANQ-OH, que apresenta uma hidroxila ligada ao carbono 2, e assim como a henna este composto pode ser reduzido menos eficientemente pela citocromo P-450 redutase, resultando em menor toxicidade que ANQ.

5.2 Mutagênese e recombino gênese das naftoquinonas

As naftoquinonas ANQ e ANQ-OH apresentaram mutagênese somente em células procarióticas (capítulo II). Estes compostos, em presença de ativação metabólica, induziram mutagênese na linhagem TA102, sensível a danos oxidativos. A fração S9-mix contém a enzima citocromo P-450 redutase que realizam a redução com um elétron das

naftoquinonas, desta forma ao se autooxidar estes compostos geram o ânion superóxido, promovendo danos no DNA. As aminonaftoquinonas também induziram mutagênese na linhagem TA98 sem ativação metabólica e somente ANQ foi mutagênica com ativação metabólica. A capacidade de ANQ e ANQ-OH induzirem *frameshift* em TA98 sugere que além dos danos oxidativos, amplamente documentados, estes compostos também tenham a capacidade de se intercalar ao DNA. Efeito similar foi observado por Hakura *et al.* (1994) em relação a 4-amino-1,2-naftoquinona, no qual este composto induziu danos oxidativos e *frameshift*.

Em relação à mutagênese, os resultados descritos na literatura são conflitantes para diferentes naftoquinonas. Tikkanen *et al.* (1983) constatou que a henna induzia mutações do tipo *frameshift*, enquanto Hakura *et al.* (1994) e Kirkland & Marzin (2003) divergem destes resultados para henna. Por outro lado, Hakura *et al.* (1994) observou que a NQ induz mutações *frameshift* (TA98) e substituição de base (TA100) porém, Sakai *et al.* (1984) e os resultados do capítulo II mostram que NQ não induz este tipo de dano. Desta forma, foi sugerido que, como estes compostos apresentam uma toxicidade elevada, este fato pode causar problemas para identificar a dose exata para o efeito destes compostos (Hakura *et al.* 1994).

5.3 Atividade bioquímica da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona e 1,4-naftoquinona na bactéria *Staphylococcus aureus*

A ANQ e NQ bloqueiam a cadeia respiratória da bactéria *S. aureus*. Esta inibição foi associada à similaridade estrutural com a menaquinona, que é a quinona componente da cadeia respiratória do *S. aureus* (McNamara & Proctor, 2000). Bogdanov *et al.* (1997)

demonstraram que a 2-hidroxi-N-(3,4-dimetil-5-isoxazolil)-1,4-naftoquinona é capaz de interagir com micelas lipídicas artificiais, o que facilitaria a interação com os componentes da cadeia respiratória do *S. aureus*. A NQ e ANQ interferem na cadeia respiratória do *S. aureus*, desviando elétrons para si. Por outro lado, ao bloquear a respiração com cianeto de potássio e incubar a bactéria com os compostos, observou-se consumo de oxigênio, indicando que este consumo seria extra cadeia respiratória. Resultados semelhantes foram observados por Haraguchi *et al.* (1997), aonde a fusaribina estimulava o consumo de oxigênio e de NADH, mesmo na presença de cianeto de potássio.

A capacidade de ANQ produzir o ânion superóxido, demonstrado no capítulo I, corrobora a capacidade das naftoquinonas de gerar o ânion superóxido (Bolton *et al.* 2000). Esta capacidade é dependente do potencial redox destes compostos. O'Brien (1991) descreveu que o valor do potencial redox de quinonas entre -250 e +50 mV é decisivo para estes compostos sofrerem redução por um elétron, entrando desta forma num processo tipo “ping-pong”, produzindo ERO.

Nos ensaios de oxidação de lipídios com *S. aureus* (capítulo I), demonstra-se que ANQ e NQ promovem aumento na produção de danos no meio sem aeração. A redução descrita para ANQ nos experimentos de crescimento também ocorre. No entanto, ao manter o meio constantemente aerado, o tubo com ANQ não sofre alteração de cor, indicando que mesmo sendo reduzida pelo *S. aureus* a ANQ torna a se oxidar, mantendo a cor azul característica do composto. Por fim, a quantidade de danos neste tratamento aumentou significativamente em relação ao não aerado demonstrando que os danos aos lipídios estão associados à geração de ERO. Estes resultados estão de acordo com Roberg *et al.* (1999), que demonstraram que a naftazarina promove peroxidação de lipídios, desencadeando em danos na célula, resultando na sua morte.

5.4 Ensaio Cometa

A ANQ e NQ aumentaram, significativamente, os índices de dano no DNA, detectados pelo ensaio Cometa nas células V79, com e sem ativação metabólica e ANQ-OH em presença de metabolização. Resultado similar foi observado por Ollikainen *et al.* (1998), aonde ao incubar diferentes concentrações de menadiona com células pulmonares observaram aumento de dano ao DNA causado pelo composto. Além disto, estes autores associaram o aumento de danos a contínua produção de ERO. No ensaio Cometa modificado, realizado com as enzimas FPG e ENDOIII, reforça-se a idéia de que NQ e ANQ promovem danos oxidativos. Demonstrando que NQ induz lesões do tipo fapy-Ade e fapy-Gua e 8-oxo-Gua e em bases pirimidicas, enquanto que, ANQ promove danos especialmente em bases púricas (8-oxo-Gua).

Por outro lado, não se observa aumento no dano do DNA após o tratamento com ANQ-OH, mesmo após incubar com as enzimas, sugerindo que a presença do substituinte hidroxila ligado ao carbono 2 do anel quinônico interfira na formação de ERO, como discutido anteriormente. ANQ-OH promove danos no DNA somente quando incubado com S9-mix, sugerindo que um excesso de enzimas, como citocromo P-450 redutase, possam promover a redução deste composto mais eficientemente gerando ERO. Em contraste, Marzin & Kirkland 2004 demonstraram que a henna, que também possui uma hidroxila ligada ao carbono 2, não induz danos oxidativos no DNA de células de ovário de hamster Chinês, mesmo no tratamento com ativação metabólica.

Os resultados obtidos nos capítulos I e II, somados aos trabalhos previamente realizados (Medina 2002; Riffel *et al.* 2002; Medina *et al.* 2004; Medina *et al.* 2006) mostram evidências que as aminonaftoquinonas e em especial a ANQ geram o ânion

superóxido, resultando em danos nas mais diversas estruturas celulares, podendo levar a célula a morte, conforme modelo proposto (Figura 8). A diminuição da citotoxicidade de ANQ, quando comparada com NQ ou naftazarina, indica que a presença do grupamento amino interfere nesta resposta, abrindo novas perspectivas que permitam compreender estes eventos e com isto procurar associar estas informações as naftoquinonas, hoje já empregadas como medicamentos.

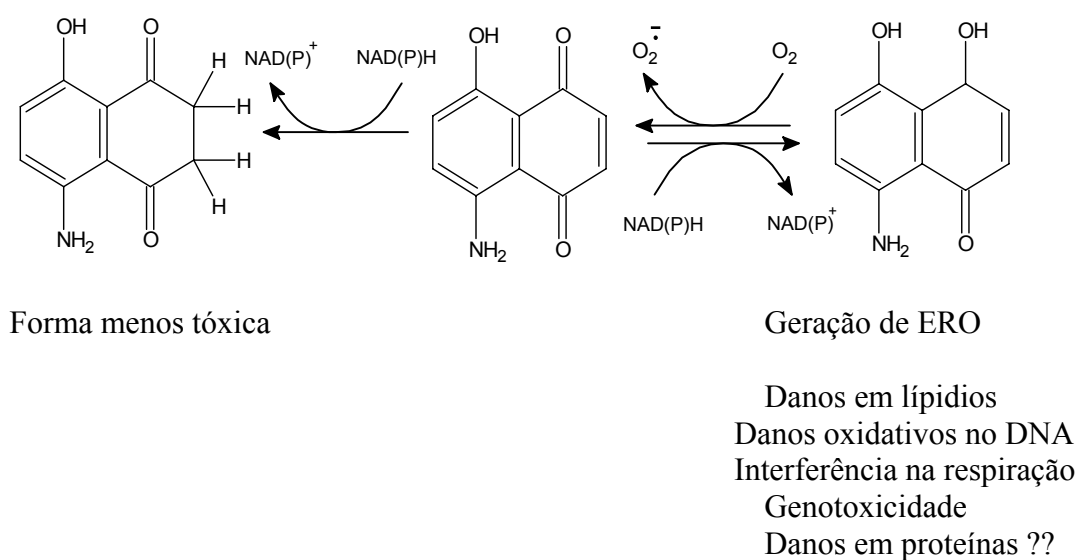


Figura 8. Mecanismo citotóxico proposto para ANQ. Modificado de Bolton *et al.*

2000.

CAPÍTULO VI
CONCLUSÕES

6. Conclusões

- A 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona (ANQ) produz o ânion superóxido na bactéria *Staphylococcus aureus*.

- A ANQ e NQ interferem no processo respiratório de *S. aureus*, desviando o fluxo de elétrons.

- A ANQ e NQ aumentam a peroxidação de lipídios no ambiente com elevada concentração de oxigênio indicando um contínuo processo de oxi-redução.

- As aminonaftoquinonas são fracos agentes mutagênicos em células procarióticas e não promovem eventos recombinogênicos e não induzem mutagênese na levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

- Os índices de danos no DNA, detectados no ensaio cometa em células V79, em presença e ausência de ativação metabólica para ANQ e NQ indicam que estes compostos promovem quebras no DNA e que a ANQ-OH promove danos no DNA somente com ativação metabólica.

- O ensaio cometa modificado (com as enzimas FPG e ENDOIII) demonstra que as quebras que a ANQ e NQ geram são devidas a danos oxidativos.

CAPÍTULO VII
PERSPECTIVAS

7. Perspectivas

- Determinar o potencial redox de ANQ e ANQ-OH.
- Realizar o ensaio cometa modificado com as enzimas FPG e ENDOIII, utilizando ANQ e ANQ-OH com ativação metabólica.
- Avaliar se ANQ-OH produz o ânion superóxido, utilizando o ensaio com azul de nitrotetrazólio.
- Avaliar se ANQ e ANQ-OH promovem despolarização da membrana mitocondrial.
- Realizar cultura organotípica com hepatócitos de ratos com NQ, ANQ e ANQ-OH.
- Realizar o *docking* de ANQ e ANQ-OH com as enzimas DT-diaforase e citocromo P-450, utilizando o programa *molecular operating environment* – MOE ou similar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afrasiabi, Z., Sinn, E., Kulkarni P.P., Ambike, V., Padhye, S., Deobagakar, D., Heron M., Gabbutt, C., Anson, C.E., Powell, A.K. Synthesis and characterization of copper(II) complexes of 4-alkyl/aryl-1,2-naphthoquinones thiosemicarbazones derivatives as potent DNA cleaving agents. *Inorg Acta* 358:2023-2330, 2005.

Alake, L.B. Antibacterial activity of diosquinone isolated from *Diospyros tricolor*. *Planta Med*, 60:477, 1994.

Albesa, I., Bogdanov, P., Eraso, A., Sperandeo, N.R., Bertorello, M.M. Antibiotic activity of isoxazolylnaphthoquinone imines on mice infected with *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bact*, 78:373-377, 1995.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. *Curr. Protocols in Mol. Biol.* New York:Wiley, 1995.

Bader, M., Muse, W., Ballou, D.P. Gassner, C and Bardwell, J.C.A. Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell*, 98:217-227, 1999.

Baggish, A.L., Hill, D.R. Antiparasitic agent atovaquone. *Anti Agen Chemot*, 46:1163-1173, 2002.

Boeira, J.M.; Viana, A.F.; Picanda, J.N; Henriques, J.A.P. Genotoxic and recombinogenic activities of the b-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 500:39-48, 2002.

Bogdanov, P., Albesa, I., Sperandeo, N.R., Luna, C., Bertorello, M.M. Antibacterial effect of 2-hydroxy-N-(3,4-dimethyl-5-isoxazolyl)-1,4-naphthoquinone-4-imine on *Staphylococcus aureus*. *Experientia*; 52:600-604, 1996.

Brandelli, A., Bizani, D., Martinelli, M., Stefani, V., Gerbase A.E. Antimicrobial activity of 1,4-naphthoquinones by metal complexation. *Braz J Pharm Science*, 40:247-253, 2004.

Breton, J. Efficient exchange of the primary quinone acceptor QA in isolated reaction center of *Rhodospirillum rubrum*. *Proc Nat Acad Sci*, 94:11318-11323, 1997.

Brigham, L.A., Michaels P.J., Flores, H.E. Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorizon*. *Plant Phys*, 119:417-428, 1999.

Brun, M.P., Montes, M., Miteva, M., Gresh, N. Ducommun, B., Garbay, C. Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatase inhibitory activity. *Bioorg Med Chem*, 13:4871-4879, 2005.

Buschini, A., Poli, P., Rossi, C. *Saccharomyces cerevisiae* as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones *Mutat*, 18:25-36, 2003

Chatterjee, T., Mukhopadhyay, A., Khan, K.A., Giril, A.K. Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine. *Mutat*, 113:619-624, 1998.

Chesis, P.L., Levin, D.E., Smith, M.T., Ernster, L. Ames, B.N. Mutagenicity of quinones: Pathways of metabolic activation and detoxification. Proc Natl Acad Sci, 81:1696-1700, 1984.

Cojocel, C.; Novoty, L., Vachalkova, A. Mutagenic and carcinogenic potential of menadione. Neoplasma, 53:316-323, 2006.

Collins, M.D. and Jones, D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. Microb Rev, 45:316-354, 1981.

Croft, S.L., Hogg, J., Gutteridge, W.E., Hudson, T., Randall, A.W. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. J Anti Chemot, 30:827-832, 1992.

Denda, A., Sai, K., Tang, Q., Tsujiuchi, T., Tsutsumi, M., Amanuma, T., Murata, Y., Nakae, D. Maruyama, H., Kurokawa, Y., Konishi, Y. Induction of 8-hydrodeoxyguanosine but not initiation of carcinogenesis by redox enzyme modulation with or without menadione in rat liver. Carcinogenesis, 12:719-726, 1991.

Fariña, F., Martinez-Utrilla, M., Paredes, M. Stefani, V. Synthesis of 5-amino-8-hydroxi-1,4-naphthoquinone and derivatives. Synthesis, 8:781-784, 1985.

Fieser, L.F., Hartwetll, J.L. The Reaction of Hydrazoic Acid with the Naphthoquinones. J Amer Chem Soc, 57:1482-1484, 1935.

Gaisser, S., Heide, L. Inhibition and regulation of shikonin biosynthesis in suspension cultures of *Lithospermum*. Phytochem, 41:1065-1072, 1996.

Guillen, F., Martinez, M.J., Munoz, C. Martinez, A.T. Quinone redox cycling in ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii* leading to extracellular production of superoxide anion radical. Arch Biochem Bioph, 339:190-199, 1997.

Hakura, A., Mochida, H., Tsutsui, Y., Yamatsu, K. Mutagenicity and cytotoxicity of naphthoquinones for Ames *Salmonella* tester strains. Chem Res Toxic, 7:559-567, 1994.

Haraguchi, H., Yokoyama, K., Oike, S., Ito, M., Nozaki, H., Respiration stimulation and generation of superoxide radicals in *Pseudomonas aeruginosa* by fungal naphthoquinones. Arch Microb, 167:6-10, 1997.

Hartmann, A. & Speit, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). Toxic Lett, 90:183-188, 1997.

Heiser, L. Oswald, W., Baker, R., Nemeč, S., Elstner, E.F. Activation of fusarium naphthazarin toxins and others p-quinones by reduced thiocetic acid. J Plant Phys, 153:276-280, 1998.

K. Roberg, U. Johanson, K. Öllinger, Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome C and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress, Free Radic Biol Med, 27:1228-1237, 1999.

Kapadia, G.J., Azuine, M.A., Balasubramanias, V., Sridhar, R. Aminonaphthoquinones – a novel class of compounds with potent antimalarial activity against *Plasmodium falciparum*. Pharmac Res, 43:363-367, 2001

Kirkland, D., Marzin, D. An assessment of the genotoxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye ingredient of Henna. Mut Res, 537:183-199, 2003.

Kupiec, M. Damage-induced recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mut Res*, 451:91-105, 2000.

Lin, P.H., Pan, W.C., Kang, Y.W., Chen, Y.L. Lin, C.H. Lee, M.C., Chou, Y.H. Nakamura, J. Effects of naphthalene quinonoids on the induction of oxidative DNA damage and cytotoxicity in calf thymus DNA and in human cultured cells. *Chem Res Toxic*, 18:1262-1270, 2005

Longo, V.D. Gralla, E.B., Valentine, J.S. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271:12275-12280, 1996.

Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C.F.R., Leal, I.C.R., Silva, M.G., Amaral, A.C.F., Kuster, R.M. Netto-dos Santos, K.R. In vitro activity of Brazilian medical plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Intern J Antim Age*, 21:279-284, 2003.

Mantylä, A., Garnier, T., Rautio, J., Nevalainen, T., Vepsäläinen, J., Koskinen, A., Croft, S.L., Jarvinen, T. Synthesis, in vitro evaluation and antileishmanial activity of water-soluble prodrugs of buparvaquone. *J Med Chem*, 47:188-195, 2004.

Martins, E.A.L. & Meneghini, R. DNA damage and lethal effects of hydrogen peroxide and menadione in Chinese hamster cells: distinct mechanisms are involved. *Free Rad Biol Med*, 8:433-440, 1990.

Marzin, D., Kirkland, D. 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the natural dye of henna, is non genotoxic in mouse bone marrow micronucleus test and does not produce oxidative DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mut Res*, 560:41-47, 2004.

McCoull, K.D., Rindgen, D., Blair, I.A., Penning, .T.M. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon *o*-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem Res Toxic*, 12:237-246, 1999.

McNamara, P.J. & Proctor, R.A. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infection. *Intern J Antim Agen* 14:177-122, 2000.

Medina, L.F.C. Caracterização da atividade antimicrobiana de uma nova série de naftoquinonas contra microrganismos fitopatogênicos e *Staphylococcus aureus*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), 70 f, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

Medina, L.F.C., Stefani, V., and Brandelli, A. An unusual reduction on the quinonoid ring of 5-amino-8-hydroxy-1,4-naphthoquinone by *Staphylococcus aureus*. *Let Appl Microb*, 42: 381-385, 2006.

Medina, L.F.C., Stefani, V., Brandelli, A. Use of 1,4-naphthoquinones for control of *Erwinia carotovora*. *Canad J Microb*, 50:951-956, 2004.

Morgan, W.A. Hartley, J.A. Cohen, G.M. Quinone induced DNA single strand break in rat hepatocytes and human chronic myelogenous leukaemic K562 cells. *Biochem Pharm*, 44:215-221, 1992.

Morrison, H., Jernstrom, B., Nordenskjold, M., Thor, H., Orrenius, S. Induction of DNA damage by menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Pharma*, 28:37-47, 1985.

Mortelmans, K. Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay, *Mut Res*, 455:29-60, 2000.

Munday, R. Concerted action of DT-diaphorase and superoxide dismutase in preventing redox cycling of naphthoquinones: an evaluation. *Free Rad Res*, 35:145-158, 2001.

Nielsen, A.F., Corcoran, G.B., Poulsen, H.E., Kamendulis, L.M., Loft, S. Menadione induced DNA fragmentation without 8-ox-2'-deoxyguanosine formation in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmac*, 49:1469-1474, 1995.

Nutter, L.M., Ngo, E.O., Fisher, G.R., Gutierrez, P.L. DNA strand scission and free radical production in Menadione treated cells. *J Biol Chem*, 267:2474-2479, 1992.

O'Brien, P.J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem-Biol Inter*, 80:1-41, 1991.

Ollikainen T.J., Linnainmaa, K.I., Raivio, K.O., Kinnula, V.L. DNA single strand breaks and adenine nucleotide depletion as indices of oxidant effects on human lung cells. *Free Rad Biol Med*, 24:1088-1096, 1998.

Ollinger, K., Brunk, U. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Rad Biol Med*, 19:565-574, 1995.

Ollinger, K., Brunmark, A. Effect of hydroxyl substituents position on 1,4-naphthoquinone toxicity to rat hepatocytes. *J Biol Chem*, 266:21496-21503, 1991.

Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Couladours, E.A., Hepworth, D. Nicolaou, K.C. The chemistry and biology of alkanin, shikonin and related naphthazarin natural products. *Angew Chem Intern edition*, 38:270-300, 1999.

Park, J.H., Gopishetty, S., Szewczuk, L.M., Troxel, A.B., Harvey, R.G., Penning, T.M. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH *o*-quinones: Involvement of reactive oxygen species and copper (II)/Copper (I) redox cycling. *Chem Res Toxic*, 18:1026-1037, 2005.

Park, J.H., Troxel, A.B., Harvey, R.G., Penning, T.M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) *o*-Quinones Produced by the Aldo-Keto-Reductases (AKRs) Generate Abasic Sites, Oxidized Pyrimidines, and 8-Oxo-dGuo via Reactive Oxygen Species. *Res Toxic*, 19:719-728, 2006.

Poli, P., Buschini, A. Candi, A., Rossi, C. Bleomycin genotoxicity alteration by glutathione and cytochrome P-450 content in respiratory proficient and deficient strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutag*, 14:233-238, 1999.

Riffel, A., Medina, L.F.C., Stefani, V., Santos, R.C., Bizani, D., Brandelli, A. In vitro antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. *Braz J Med Biol Res*, 35:811-818, 2002.

Rodriguez, C.E., Shinyashiki, M., Froines, J., Yu, R.C., Fukuto, J.M., Cho, A.K. An examination of quinone toxicity using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Toxic*, 201:185-196, 2001.

Rossi, C., Poli, P., Candi, A., Buschini, A. Modulation of mitomycin C mutagenicity on *Saccharomyces cerevisiae* by glutathione, cytochrome P-450, and mitochondria interactions. *Mut Res*, 390:113,120, 1997.

Rothman, N., Poirier, M.C., Baser, M.E. Hansen, J.A., Gentile, C., Bowman, E.D., Strickland, P.T. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in peripheral blood cells during consumption of charcoal broiled beef. *Carcinogenesis*, 11:1241-1243, 1990.

Sakuragi, Y., Zybaïlov, B., Shen, G., Jones, D., Chitnis, P.R., Est, A., Bittl, R. Zech, S., Stehlik D., Golbeck, J.H. Bryant, D.A. Insertional inactivation of the *menG* gene, encoding 2-phytyl-1,4-naphthoquinone methyltransferase of *Synechocystis* sp. PCC6803, results in the incorporation of 2-phytyl-1,4-naphthoquinone into the A1 site and alteration of the equilibrium constant between A1 and Fx in photosystem I. *Biochemistry*, 41:394-405, 2002.

Santos R.C. Síntese de e estudo de aplicações potenciais de novos derivados da 5-amino-8-hidroxi-1,4-naftoquinona e da 3,5,8-trihidroxi-4-imino-1(4)naftalenona. Dissertação (Mestrado em química), 141 f, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J.A.P. *Genética Toxicológica*. 1ª edição, Editora Alcance, Porto Alegre, 2003.

Silva, M.N., Ferreira, V.F., Souza, M.C.B.V., Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na lapachona e derivados. *Quím Nov*, 26:407-416, 2003.

Simões, C.M. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª edição, Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

Singh, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mut Res*, 455:111-127, 2000.

Soonthornchareonnon, N., Suwanborirux, K., Bavovada, R., Patarapanich, C., and Cassady, J.M. New cytotoxic 1-azaanthraquinones and 3-aminonaphthoquinone from the stem bark of *Goniothalamus marcanni*. *J Nat Prod*, 62:1390-1394, 1999.

Stagliano, K.W., Emadi, A., Lu, Z., Malinakova, H.C., Twenter, B., Yu, M., Holland, L.E., Rom, A.M., Harwood, J.S., Amin, R., Johnson, A.A., Pommier, Y. Regiocontrolled synthesis and HIV inhibitory activity of unsymmetrical binaphthoquinone and trimeric naphthoquinone derivatives of conocurvone. *Bioorg Med Chem*, 14:5651-5665, 2006.

Tandon, V.K., Singh, R.V., Yadav D.B. Synthesis and evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antiviral, antifungal and anticancer agents. *Bioorg Med Chem Let*, 14:2901-2904, 2004.

Tandon, V.K., Yadav, D.B., Singh, R.V., Vaish, M., Chaturvedi, A.K., Shukla, P.K. Synthesis and biological evaluation of novel 1,4-naphthoquinone derivatives as antibacterial and antiviral agents. *Bioorg Med Chem Let*, 15:3463-3466, 2005.

Tikkanen, L., Matsushima, T., Natori, S. Yoshima, K. Mutagenicity of natural naphthoquinones and benzoquinones in Salmonel/microsome test. *Mut Res*, 124:25-34, 1983.

Xue, W. & Warshawsky, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage. *Toxic Appl Pharmac*, 206:73-93, 2005.

Zimmermann, F.K., von Borstel, R.C., von Halle, E.S., Parry, J.M., Seibert, D., Zetterberg, G., Barale, R., Loprieno, N. Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut Res* 133:199-244, 1984.

Zouh, Z., Fisher, D., Spidel, J., Greenfield, J., Paston, B., Fazal, A., Wigal, C., Moe, O.A., Madura, J.D. Kinetic and docking studies of interaction of quinones with the quinone reductase active site. *Biochemistry* 42:1985-1994, 2003.