



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIANA RODRIGUES XAVIER

**ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LAWSONA UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae COMO MODELO EXPERIMENTAL**

RECIFE

2018

MARIANA RODRIGUES XAVIER

**ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LAWSONA UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestra em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia,
Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientador: Profº. Drº. Marcos Antônio de Moraes Júnior

Coorientador: Profº. Drº. David Fernando de Moraes Neri

RECIFE

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Xavier, Mariana Rodrigues

Análise da atividade biológica da *Lawsonia* utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental / Mariana Rodrigues Xavier. – 2018.

67 f. : il.

Orientadora: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior.

Coorientador: Prof. Dr. David Fernando de Moraes Neri.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Pós-graduação em Biotecnologia, 2018.

Inclui referências.

1. . Plantas medicinais. 2. Química vegetal. 3. Leveduras. I. Moraes Júnior, Marcos Antônio de (Orientador). II. Neri, David Fernando de Moraes (Coorientador). III. Título.

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 021

MARIANA RODRIGUES XAVIER

**ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA LAWSONA UTILIZANDO
Saccharomyces cerevisiae COMO MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestra em Biotecnologia.

Aprovada em: 26/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Alexandre José da Silva Góes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Sebastião José Melo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus professores e orientadores Marcos Moraes e Will Pitta, pela troca de conhecimento e oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa do LGM. A vocês, meu carinho e admiração.

Ao meu professor orientador e amigo David Neri, pelo conhecimento cedido e toda confiança depositada em minha trajetória científica.

Aos meus pais, Caio e Tânia, por tanto amor, esforço e dedicação. A vocês a minha imensa e eterna gratidão.

Aos meus lindos irmãos, Maíra e Caio Júnior, todo amor e admiração a vocês que são os meus melhores presentes. À minha irmã de alma e companheira diária, Carolzinha, por representar tanto em minha vida.

Aos padrinhos que me abraçaram e acolheram como filha, Juliano e Karla, sem vocês não seria possível.

Ao meu namorado e companheiro Pedro, por tanto amor e parceria. Sem o meu fofinho não seria possível.

Aos amigos que fiz em Recife, pelo carinho e incentivo, e por muitas vezes, representaram minha família. Em especial, ao meu amigo/irmão Igor, sem palavras para agradecer.

Ao meu amigo e companheiro de Jornada, Thiago, pela força e encorajamento, e ao meu amigo Kelvin, por toda presteza de sempre.

Aos meus amigos/família de Laboratório, por todo conhecimento cedido e incentivo prestado. Em especial as minhas “Nenis”, Jack e Karol. Vocês são muito importantes para mim.

As minhas amigas/irmãs, que mesmo longe caminham comigo. Amo vocês, minhas companheiras de vida.

A Kalyton, por toda paciência e disponibilidade em ajudar.

A CAPES pela concessão de Bolsa de Pós-graduação durante os dois anos de mestrado.

Ao CNPq por todo apoio ao desenvolvimento científico.

RESUMO

A Lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) é o principal composto ativo encontrado no extrato das folhas da *Lawsonia inermis* (L.). Este composto exibe uma gama de bioatividades: antibacterianas, antifúngicas, antitumorais. No entanto, percebe-se ainda pouca informação acerca de sua ação biológica em nível molecular. O presente estudo pretendeu avaliar o efeito tóxico da Lawsona e o mecanismo de ação predominante, o principal agente bioativo extraído da folha de henna (*Lawsonia inermis*), utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental. A Linhagem mutante para o gene YAP1 foi utilizado como marcador de danos oxidativo indicados pelos resultados obtidos com uso da linhagem parental BY4741. O teste de susceptibilidade indicou a concentração inibitória mínima (CIM) da lawsona de 40 mg/L (229 mM) em meio sintético mineral. Entretanto, não foi observado inibição do crescimento mesmo na concentração de 100 mg/L (574 mM) da Lawsona quando as células foram cultivadas em meio complexo YPD. Os resultados mostraram que o efeito tóxico da Lawsona independe da presença de oxigênio e, provavelmente, não deve ter relação com a cadeia respiratória ou produção maciça de EROs. Revelaram também que a tolerância das células de *S. cerevisiae* aos efeitos tóxicos da lawsona é parcialmente dependente da presença da proteína Yap1, resultado da sua capacidade em arilar compostos tiólicos. Quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono (crescimento respiratório) na presença de lawsona, foi observada uma quebra no perfil de crescimento do mutante, justificado pela deficiência sua em eliminar o estresse oxidativo promovido através da produção de EROs pelas mitocôndrias e menor disponibilidade de GSH, diminuídos pela lawsona. Esta capacidade reacional justifica a reação espontânea envolvendo o radical -SH do antioxidante (NAC) a lawsona, na formação de uma molécula de efeito tóxico e letal. Somado a essa possibilidade, a capacidade reacional da lawsona com outros radicais -SH poderia explicar a ausência de efeito desta molécula cultivada em meio rico YPD, com reversão do efeito tóxico. Os resultados concluíram também que a lawsona causa danos a parede celular pela alteração na resistência da ação enzimática, após encubação das células em meio YPD.

Palavras-chave: Naftoquinona. Mecanismo de ação. Estresse oxidativo. Dano a parede celular.

ABSTRACT

Lawsona (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone) is the main active compound found in *Lawsonia inermis* (L.) leaves extract. This compound exhibits a range of bioactivities: antibacterial, antifungal, antitumor. However, there is still little information about its biological action at the molecular level. The present study aimed to evaluate the toxic effect of Lawsona and the predominant mechanism of action, the main bioactive agent extracted from the henna leaf (*Lawsonia inermis*), using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as an experimental model. The Mutant line for the YAP1 gene was used as a marker for oxidative damage indicated by the results obtained using the BY4741 parent strain. The susceptibility test indicated the minimum inhibitory concentration (MIC) of the 40 mg / L lawsona (229 mM) in mineral synthetic medium. However, no inhibition of growth was observed even at the concentration of 100 mg / L (574 mM) of Lawsona when the cells were grown in YPD complex medium. The results showed that the toxic effect of Lawsona is independent of the presence of oxygen and probably should not be related to the respiratory chain or massive production of ROS. They also revealed that tolerance of *S. cerevisiae* cells to the toxic effects of lawsona is partially dependent on the presence of the Yap1 protein, as a result of its ability to bind thiol compounds. When glycerol was used as a source of carbon (respiratory growth) in the presence of lawsone, a break in the growth profile of the mutant was observed, justified by its deficiency in eliminating the oxidative stress promoted through the production of EROs by mitochondria and lower availability of GSH , diminished by lawsona. This reaction capacity justifies the spontaneous reaction involving the radical -SH of the antioxidant (NAC) to lawsone, in the formation of a molecule of toxic and lethal effect. Added to this possibility, the reaction capacity of the lawsone with other -SH radicals could explain the absence of effect of this molecule grown in YPD rich medium, with reversion of the toxic effect. The results also concluded that the lawsona causes damages to the cell wall by the change in the resistance of the enzymatic action, after incubation of the cells in YPD medium.

Keywords: Naftoquinone. Mechanism of action. Oxidative stress. Cell wall damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Folhas da planta de Henna	13
Figura 2	Estrutura química da lawsona	14
Figura 3	A - Benzoquinona, B - naftoquinona e C – antraquinona	15
Figura 4	A – Quinona; B - semiquinona; C – Hidroquinona.....	16
Figura 5	Ciclo redox induzido por quinonas	17
Figura 6	Reação de Adição Nucleofílica de Michael.....	18
Figura 7	Estrutura da naftoquinona lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona)..	18
Figura 8	A - Estrutura química do antioxidante N-acetilcisteína (NAC).....	24
Figura 9	Polímero de quitina	29
Figura 10	Polímero de glucano	29
Figura 11	Composição e estrutura da parede celular da <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura 12	Ilustração da parede celular de leveduras.....	31
Figura 13	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do composto Lawsona.....	41
Figura 14	Placa de Cromatografia em camada Delgada (CCD) de amostras de lawsona.....	42
Figura 15	Curvas de crescimento em meios; sintético (YNB), meio rico (YPD), Extrato de Levedura/Sulfato, YNPeptona.....	44
Figura 16	Curva de crescimento de BY4741 em meio sintético YNB na presença de Glicose e Glicerol como fonte de carbono.....	46
Figura 17	Modelo de reação entre N-acetilcisteína (NAC) e 3,4-dideoxiglicosona-3-eno (3,4-DGE).....	47
Figura 18	Crescimento celular da BY4741 na presença e ausência de oxigênio.....	50
Figura 19	Curva de crescimento de yap1D em meio sintético YNB na presença de Glicose e Glicerol como fonte de carbono.....	52
Figura 20	Gráfico em barra dos grupamentos tióis citosólicos livres das linhagens: yap1Δ e BY4741.....	53
Figura 21	Crescimento celular da linhagem mutante yap1D presença e ausência de oxigênio.....	54
Figura 22	Experimento de sensibilidade da lise celular com a enzima liticase em incubação de altas doses de Lawsona.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

β -Lap	β -lapachona
CIM	Concentrao Inibitória Mínima
DOinicial	Densidade ptica Inicial
DOfinal	Densidade ptica Final
g/L	grama/Litro
L	Litro
Lw	Lawsona
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NAC	N-acetilcisteína
O ₂	Oxigênio
O ₂ •-	Superóxido de Oxigênio
OH•	Radical Hidroxila
pH	Potencial Hidrogeniônico
YNB	Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	12
1.1.1	Objetivo Geral.....	12
1.1.2	Objetivos Específicos.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	A ESPÉCIE LAWSONIA INERMIS	13
2.2	LAWSONA	14
2.3	QUINONAS E SUA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	15
2.4	NAFTOQUINONAS E SEUS MECANISMO DE AÇÃO	16
2.5	RADICAIS LIVRES	19
2.6	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	20
2.7	DEFESAS ANTIOXIDANTES	21
2.8	ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	21
2.8.1	Superóxido dismutase	21
2.8.2	Catalase	22
2.8.3	Peroxidases	22
2.8.4	Antioxidantes não-enzimáticos	23
2.9	O FATOR DE TRANSCRIÇÃO YAP1 SEU MECANISMO DE RESPOSTA A ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
2.10	VANTAGENS DO USO DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE COMO MODELO EXPERIMENTAL	25
2.11	A ESPÉCIE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	27
2.12	PAREDE CELULAR DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	SUBSTÂNCIAS	34
3.2	LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVOS	34
3.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DA LAWSONA	35
3.4	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	35
3.5	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	36

3.6	EFEITO DA LAWSONA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO...	36
3.7	RELAÇÃO ENTRE O EFEITO TÓXICO DA LAWSONA E A VIA REGULATÓRIA MEDIADA PELO MUTANTE YAP1	36
3.8	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TOXICIDADE DA LAWSONA NA PRESENÇA/AUSÊNCIA OXIGÊNIO (O ₂)	37
3.9	DETERMINAÇÃO DO GRUPAMENTO SULFIDRILA	38
3.10	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DA LAWSONA SOBRE A PAREDE CELULAR DE S. CEREVISIAE	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DA LAWSONA PARA A ESPÉCIE <i>S.cerevisiae</i>	40
4.1		
4.2	RELAÇÃO ENTRE O EFEITO TÓXICO DA LAWSONA E A VIA REGULATÓRIA MEDIADA POR YAP1.....	43
4.3	POSSÍVEL RELAÇÃO DA LAWSONA COM ESTRESSE OXIDATIVO	45
4.4	PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA YAP1 NA PROTEÇÃO CONTRA LAWSONA	50
4.5	INVESTIGAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DA LAWSONA SOBRE A PAREDE CELULAR DE CEREVISIAE.....	54
5	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1INTRODUÇÃO

Sabe-se que as naftoquinonas de origem natural, de modo geral, apresentam potencial citotóxico significativo e vêm sendo propostos como ingredientes tóxicos para o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer, por exemplo, atuando nas células tanto pela geração de metabólitos reativos, quanto na interferência de enzimas celulares cruciais para a proliferação celular. A tintura de henna é uma das tinturas naturais mais antigas do mundo (mais de 5.000 anos) extraídas da planta de henna (*Lawsonia inermis*). Foi utilizada como cosmético e em diversas aplicações biomédicas sendo a Lawsona, da classe das naftoquinonas, o principal composto ativo presente no extrato das folhas. Ficando conhecida por sua utilidade precursora para a síntese de alguns compostos com atividades biológicas importantes.

Devido a estrutura química (anel quinônico), sua participação é apontada em diversos processos bioquímicos de ação biológica importante, e o seu mecanismo de ação direta poderia ser explicado por suas propriedades oxidantes, de forma semelhante ao peróxido de hidrogênio, através da aceitação de um ou dois elétrons para formar intermediários na forma de radical altamente reativos na geração de estresse oxidativo. Além disso, as ações biológicas incluem, a inibição do transporte de elétrons, bioalquilação, intercalação, indução de quebras nas fitas do DNA, danos à parede celular e geração de radicais livres. Embora o potencial bioativo da Lawsona como composto anticancerígeno, antifúngico e antibacteriano seja conhecido, não há ainda um conjunto de evidências suficientes para determinação de seu mecanismo de ação a nível molecular. Seu estudo é crucial na garantia e segurança do ingrediente ativo e substância de qualidade em aplicação potencial.

Atualmente tem sido proposto o uso da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para se estudar a ação de fármacos devido à facilidade metodológicas de manipulação e experimentação, e principalmente pelo fato de que este organismo diploide compartilha cerca de 50% dos mesmos genes e praticamente todas as vias metabólicas e regulatórias dos seres humanos, tornando-a um excelente modelo para estudos de citotoxicidade.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito tóxico da Lawsona e o seu mecanismo de ação predominante em *S. cerevisiae* na expectativa de entender sua ação em células humanas para validação de seu uso como fármaco.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Este trabalho tem como objetivo geral, determinar a ação biológica da Lawsona e estudar os principais mecanismos relacionados, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Lawsona para a levedura
- *Saccharomyces cerevisiae*;
- Identificar o principal mecanismo tóxico da Lawsona;
- Determinar a participação dos diferentes mecanismos de sinalização celular responsável pela resistência das células ao composto;
- Identificar os mecanismos de cooperação entre as vias de sinalização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A ESPÉCIE LAWSONIA INERMIS

Lawsonia inermis (L.) é uma espécie monotípica do gênero *Lawsonia* (Família: Lythraceae) (Figura 1). Embora seja originária do norte da África e do meio Oeste, a planta é cultivada como uma cultura comercial na Índia, Egito, Somália, Sudão, Marrocos, Irã, Iêmen, Níger e Paquistão (Cartwright-Jones, 2006).



Figura 1 - Folhas da planta de Henna. (Fonte: Hema et al., 2010).

Popularmente conhecido como “Henna”, durante o século XIX na Europa, a Henna estava na moda entre mulheres associadas à estética, sendo amplamente utilizada para embelezar a pele, cabelos, unha, couro, seda e lã desde tempos antigos (HEMA et al., 2010). Henna é aplicada através de diferentes ferramentas, todas as quais colocam a pasta molhada em contato com o cabelo, as unhas, ou pele. Assim, o corante penetra e se liga à queratina (presentes em pele, unhas e cabelos), através de um processo de oxidação e conseqüentemente escurecimento. O princípio ativo desta pasta, a molécula lawsona continua nas camadas mais externas e mortas da pele, porém cerca de 1% consegue migrar para as camadas mais internas (células vivas) atingindo a circulação sanguínea, sendo eliminadas pela urina (KRAELING et al., 2007).

As plantas de Henna possuem um rico registro etnofarmacológico. Além de ser utilizada tradicionalmente para a beleza, durante o período pré-histórico no Egito, *L. inermis* foi descrita para tratamento para convulsão, icterícia e recomendado como remédio para úlceras malignas. Registros mostram sua utilização em

atividades analgésicas, hipoglicemiantes, hipertensas, Imunoestimulante, antiinflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, ações antivirais, anticancerígenas e hepatoprotetoras (SEMWAL et al, 2014).

Em sua composição fitoquímica, quase 100 constituintes foram identificados em todas as partes da espécie de *Lawsonia inermis*, incluindo compostos fenólicos, tais como: cumarinas, flavonóides e naftoquinonas. Esta abundância e diversidade de compostos biologicamente ativos implica ou justifica sua utilização milenar. Além disso, a presença desta “armadura química”. O semi-árido, ambiente do qual a planta se origina, possivelmente favoreceu mecanismos evolutivos para a produção de plantas metabólitos secundários de proteção, sendo estes cruciais em et ajudar a suportar uma série de ameaças às quais esta espécie foi exposta ao longo do tempo (HEMA et al., 2010).

2.2 LAWSONA

A Lawsona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Figura 2), apresentado como um pigmento colorido alaranjado, é o principal composto ativo encontrado no extrato das Folhas de henna (El-SHAER et al., 2007). Esta, especificadamente, exibe uma gama de bioatividades, como antibacterianas (aeróbicas e anaeróbicas), antifúngicas, antipalúdicas, antitumorais e antioxidantes (SEMWAL et al, 2014).

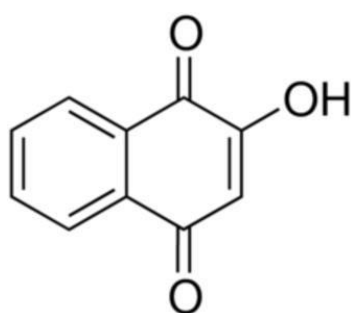


Figura 2 - Estrutura química da lawsona. (Fonte: Mahal et al, 2017)

Além disso, a lawsona é uma naftoquinona especial, que é útil em várias aplicações no campo científico e tecnológico (JORDAO et al., 2015). Recentemente, a síntese de novos derivados de Lawsona destaca grande interesse, sendo potencialmente utilizada como material de partida útil para a preparação de outras

quinonas com bioatividade comprovada ou concebível, como o lapachol (BORADE et al, 2001; PRADHAN et al, 2012), atuando em diversos ramos terapêuticos como agentes antipalúdicos, antibacterianos, antifúngicos e anticancerígenos (WANG et al., 2017; MAHAL et al, 2017).

A capacidade com a qual a naftoquinona e os seus derivados são submetidos a reações redox e a atividades quelantes, faz com que estes mecanismos sejam presumivelmente responsáveis pela maior parte de suas atividades (PRADHAN et al, 2012).

2.3 QUINONAS E SUA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

A classe das quinonas são representadas por uma variedade de metabólitos com ampla distribuição natural. São representadas por um grupo de substâncias orgânicas coloridas e semivoláteis e derivados de compostos aromáticos como benzeno, naftaleno e antraceno (BORADE et al, 2001). Estes compostos apresentam grande importância em processos bioquímicos vitais e por isso, vem ganhando destaque em estudos por apresentar diversas atividades, tais como: anti-câncer (SIRIPONG et al., 2006), tripanossomida, fungicida (DANANJAYA et al., 2017), moluscicida (SANTOS et al, 2000), leishmanicida (KAYSER et al, 2000), anti-malarial (SANTOS et al, 2004). Outro mecanismo de ação das quinonas, não baseado no transporte de elétrons, inclui a inibição da enzima topoisomerase (RAMOS-PÉREZ et al., 2014).

A estrutura das quinonas apresenta dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, situados em posições “orto” ou “para”. Estas, são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinoidal: as benzoquinonas apresentam um anel benzênico, as naftoquinonas possuem um anel naftalênico e as antraquinonas contêm um anel antracênico linear ou angular (Figura 3).

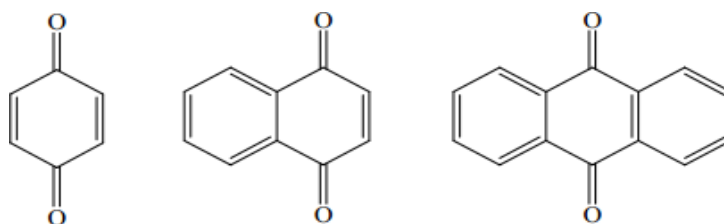


Figura 3 - A - Benzoquinona, B - naftoquinona e C – antraquinona

As quinonas, em suas propriedades, apresentam-se como moléculas neutras com dificuldade em sofrer a reação de protonação, contudo apresentam duas propriedades químicas, em particular, de grande importância: são oxidantes e eletrofílicas. Diante dessas características, apresentam interesses farmacológicos e toxicológicos interessantes, devido a sua participação em diversos processos bioquímicos, podendo ser tóxicos às células por diversos mecanismos, incluindo inibição do transporte de elétrons, ciclo redox (KURTYKA et al., 2016), bioalquilação, intercalação, indução de quebras nas fitas do DNA e geração de radicais livres (WANG et al., 2017; FERRAZ et al., 2001).

Dependendo do pH, ou seja, em ambientes que favoreçam a forma protonada do anel quinônico, as quinonas se tornam agentes oxidantes mais fortes do que a sua forma não protonada (Semiquinona), tornando-se um excelente ganhador de elétron. As semiquinonas formadas em pH fisiológico tendem a estar na forma ânion radical semiquinônico, pois estas não são básicas o suficiente para serem protonadas. Vale salientar que a forma semiquinona é potencialmente menos oxidante do que quinona original, devido ao recebimento de um elétron em sua estrutura, gerando uma repulsão de cargas dentro da molécula (Figura 4) (FERREIRA et al, 2008; FERREIRA et al, 2010).

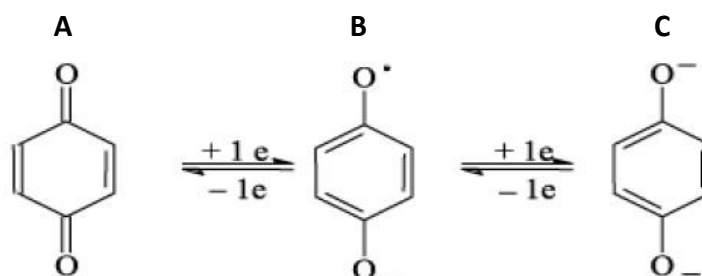


Figura 4 - A – Quinona; B - semiquinona; C – Hidroquinona. Formação de semiquinona pela redução da quinona em um elétron e da hidroquinona pela redução em dois elétrons. (Fonte: Figura adaptada de BUDZIAK et al, 2004)

2.4 NAFTOQUINONAS E SEUS MECANISMO DE AÇÃO

As naftoquinonas, por se tratar de uma quinona, exige tanto equivalentes redutores adequados como aceitadores de elétrons para oxidação do produto da reação que ocasionará na formação de ROS (KAPPUS e SIES, 1981). No caso de 1,4- naftoquinonas, a redução química desta molécula em células de mamíferos pode ocorrer a partir de NADH ou NADPH, como pode ser catalisada por várias

enzimas alternativas, como a citocromo P450 redutase, por exemplo (ROOSEBOOM et al, 2004). A figura 5 mostra resumidamente o mecanismo de ação das quinonas, o qual in vivo, devido a ação de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos sofrem biorredução de um elétron, catalisada pelas enzimas NADPH por exemplo, formando a espécie ânion radical semiquinona. Na presença de oxigênio molecular, este ânion transfere um elétron para o oxigênio que se transforma em radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual passará por uma reação de “dismutação” a O_2 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da enzima superóxido desmutase (SOD). Em paralelo, uma reação de Fenton catalisada por Fe^{+2} produz o radical hidroxila (ATIA et al, 2014). Esta complexidade de reações envolvidas no ciclo redox, faz com que as quinonas apresentem mecanismos de toxicidade ainda desconhecidos (KLOTZ et al, 2014).

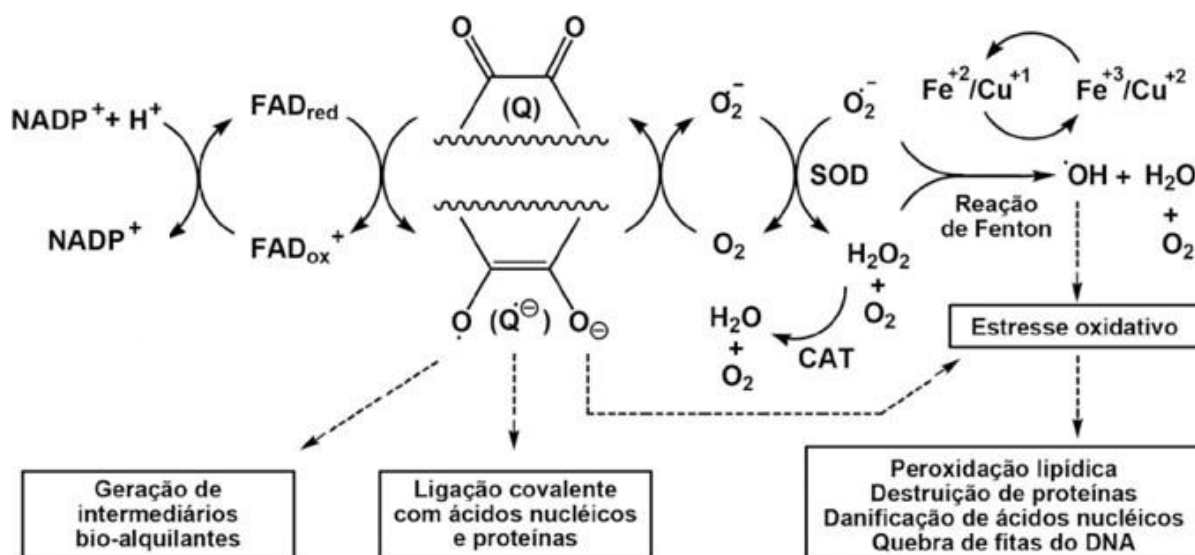


Figura 5 - Ciclo redox induzido por quinonas (Fonte: Figura adaptada de THOMSON, 1971).

Alternativamente, as 1,4-naftoquinonas podem sofrer uma redução de dois elétrons para a hidroquinona correspondente catalisada pela oxidoreductase-1 dependente de NADPH (NQO1) (ATIA et al, 2014). Embora contribuam para o metabolismo xenobiótico em que as hidroquinonas podem agora sofrer metabolismo de Fase II (acoplamento das porções de hidroxilo a moléculas solúveis em água para facilitar a eliminação), elas também podem ser instáveis e serem oxidadas pelo oxigênio para formar a semiquinona e o superóxido (THOR et al, 1982). Esta dupla funcionalidade da NQO-1 no metabolismo da quinona confere a esta enzima papéis atuantes como pro e antioxidante (NISHIYAMA et al, 2010). Como consequência

deste segundo ciclo redox, não apenas são formados ROS como também ocorre drenagem de equivalentes redutores como NADH e NADPH. De acordo com este modelo, a produção exacerbada de ROS juntamente com o esgotamento severo do poder de redução e consequentemente produção de energia, provocaria apoptose e/ou necrose celular. Diante disto, avaliando o poder antitumoral destes compostos, a seletividade contra células cancerosas provavelmente dependerá da sobreexpressão de NQO1 em relação ao tecido normal circundante. Porém, curiosamente, a b-lapachona por exemplo, ainda é altamente tóxica em células desprovidas da atividade NQO1, o que sugere a existência de outros fatores relacionados com sua citotoxicidade.

As naftoquinonas podem reagir com nucleófilos, tais como tióis ou aminas, e formar adutos através de uma chamada reação de adição de Michael (Figura 6). O mecanismo envolvido na oxidação e alquilação de numerosas biomoléculas parece ser o responsável pela maioria dos seus efeitos citotóxicos (KUMAGAI et al, 2014).

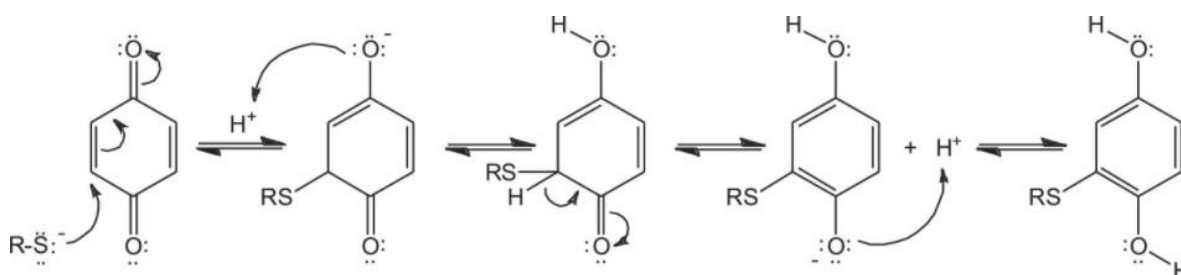


Figura 6 - Representação esquemática da reação de Adição Nucleofílica de Michael, no anel quinona, apresentando a formação da hidroquinona tio éter. (Fonte: KUMAGAI et al, 2014)

É importante ressaltar que, para que tal reação ocorra, o substituinte em C-2 deve permitir tanto o acesso quanto a eletrilicidade suficiente de C-3, sendo este o local de ataque de um nucleófilo em uma adição do tipo Michael (Figura 7).

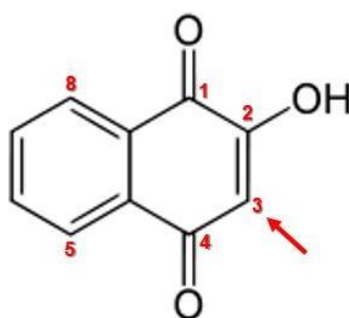
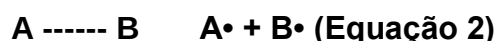
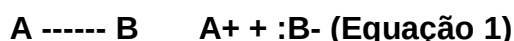


Figura 7: Estrutura da lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona). A seta mostra o carbono (C-3) responsável pela reação de Michael (Fonte: Figura adaptada de RAMOS-PÉREZ et al., 2014).

Devido a estes mecanismos, as quinonas em geral são associadas com a incidência de vários tipos de câncer. Por outro lado, é importante ressaltar que uma grande variedade de quinonas tem sido desenvolvida como droga anticâncer (VALDERRAMA et al, 2008; VALDERRAMA et al, 2009). Diante disto, em resumo, a partir da perspectiva da saúde humana, o balanço de efeitos quimiopreventivo e quimipromotivo de determinada quinona é altamente variável, dependendo fundamentalmente de sua estrutura química, dosagem, modo de exposição e organismo afetado, ressaltando que as quinonas, in vivo, são frequentemente tóxicas, apresentando efeitos citotóxicos e Genotóxicos. (ZHANG et al, 2009).

2.5 RADICAIS LIVRES

Os radicais livres são moléculas altamente reativas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, os quais interferem em reações normais do organismo, causando alterações. Esta configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curta e quimicamente muito reativos (FERREIRA E MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 2006). Os elétrons estão associados em pares, no qual cada um se movimenta em torno do núcleo. As ligações químicas podem ser quebradas de duas maneiras: os dois elétrons podem ficar presos a um dos fragmentos, processo denominado de heterólise - quebra assimétrica de ligação covalente (Equação 1) na qual os dois fragmentos têm cargas diferentes e opostas e são chamados íons. Neste caso, uma das moléculas envolvidas torna-se um cátion, desprovida de seu elétron, enquanto que a outra molécula que ganhou esse elétron torna-se um ânion. Na outra forma, com a quebra da ligação os dois elétrons são divididos de forma simétrica formando espécies radicalares, cujo processo é denominado de homólise (Equação 2) (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).



2.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

As espécies reativas de oxigênio consistem em compostos químicos resultantes da ativação ou derivados dos produtos da redução do oxigênio molecular (O_2). São moléculas instáveis e extremamente reativas, geradas por todos os organismos vivos aeróbios, que o utilizam para a produção de energia, fazendo parte do seu perfil metabólico normal. Esses metabólitos podem ser produzidos em diversos locais dentro da célula, sendo as mitocôndrias o principal sítio de produção (MIGDAL e SERRES, 2011). As reações que geram ATP na mitocôndria requerem elétrons de substratos reduzidos para serem passados ao longo da cadeia de transporte de elétrons que reagem com o oxigênio molecular (O_2) gerando o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Esse radical é um mediador importante em inúmeras reações oxidativas em cadeia, sendo também precursor para geração de outras EROs, tanto radicalares, como o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), como não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL, 2006). Apesar de não ser um radical livre, o H_2O_2 atua como subproduto intermediário na formação de radicais reativos, com metais de transição, através da via oxidativa. Este, por poder atravessar facilmente as membranas celulares, pode por sua vez reagir com íons de ferro e cobre gerando a espécie radicalar hidroxil ($OH^{\bullet}$), sendo esta uma molécula altamente nociva em sistemas vivos devido a sua elevada reatividade (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990).

Essas espécies são reconhecidas por desempenhar um papel paradoxal, porque podem ter efeito tanto benéfico quanto prejudicial aos seres vivos. Em baixas concentrações, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) estimulam a proliferação e a sobrevivência celular durante a invasão de patógenos (VALKO et al., 2006). Em níveis moderados, esses EROs são úteis na defesa imunológica contra patógenos e na sinalização celular em diversos sistemas (VALKO et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013). O efeito nocivo dos EROs pode ser observado após o restabelecimento dos níveis normais de oxigênio de um tecido que sofre isquemia, provocando danos biológicos a esses tecidos pela indução de estresse oxidativo (VALKO et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013).

Este processo tem implicações relevantes em processos de envelhecimento e na patofisiologia de várias doenças humanas como aterosclerose, diabetes, insuficiência renal crônica, transtornos neurodegenerativos e câncer (GREEN et al.,

2004). Normalmente, os organismos conseguem manter a equilíbrio entre a quantidade de EROs produzidas e os sistemas de defesas antioxidantes. Porém, por diversos motivos, as células podem ocasionar uma produção excessiva destas espécies, nos quais os mecanismos de defesas existentes são incapazes de contornar os efeitos nocivos destas espécies (HERMES-LIMA, 2005; KALYANARAMAN, 2013). Neste contexto, devido a sua elevada reatividade, o acúmulo de EROs na célula pode afetar a estrutura celular e a integridade funcional, ao provocar a degradação oxidativa de moléculas críticas, tais como DNA, proteínas e lipídios. Com isso, as funções das membranas celulares podem ser comprometidas, ocasionando a morte celular (AVERY, 2011).

2.7 DEFESAS ANTIOXIDANTES

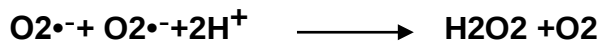
Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que possuem a capacidade de atrasar ou inibir a oxidação de substratos que são alvo de agentes oxidantes tais como os EROs (VALKO et al., 2007). Os mecanismos de defesa antioxidantes podem ser enzimáticos ou não-enzimáticas, podem ser produzidos pelas células ou estar presentes no ambiente (MASELLA et al., 2005). Em *S. cerevisiae*, um grupo de enzimas atuam especificamente contra as EROs em diferentes compartimentos celulares e contribuem positivamente para o equilíbrio redox celular (HERRERO, 2008). Dentre os antioxidantes enzimáticos encontram-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutational-peroxidase (GPx), glutational s-transferase (GST), e tiorredoxinas peroxidases (TPx). Enquanto que os antioxidantes de origem não enzimáticas são representados por: ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), glutational (GSH), carotenoides, flavonoides e outros (VALKO et al., 2007)

2.8 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

2.8.1 Superóxido dismutase

A Superóxido dismutase (SOD) tem como principal função atuar na dismutação de radicais superóxidos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, com sua atividade dependente de ions metálicos (CULOTA et al, 2006). (Equação 3), sendo o

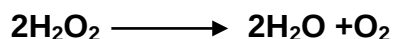
H₂O₂ menos reativo por não ser um radical, podendo ser metabolizado por outras enzimas. Contudo, este pode facilmente reagir, formando o radical hidroxil.



Em *Saccharomyces cerevisiae* a enzima SOD está presente sob duas formas nas células (CULOTA et al, 2006), ambas desempenhando papel importante na desintoxicação de ânions superóxidos gerados (HAN et al, 2001). A Isoforma dependente de cobre e zinco (CuZn-SOD) está localizada no citoplasma (Sod1p) e a isoforma dependente do manganês (Mn-SOD) está presente normalmente na matriz mitocondrial (Sod2p).

2.8.2 Catalase

De maneira geral, a função das catalases é promover a dismutação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, a qual utiliza as propriedades redox do seu grupo heme para entrar em contato com o seu substrato (Equação 4).



Em *S. cerevisiae* existem duas catalases: Cta1p presente nos peroxissomos e Ctt1p presente no citosol. Mutantes para cada um de seus genes correspondentes não são sensíveis ao peróxido de hidrogênio na presença de oxigênio. Já o duplo mutante apresenta sensibilidade a este composto, indicando efeito sinérgico destas enzimas na levedura (HILTUNEN et al, 2003).

2.8.3 Peroxidases

Neste grupo de enzimas existem dois representantes básicos: glutathione peroxidases (GPXs) e as peroxidases TRX, também conhecidas como peroxirredoxinas. A glutathione peroxidase (GPXs) é considerada a principal enzima na reparação da peroxidação lipídica da membrana, que é uma das principais consequências do estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE,

2007). Nesta classe existem dois tipos: as clássicas multiméricas, as quais apresentam características solúveis e agem sobre hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos; as monoméricas, hidroperóxidos fosfolipídeos (PHGPXs), que se encontram normalmente associados a membrana associadas à membrana. Atuam sobre hidroperóxidos solúveis e podem, também, exercer a sua função sobre hidroperóxidos lipídicos de membranas (BRIHELIUS-FLOHE et al, 2006). Estudos iniciais em *S. cerevisiae* descreveram três tipos de GPXS chamadas de Gpx1p, Gpx2p e Gpx3p (INOUE et al, 1999). Entre estas, a Gpx3 é bastante importante, pois estudos in vitro mostraram a sua atuação como principal transdutor de sinal na presença do peróxido de hidrogênio, através do fator de transcrição Yap1, que é o principal regulador dos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (AZEVEDO et al, 2003), além das duas catalases (Ctt1 e Cta1) e cinco peroxiredoxinas (Tsa1, Tsa2, Ahp1, Dot5 e Prx1) (HATEM et al, 2014). Para regulação desta complexa resposta, em *S. cerevisiae* a detecção do estresse oxidativo promove o acúmulo nuclear de fatores de transcrição específicos na resposta ao estresse, sendo Yap1p o principal deles (LEE et al., 1999), que vai regular a expressão desses genes. Existem outros fatores que são ativados em repostas variadas ao estresse, como o Msn2 e Msn4 (BOISNARD et al., 2009).

2.8.4 Antioxidantes não-enzimáticos

Além da proteção enzimática, existem moléculas de baixo peso molecular que atuam também nessa atividade, tais como glutathiona na forma reduzida (GSH), ácido ascórbico, vitamina E e N-acetilcisteína (NAC) (EVANS e HALLIWELL, 2001). Esses antioxidantes têm a capacidade de “neutralizar” os radicais livres por meio de seu potencial redutor, doando um elétron ou um hidrogênio à espécie reativa (FREI e HIGDON, 2003). A administração de um antioxidante exógeno como o ascorbato, por exemplo, é capaz de restaurar o crescimento de mutantes SOD submetidos a estresse oxidativo (KRZEPILKO et al, 2004).

Glutathiona, o tripeptídeo L-γ-glutamil-L-cistinilglicina, na sua forma reduzida (GSH) apresenta um grupo sulfidril com ação redox, o qual reage com oxidantes para a produção da glutathiona oxidada (GSSG). Com isso, a razão molar GSSG/GSH dentro da célula é considerado como um importante sinalizador do estado de estresse oxidativo, mostrando a importância da GSH na manutenção do sistema

redox da célula como um sequestrante das EROs (DRAKULIC et al., 2005). A concentração fisiológica da GSH nas células de *S. cerevisiae* gira no intervalo entre 1-10 mM (DRAKULIC et al, 2005), aumentando para >40 mM para proteção das funções citosólicas e nucleares durante estresse oxidativo (HATEM et al., 2004). Já na concentração muito reduzida na faixa de 0,1 mM os mecanismos citosólicos são bastante afetados enquanto a proteção nuclear ao dano oxidativo é mantida. Isso mostra que a função primária da GSH é a proteção dos componentes nucleares a danos causados por estresse oxidativo. Quando a concentração de GSH é baixíssima (>0,03 mM), todas as funções celulares são danificadas, gerando mortalidade celular (HATEM et al, 2014).

Um outro composto com propriedades redox é a N-acetilcisteína (NAC). Dentro da célula, está é convertida em cisteína por desacetilação e o aminoácido pode participar de reações de transferência de elétrons (HENNICKE et al, 2013). A cisteína também é fornecida para formação de GSH esgotada por estresse oxidativo, contribuindo assim para reduzir as espécies reativas de oxigênio (SJODIN et al, 1989; RAFTOS et al, 2007) (Figura 8).

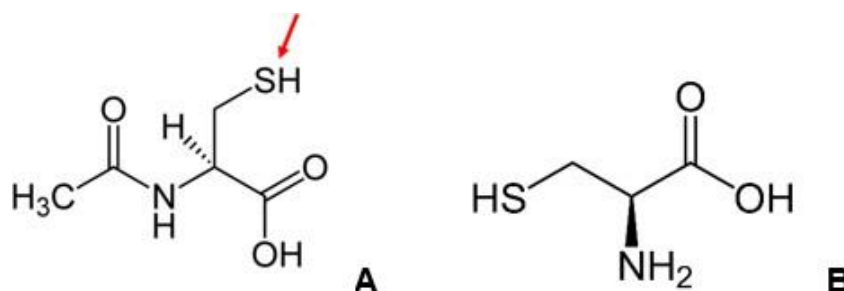


Figura 8 - A - Estrutura química do antioxidante N-acetilcisteína (NAC), sendo ilustrado através da seta vermelha a presença do grupamento sulfidríla, que atua como nucleófilo através da reação de Michael; B.– Estrutura química do aminoácido cisteína. (Fonte: Figura adaptada de HENNICKE et al. 2013).

2.9 O FATOR DE TRANSCRIÇÃO YAP1 E O MECANISMO DE RESPOSTA A ESTRESSE OXIDATIVO

Em leveduras, por exemplo, a detecção do estresse oxidativo se dá através da oxidação de algumas proteínas, sendo uma delas a Gpx3 (glutathione peroxidase), as quais atuam na ativação de vias antioxidantes importantes no controle e modulação de diversos genes através de fatores de transcrição (TEMPLE et al. 2005). Em *S. cerevisiae*, aproximadamente 15% do genoma codificante responde a

presença de agente oxidantes de modo geral e suas proteínas são classificadas em diferentes vias de resposta esses agentes. Essas vias são reguladas por um conjunto de fatores de transcrição relacionados a diferentes tipos de estresse, como: Msn2/Msn4p (em resposta geral ao estresse); Yap1p (agentes oxidantes); Skn7p (estresses relacionados ao choque térmico e oxidativo) e Cad1p (estresse relacionados com a estabilização de proteínas) (TEMPLE et al., 2005). A proteína Yap1 é um fator de transcrição do tipo bZip (basic domain/leucine zíper) que atua na ativação da transcrição de um grupo de genes que captam o estado redox intracelular não balanceado causados por espécies reativas de oxigênio e por grupamentos tióis oxidados (KUGE et al, 1997). Esta proteína é normalmente citoplasmática e transportada para o núcleo sob estresse oxidativo. Na presença de peróxido de hidrogênio por exemplo, a proteína Gpx3 é o receptor de peróxido, sofrendo oxidação da cisteína diretamente oxidada a ácido sulfênico. Esta oxidação favorece uma ligação dissulfeto intramolecular temporária entre a proteína Gpx3 e o fator de transcrição Yap1, promovendo oxidação das sulfidrilas dos resíduos de cisteína para formação de pontes dissulfetos. Isto promove uma mudança conformacional em Yap1, causando o transporte da proteína oxidada para o núcleo via proteína transportadora Crm1p (DELAUNAY et al., 2002). O acúmulo deste fator no núcleo é responsável pela regulação positiva de diversos genes referentes a defesas antioxidantes (SOD1, CTT1, TRX2), sendo esta a via, a mais importante em defesa a ação de peróxidos orgânicos em geral (TACHIBANA et al., 2009; IWAH et al., 2010).

3.10 VANTAGENS DO USO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* COMO MODELO EXPERIMENTAL

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* trata-se de um organismo unicelular de fácil cultivo e manipulação gênica. Foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma totalmente sequenciado (GOFFEAU et al., 1996), permitindo que pesquisadores analisassem sistematicamente e registrassem a função de cada gene.

Desta forma, a deleção de determinado gene reflete um fenótipo mutante com perda completa de determinada função (GIAEVER et al., 2002). Tal riqueza de informações contribuiu para o desenvolvimento de técnicas para avaliação de toxicogenicidade funcional, ou química, que é definida como o estudo de funções

biológicas dos genes em relação aos agentes estressores ambientais tóxicos (HAMADEH et al., 2002; NORTH e VULPE, 2010). A existência de coleções de linhagens mutantes haploides ou diploides, tanto heterozigotos como homozigotos, permite o estudo da função de cada uma de suas proteínas na resposta biológica àquele agente estressor (SCHERENS e GOFFEAU, 2004).

De acordo com BRACONI et al. (2015) uma série de características tornam viável a sua utilização como modelo experimental ideal para a realização de estudos toxicológicos funcionais, tais como:

1. A falta de patogenicidade e a relativa simplicidade de ser unicelular;
2. Rápido crescimento (sob condições laboratoriais ideais e controladas);
3. Facilidade de manipulação genética;
4. Possibilidade de armazenamento;
5. Resistência e força a uma gama de pH;
6. Conhecimento amplo de repertórios de diversas teorias, devido as diversas informações disponíveis para seus genes;
7. Elevado grau de conservação funcional;
8. Disponibilidade de uma vasta gama de ferramentas experimentais (Protocolos, software e bases de dados);
9. Possibilidade de reduzir os ensaios em animais,

Todas estas características tornam a levedura um modelo experimental atraente para testar os efeitos tóxicos de determinadas substâncias, incluindo aqueles que induzem efeitos de perturbação endócrina (KOLLE et al., 2011). A sua utilização foi fortemente sugerida, por exemplo, para a busca preliminar de toxicidade de amostras ambientais em locais que apresentasse elevada suspeita de contaminação por pesticida, sendo este rastreio prévio de extrema importância para tomada de decisões na biomonitorização (GIL et al, 2015). Contudo, vale salientar a existência de alguns problemas relacionados a utilização de levedura como modelo experimental, podendo ser destacado, por exemplo (GAYTAN et al, 2013):

1. Necessidade de elevadas concentrações elevadas de substâncias tóxicas para promoção da toxicidade, devido à presença de parede celular e resistência a multidroga;

2. Existência de diferenças nas vias metabólicas, não permitindo, nem sempre, uma comparação direta com as vias envolvidas nos seres humanos;
3. Impossibilidade de identificar órgãos-alvo ou avaliar o mecanismo de atuação através presença de efeitos sistêmicos adversos.

3.11 A ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae*

De acordo com a classificação taxonômica, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* está incluída no Domínio Eukaryota; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe24 Saccharomycetes; Ordem Saccharomycetales; Família Saccharomycetaceae e Gênero *Saccharomyces* (KURTZMAN, 1997, VAUGHAN-MARTINI e MARTINI, 2011). Este gênero apresenta estados haploides e diploides, permitindo a deleção de genes não essenciais (estado haploide), propiciando a análise dos fenótipos de mutantes e estudos de complementariedade. Este fungo se reproduz assexuadamente por brotamento (BOULTON e QUAIN, 2001) ou sexuadamente por esporulação (meiose) e cruzamento com formação de diploides. O tamanho das células varia de acordo com o seu crescimento, com células diploides com dimensões médias de 5x6 µm (elipsoide) e as haploides com aproximadamente 4 µm de diâmetro (esferoides) (MARTIN e ARKOWITZ, 2014).

Esta levedura é um anaeróbio facultativo que apresenta metabolismo respiratório fermentativo na presença de oxigênio (MADIGAN et al., 2016). Em substrato contendo altas concentrações de glicose, por exemplo, as células reduzem a atividade de várias proteínas dispensáveis para o metabolismo respiratório (oxidativo) por modificação/degradação e/ou reprimem a expressão de seus genes, numa resposta metabólica chamada de Repressão Catabólica pela Glicose (Glucose Catabolite Repression – GCR) (GOMBERT, 2001). Este mecanismo de inativação por glicose pode ocorrer rapidamente pela hidrólise de enzimas envolvidas na gliconeogênese, no ciclo do glicoxilato, no transporte de açúcares em geral. Ocorre ainda, a inativação da expressão gênica de várias proteínas envolvidas na utilização de outras fontes de carbono, proteínas da mitocôndria envolvidas na cadeia respiratória, além de causar regressão mitocondrial e dos peroxissomos (GURVITZ e ROTTENSTEINER, 2006). Como dito antes, isto diminui a capacidade respiratória enquanto ativa o metabolismo fermentativo mesmo na presença de oxigênio, caracterizando o chamado efeito Crabtree positivo (GOMBERT, 2001). Com isso, sob condições-padrão de cultivo estas células apresentam o tal metabolismo respiro-

fermentativo. Com isso, o fluxo pela via glicolítica é aumentado com consequente aumento na produção de ATP ao nível do substrato, com diminuição da necessidade da fosforilação oxidativa e do consumo de oxigênio (FELDMANN, 2012).

Devido a sua eficiente capacidade fermentativa, *S. cerevisiae* é utilizada na indústria de panificação, na produção industrial de cervejas, vinhos, aguardentes e outras bebidas fermentadas e na produção de etanol a partir de caldo de cana ou melaço (MADIGAN et al., 2016).

O metabolismo respiratório estrito só é observado quando as células são cultivadas em condições de limitação severa de hexose (<5 mM no meio) ou quando o meio contém fontes de carbono que não são açúcares, tais como glicerol ou etanol (AUSUBEL et al., 2003). No entanto, este aumento no metabolismo respiratório vem acompanhando pela produção de EROs e indução do mecanismo de resposta a estresse oxidativo. Com isso, células cultivadas sob metabolismo respiratório são mais tolerantes à presença de agentes oxidantes externos.

3.12 PAREDE CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*

A parede celular é um componente celular que oferece proteção física e estabilidade osmótica, oferecendo sustentação e proteção mecânica à célula sem interferir na permeabilidade seletiva e transporte de determinadas macromoléculas pela membrana celular para o citoplasma (SMITH et al., 2000). Representa 15 a 30% do peso seco celular, sendo composta majoritariamente por polissacarídeos (85%) e minoritariamente por proteínas (15%), as chamadas proteínas da parede celular (Cell Wall Proteins - CWP). Estudos realizados sobre a composição da parede de células de *S. cerevisiae* revelaram a presença de glucana, um polímero de β -1,3 e β -1,6 glicose (48-60%), mananaproteínas (20-23%) e quitina (0,6-2,7%) (KLIS, 1994). Este componente é formado por duas camadas principais: uma externa, composta pelas mananaproteínas e uma interna, constituída das glucanas (KLIS, 1994). A quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina (Figura 9), é um constituinte presente em pequena proporção importante para a formação do septo-primário e do círculo de constrição entre a célula-mãe e o broto, sendo fator primordial no momento da divisão celular. Cerca de 90% da quitina está localizada na cicatriz de brotamento e o restante, constituída na parede celular (SHAWN et al., 1991).

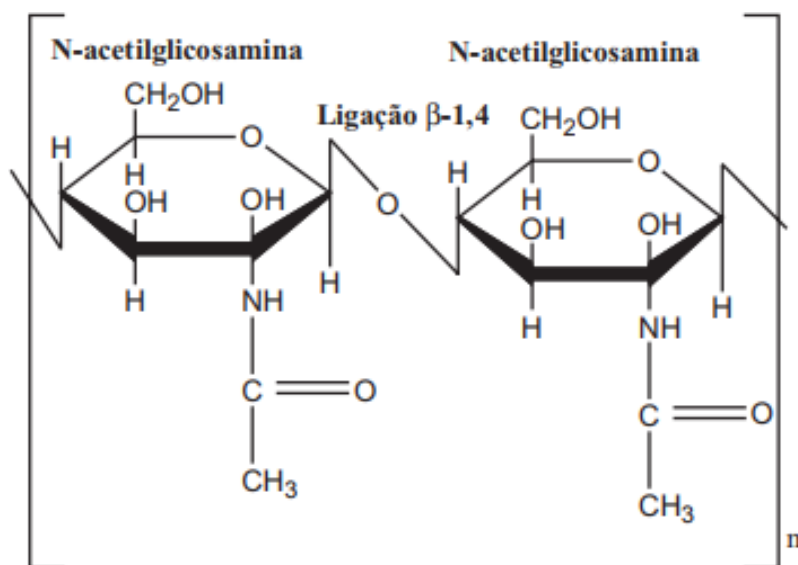


Figura 9 - Polímero de quitina. (Fonte: Figura adaptada de Fleuri e Hélia, 2005).

A camada de β -glucano é constituída por um esqueleto linear central de unidades de glicose ligadas na posição $\beta(1-3)$ (Figura 10), com cadeias laterais de tamanhos variados, também de glicose porém, unidas em $\beta(1-6)$. As cadeias laterais podem ocorrer em diferentes intervalos ao longo do esqueleto central.

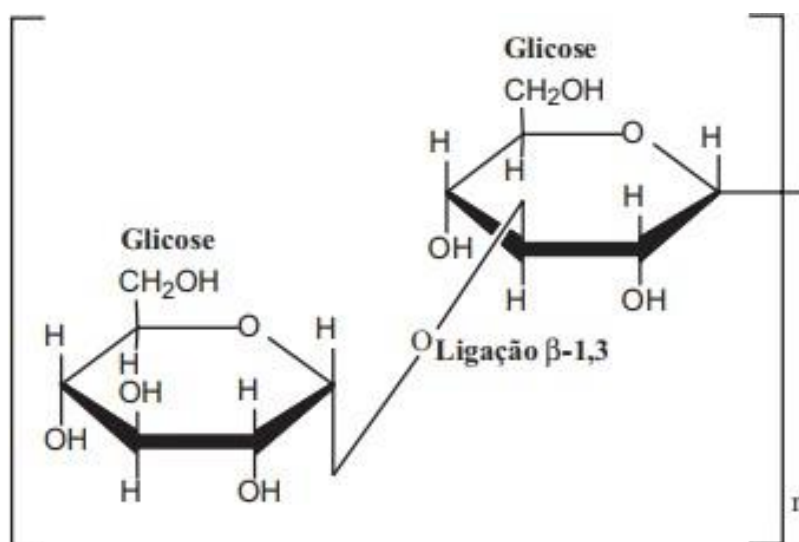


Figura 10: Polímero de glucano. (Fonte: Figura adaptada de FLEURI e HÉLIA, 2005).

A porção de glucanos consiste de cadeias β -(1,3) e β -(1,6). Os β -1,3-glucanos formam um esqueleto linear central de unidades de glicose, sendo esta uma estrutura altamente ramificada, com cadeias laterais de tamanhos variados, também de glicose porém, unidas em β (1-6). As ligações β -1,6-glucanos encontram-se principalmente fora da estrutura de sustentação e frequentemente estão ligados por proteínas da parede celular. Estudos realizados por CABIB et al (1997) sugeriram a existência de ligações cruzadas entre polissacarídeos e mananaproteínas, e que a β -1,3 glucana e quitina estão conectadas por uma ligação β -1,4 entre um grupo redutor final de N- acetilglicosamina da quitina e um grupo não redutor da glicose da glucana. Há evidências que as mananaproteínas estão presas a parede celular por ligações indiretas com as β -1,3 glucanas, sendo estas ligadas preferencialmente a cadeias curtas de β - 1,6 glucanas através de um conector de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (LESAGE e BUSSEY, 2006) (Figura 11).

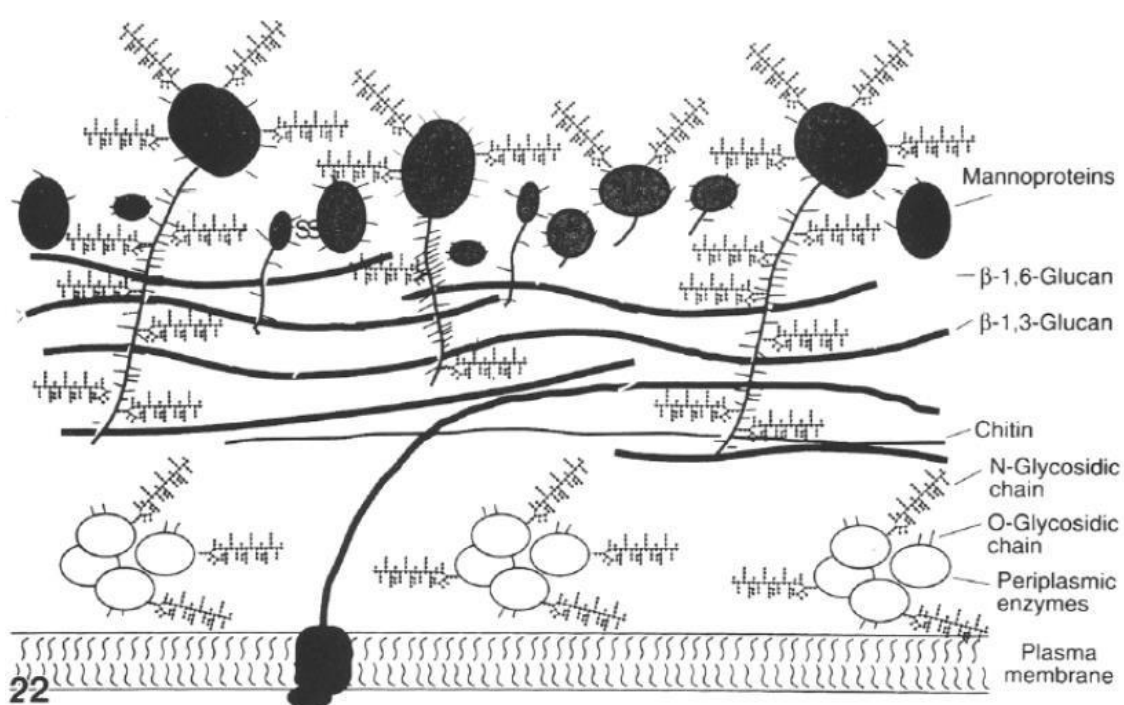


Figura 11 - Figura esquemática apresentando a composição e estrutura da parede celular da *Saccharomyces cerevisiae*. (Fonte: OSUMI, 1998).

Diante disto, de maneira geral, a camada de mananaproteínas, localizada na superfície externa da parede celular da levedura, tem função de proteger a célula contra fatores externos e é responsável pela porosidade da parede celular. Esta camada retém as proteínas periplasmáticas, conferindo resistência às células vivas

de leveduras, limitando o acesso de enzimas externas, como aquelas elaboradas por outros microrganismos (ZIOTNIK et al., 1984). Em contrapartida, a camada de glucana entrelaçada por fibrilas de quitina, adjacente a membrana plasmática, mantém a rigidez e a forma da célula, sendo responsável pela estruturação da parede celular perante choques mecânicos e desequilíbrios osmóticos (KAPTEYN et al., 1997).

Existem basicamente duas classes de proteínas de parede celular, ligadas covalentemente. As mananoproteínas que podem estar ligadas a cadeia β -1,6-glicose através de um conector glicosilfosfatidilinositol (GPI), ou por meio de uma ligação β -1,3- glucano sensível a álcali (LESAGE e BUSSEY, 2006). A segunda classe de proteínas da parede celular, são as chamadas Proteínas com repetições internas (PIR), as quais estão ligadas diretamente a capa de β -1,3-glucanos (LEVIN, 2005) (Figura 12).

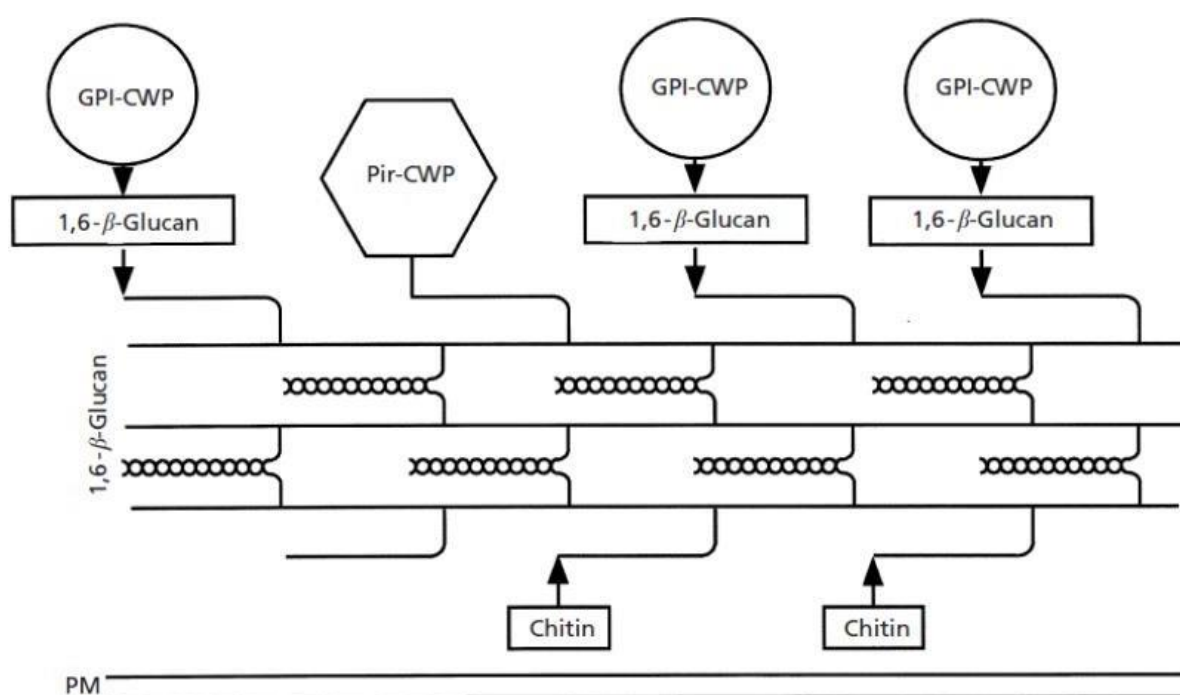


Figura 12 - Apresentação ilustrativa da parede celular de leveduras. O esqueleto interno consiste em moléculas com ligações β -1,3-glucanos que delimitam a estrutura celular formando uma rede tridimensional. A parte externa da parede possui proteínas ligadas às moléculas β -1,3-glucanos (Pir-CWPs), ou indiretamente ligadas através de uma interconexão entre β -1,6-glucanos e GPI ligadas a CWPs (Fonte: SMTIS et al., 2001).

A parede celular das leveduras apresenta-se como uma estrutura multifuncional, cujas principais funções são:

- Conservação das condições osmóticas internas da célula, impedindo a entrada de água na célula, visto que a osmolaridade no citoplasma é maior quando comparado ao meio extracelular;
- Proteção contra estresse físico. Isso acontece devido à combinação sinérgica existente devido a força mecânica e grande elasticidade, permitindo a distribuição pela parede contra danos mecânicos;
- A parede atua de suporte para proteínas (glicoproteínas), sendo a presença destas associadas a cadeias laterais e carboidratos, conferem uma barreira seletiva a parede, ajudando a reter água, impedindo entrada e saída de macromoléculas indesejáveis, criando um microambiente entre a parede e membrana plasmática.

A arquitetura da parede celular das leveduras, em especial de *S. cerevisiae*, não é fixa, apresentando-se como uma estrutura dinâmica e ajustável, em respostas as condições ambientais, no decorrer do ciclo celular (SUZUKI et al., 2004). Constantes alterações na sua plasticidade e força de tensão permitem o crescimento e divisãocelular. De acordo com REES et al (1982), a elasticidade pode ser atribuída a presença das cadeias de β -1,3-glucana organizadas em uma espécie de “mola” flexível de extensão variada. Além disso, respondem a modificações nas condições ambientais como nutrientes, disponibilidade de oxigênio, temperatura e pH, devido a capacidade de apresentarem mecanismos de reparo, através da formação de complexos específicos entre proteínas e polissacarídeos, que reorganizam toda a estrutura molecular no intuito de preservar sua integridade (LESAGE e BUSSEY, 2004).

A capa externa proteica da parede celular contém mais de 20 tipos de mananaproteínas que desempenham papéis diferentes na construção, preservação, modificação da estrutura e interação das células com suas adjacências, fazendo com que as leveduras apresentem a capacidade de se adaptarem a uma ampla variedade de ambientes. Estas proteínas de parede permitem que as células consigam flocular, formar biofilmes, crescer como pseudo-hifas ou em forma invasiva ajudam a reter ferro, facilitam a entrada de esteróis e são necessárias para crescer em condições anaeróbicas (MRSA te al,1999). Quando as culturas atingem a fase estacionária, as células apresentam um incremento nos constituintes da parede devido a mudanças que ocorrem na estrutura das mananaproteínas. Isto torna as

células mecanicamente mais resistentes e também restringem o acesso de enzima hidrolíticas como glucanases e zimoliasas (KLIS, 2006). A composição e a estrutura da parede celular também é responsável pela tolerância das células a presença de muitas substâncias presentes no ambiente. Portanto, qualquer iniciativa de se utilizar esta levedura como modelo biológico para estudos toxicológicos deve levar em consideração a interação desses compostos com a parede celular como eventual primeira barreira protetora da célula.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUBSTÂNCIAS

A molécula 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (C₁₀H₆O₃), denominado de Lawsona, foi obtido a partir extrato das folhas da *Lawsonia inermis* e cedido pelo Prof. Alexandre Goes, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, colaborador deste trabalho. A pureza e integridade da preparação foi testada por cromatografia em camada delgada. A solução de Lawsona foi preparada por solubilização em solução hidroalcolica (70% v/v) e conservada em geladeira à 4°C protegida da luz. O agente antioxidante N-acetilcisteína (NAC) foi adquirido de preparação comercial, solubilizado em água deionizada, esterilizado por filtração e conservado em geladeira.

3.2 LINHAGENS E MEIOS DE CULTIVOS

A linhagem haploide de referência utilizada neste trabalho foi BY4741 (RAMOS-PÉREZ et al. 2014). A linhagem haploide mutante para o gene YAP1 (yap1Δ) de BY4741 foram adquiridas da empresa Invitrogen. As células foram mantidas em meio sólido YPD-ágar (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona bacteriológica e 20 g/L de ágar), acrescido do antibiótico aminoglicosídico Geneticina a 200 µg/mL, para a linhagem mutante. As culturas foram mantidas frescas por repiques constantes. Os cultivos celulares foram realizados em meio mineral sintético contendo YNB (1,7 g/L), glicose (20 g/L), sulfato de amônia (5 g/L), leucina (0,38 g/L) e metionina, histidina e uracil (todos na concentração de 0,076 g/L). O meio sintético foi inoculado com uma colônia da linhagem a ser testada e as células cultivadas a 30°C por 24 h sob agitação constante, representando o pré-inóculo. Para os ensaios, as células do pré-inóculo foram inoculadas em meio fresco para o valor inicial de densidade óptica de 0,1 à 600 nm (DO_{inicial}) e as substâncias adicionadas em seguida para as concentrações em estudo. As células foram cultivadas a 30°C sob agitação constante e amostras foram coletadas em tempos definidos para determinação do valor de Densidade óptica (DO). Todos os ensaios foram realizados em duplicata biológica e triplicata técnica.

3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DA LAWSONA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) da lawsona foi definida neste trabalho como a concentração que impediu o crescimento celular da linhagem de referência (CANSIAN et al, 2009). Para isto, os cultivos foram realizados em meio mineral, em frascos de 50 mL contendo 30 mL de meio, mantidos sob agitação constante à 160 rpm em incubadora orbital tipo shaker durante 24 horas a 30°C, com Densidade Óptica inicial (DO_{inicial}) de 0,1. As concentrações de lawsona testadas no experimento foram de: 10 mg/L; 20 mg/L; 30 mg/L; 40 mg/L; 50 mg/L; 60 mg/L; 70 mg/L; 80 mg/L; 90 mg/L e 100 mg/L, correspondentes à 57 mM; 115 mM; 172 mM; 229 mM; 287 mM; 345 mM; 402 mM; 459 mM; 517 mM; 574 mM, respectivamente. O meio contendo apenas a levedura BY 4741 foi utilizado como referência para o padrão de crescimento. Para a construção da curva, amostras foram tomadas em intervalos de 1h e lidas em espectrofotômetro através da DO, com comprimento de onda pré-selecionado em 600 nm. Um gráfico exponencial foi construído com a média aritmética de duplicatas biológicas e triplicatas técnicas.

3.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise da pureza e integridade da Lawsona nas soluções utilizadas foi realizada pelo método cromatográfico simples baseado na técnica de adsorção sólido-líquido pelo Prof. Alexandre Goes, do Departamento de Antibióticos da UFPE de acordo com o protocolo a seguir. Para preparação da placa utilizou-se sílica-gel como fase estacionária (sólido), de acordo com o descrito na metodologia de DEGANI et al (1998) e as amostras foram aplicadas com a ajuda de um capilar na base em aproximadamente 1 cm da base inferior. As amostras utilizadas foram todas suspensas em solução hidroalcoólica a 70% (v/v), identificadas a seguir como: 1) Solução estoque de Lawsona preparada para uso armazenada a 4 meses; 2) Solução estoque preparada para uso armazenada a 1 mês; e para o padrão utilizou-se o produto da Lawsona em pó. Toda a lawsona utilizada durante o estudo foi obtida do mesmo processo extrativo. O método para revelação da placa deu-se através de câmaras de luz ultravioleta e a leitura nas diferentes velocidades de migração das amostras testadas de acordo com a substância padrão.

3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Testes de viabilidade celular foram conduzidos para avaliar o efeito tóxico da lawsona sobre as células de levedura. Para isto, células do pré-inóculo foram usadas para inocular meio sintético, sobre concentrações máximas de lawsona a 574 mM, para $DO_{\text{inicial}} = 0,1$ e cultivadas por 24h a 30°C sob agitação constante. Cultivos sem lawsona foram usadas como controle. Depois desse tempo, as células foram coletadas por centrifugação, lavadas com solução salina estéril (0,85% m/v) e ressuspensas em meio sintético novamente para $DO_{\text{inicial}} = 0,1$. Após 24h de cultivo a densidade óptica das culturas foi medida e a viabilidade das culturas determinado pela fórmula: $\Delta DO = DO_{\text{final}} - DO_{\text{inicial}}$ para os cultivos com e sem lawsona.

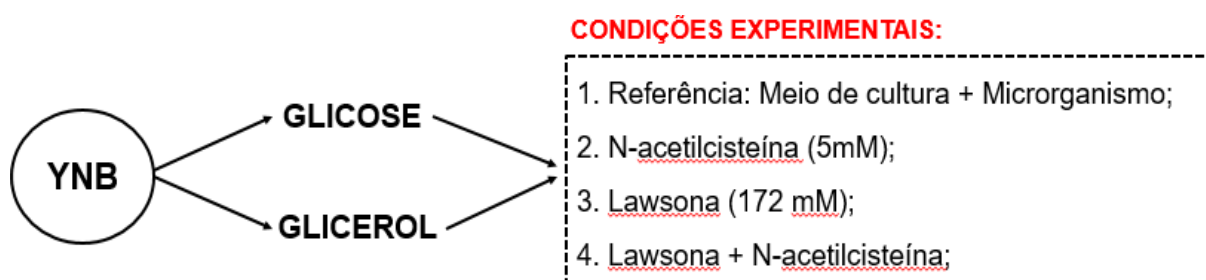
3.6 EFEITO DA LAWSONA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO

Ensaio de crescimento da linhagem parental BY4741 foram realizados em meio sintético YNB e em meio rico YPD na presença tóxica de lawsona a 574 mM. O meio sintético e o meio rico foram alterados, para avaliar a atuação dos componentes, sob efeito da mesma concentração (574 mM). O meio sintético foi alterado das seguintes maneiras: 1) substituição do componente YNB pelo extrato de levedura do meio rico; 2) substituição do sulfato de amônia pela peptona do meio rico. Os cultivos foram, em seus respectivos meios preparados acima citados, foram mantidas sob agitação constante de 160 rpm em incubadora orbital tipo Shaker por aproximadamente 18 horas a 30°C, com ajuste na concentração de células na $DO_{\text{inicial}} = 0,1$. Para construção da curva, alíquotas foram retiradas para leitura em espectrofotômetro (600nm) com intervalos de 2h durante 24h. A condição contendo apenas o meio de cultura junto ao inóculo foi utilizado como padrão referência de crescimento.

3.7 RELAÇÃO ENTRE O EFEITO TÓXICO DA LAWSONA E A VIA REGULATÓRIA MEDIADA PELO MUTANTE YAP1

Para determinação da curva de crescimento, ensaios foram realizados para a linhagem BY4741 e seu mutante isogênico *yap1Δ*, na presença de duas fontes de carbono: uma respiro-fermentativa (Glicose) e outra restritamente respirável

(Glicerol). O antioxidante N-acetilcisteína foi adicionado na concentração de 5mM, como agente protetor celular (Esquema 1). Os ensaios aconteceram em meio sintético YNB, com a adição de 1,5 mL de cada condição estabelecida para as linhagens (Esquema 1) nos poços de uma placa do tipo flowerplates em Micro Fermentador System Biolector (m2p- Labs, Alemanha) a 30 °C e 800 rpm em aerobiose, com ajuste na concentração inicial de células na $DO_{inicial} = 0,1$. Para a construção da curva, as alíquotas foram coletadas em intervalos de 30min por aproximadamente 40h.



Esquema 1 - Condições experimentais utilizadas no ensaio de crescimento da levedura parental BY4741 e seu mutante *yap1Δ* na presença de Lawsona (172 mM), utilizando como fonte de carbono: glicose e glicerol. O antioxidante (N-acetilcisteína) foi adicionado junto a Lawsona como agente protetor oxidativo celular. A condição referência foi considerada como padrão de crescimento por conter apenas o microrganismo em meio sintético YNB (Fonte: Dados do autor).

3.8 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TOXICIDADE DA LAWSONA NA PRESENÇA/AUSÊNCIA DE OXIGÊNIO (O₂)

O efeito tóxico da Lawsona sobre influência do Oxigênio (O₂) foram testados para a linhagem parental BY4741 e o mutante isogênico *yap1Δ*. As células foram crescidas em erlenmeyer de 50 mL, contendo 30 mL de meio sintético YNB a 30°C, 160 rpm por 24h. As condições experimentais estudadas para o efeito tóxico da Lawsona na presença/ausência de oxigênio foram as mesmas utilizadas no esquema 1. Os ensaios foram realizados em concentração inicial de células em 0,1 de DO, sendo adicionado 150μL de cada condição à duas placas de 96 poços distintas. Uma placa foi alocada no shaker a 30°C, 160 rpm por 24h (Condição aeróbica), e a outra foi armazenada em uma jarra de anaerobiose na presença de um Anaerocult® A, responsável por promover a liberação de gás enriquecido em

CO₂ gerando uma atmosfera anaeróbica. O crescimento foi calculado pela diferença da DO_{inicial} e DO_{final} do crescimento em absorbância (600nm) mensurado através do leitor de Elisa (BioTek Instruments). O composto naftoquinônico β -Lapachona foi utilizada no ensaio sob as mesmas condições (Esquema 1) (Ramos-Pérez, 2014).

3.9 DETERMINAÇÃO DO GRUPAMENTO SULFIDRILA

O ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), DTNB é o método referência utilizado para mensurar a quantidade GSH através da sua reação com o DTNB formando o ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) de cor amarela. As células da linhagem parental BY4741 e da mutante *yap1 Δ* foram cultivadas em meio sintético YNB e coletadas na fase estacionária do crescimento (aproximadamente 20h). Em seguida, as células foram encubadas em Lawsons a 172 mM por 4h a 30°C sob 160 rpm de agitação em shaker, como pré-tratamento, em concentração inicial de células em 0,5 de DO. Logo foram coletadas, lavadas em solução salina (NaCl; 0,85% m/v) e contadas em microscópio óptico através da câmera de Neubauer. Um total de 109 células foram recolhidas, suspensas em 400 μ l de EDTA 0,02M (pH 4,7) e quebradas com 0,5 mg de pérolas de vidro, em ciclos de agitação no vórtex em velocidade máxima, por 30 segundos, intercalados por 30 segundos em gelo. Depois de centrifugadas a 14000 rpm por 20 min, o sobrenadante foi coletado e dividido em dois grupos. Para avaliação da quantidade total de grupos tióis livres, alíquotas de 100 μ l do sobrenadante foram misturadas com 390 μ l de Tris-HCL 0,2M (pH 8,2) e 10 mL do DTNB. Depois de encubadas por 30 minutos, protegidas da luz, a mistura foi avaliada em espectrofotômetro a 412nm (DO). Em paralelo, 225 μ l do sobrenadante foram misturados com 11,25 μ l de ácido tricloroacético à 10%, sendo este encubado em gelo por 30 min e centrifugado a 14000 rpm por 5 min. Cerca de 400 μ l desse sobrenadante foi coletado e misturado com 450 μ l de Tris-HCL 0,4M (pH 8,9) e 13 μ l de DTNB, incubados por 5 min a temperatura ambiente e avaliado em espectrofotômetro a 412nm (DO) para determinação da concentração de tióis não-proteicos. Os resultados foram relativos a quantidade de grupos tióis de resíduos proteicos, obtidos pela diferença entre a concentração de grupos tióis totais e a concentração de grupos tióis não-proteicos de cada amostra (Elsztein, 2010).

3.10 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DA LAWSONA SOBRE A PAREDE CELULAR DE *S. CEREVISIAE*

Para avaliar o efeito tóxico da lawsona sobre a parede celular das leveduras de *S. cerevisiae*, as células da linhagem parental BY4741 e mutante *yap1Δ* foram submetidas a lise pela ação da enzima liticase a 2,25 U/mL. As células foram coletadas e encubadas em concentração tóxica de lawsona a 574mM, nas mesmas condições citadas acima (subseção 4.8). Passado este tempo de incubação, as células foram lavadas três vezes com solução salina (NaCl; 0,85% m/v) e ressuspensas em tampão citrato de sódio (0,1 M) e (EDTA 10 mM) em pH 6,25, contendo a enzima Lisozima na concentração de 2,25 U/mL, ajustando a densidade celular inicial para 1,0. A decadência da absorvência foi medida em intervalos de 1 hora através do espectrofotômetro à 600nm, por 3h, para visualização da curva de lise celular. Durante o experimento, as amostras foram mantidas à 30°C sob 160 rpm de agitação. A metodologia descrita foi utilizada de acordo com o trabalho realizado por Elsztein et al (2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DA LAWSONA

As hidroxinaftoquinonas possuem várias peculiaridades estruturais. Os complexos de coordenação de quinonas com diferentes estados de oxidação refletem diferenças em suas propriedades estruturais, magnéticas e eletroquímicas, possibilitando sua participação em diversos mecanismos do sistema biológico, por exemplo, em atividades antiproliferativa, antifúngica, antiviral e antimalárico (SALUNKE-GAWALI et al., 2017). No entanto, ainda não se sabe com precisão quais são os efeitos causados por esta substância nos sistemas biológicos. No presente trabalho foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* como modelo experimental para se estudar as alterações biológicas causadas pela lawsona. Inicialmente, o valor de CIM da lawsona foi determinado utilizando-se a linhagem BY4741. A figura 13 mostra que a concentração de 172 mM já apresenta alta toxicidade para levedura, diminuindo em 80,13% a densidade final das culturas depois de 24 h de incubação comparado ao meio referência. As concentrações testadas acima de 229 mM não apresentaram crescimento celular, sendo esta considerada como a CIM no presente trabalho. Esta análise ainda não está relatada na literatura para *S. cerevisiae*. Contudo, estudos realizados por RAHMOUN et al. (2012; 2013a; 2013b) testaram a atividade antifúngica da Lawsona sintética oriunda da empresa Sigma-Aldrich (EUA). Os seguintes valores de CIMs foram relatados: 2.933 mM para a levedura *Candida albicans*, 861 mM para *Aspergillus niger*, 287 mM para *A. flavus* e 68 mM para *Fusarium oxysporum*, estas três últimas espécies representando os fungos filamentosos. O trabalho realizado por DANANJAYA et al (2017) apresentou a concentração CIM de 574 mM como valor de CIM para o fungo filamentoso *F. oxysporum*. Isto mostra que o efeito tóxico do composto varia com as espécies de fungo. Vários estudos também relataram diferentes valores de CIM para Lawsona quando diferentes métodos e meios de cultura são utilizados.

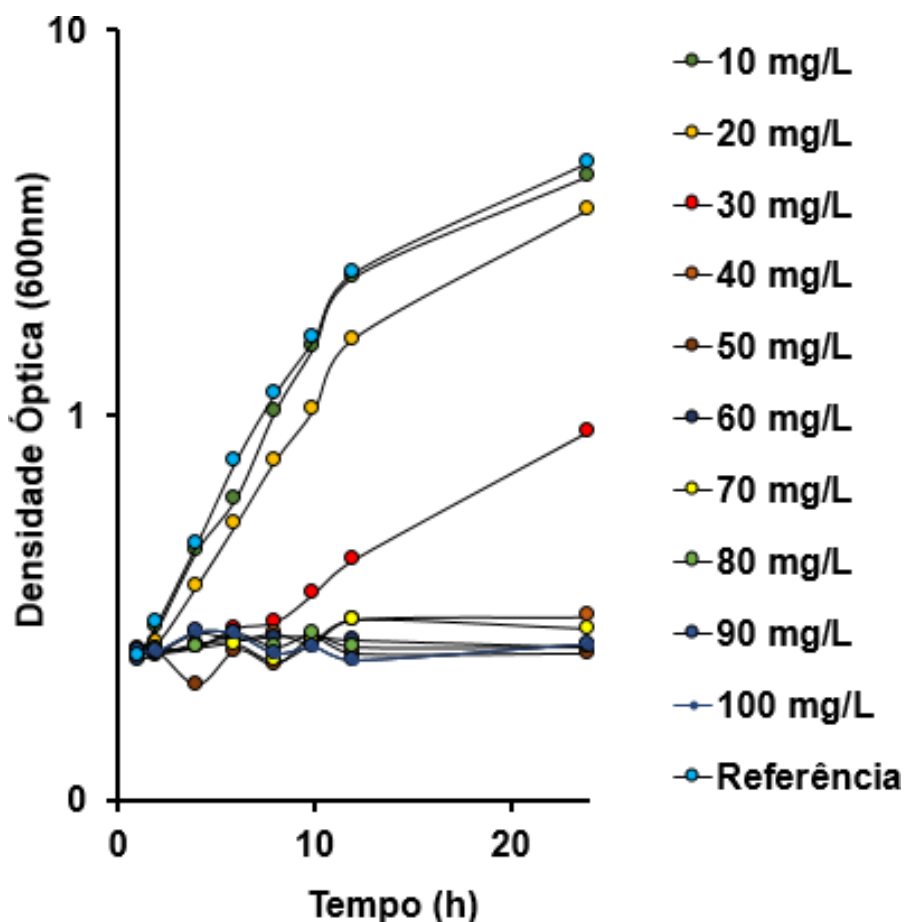


Figura 13 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do composto Lawsona, através do estudo do perfil cinético da curva de crescimento utilizando a linhagem BY4741 como referencial. As concentrações utilizadas foram: 10 mg/L (57 mM), 20 mg/L (115 mM), 30 mg/L (172 mM), 40 mg/L (229mM), 50 mg/L (287 mM), 60 mg/L (345 mM), 70 mg/L (402 mM), 80 mg/L (459 mM), 90 mg/L (517 mM) e 100 mg/L (574 mM), e a referência contendo o meio somente com o microrganismo. (Fonte: dados do autor).

Sabe-se que pigmentos naturais, como por exemplo as naftoquinonas, apresentam instabilidade estrutural em solução. De maneira geral, o grande desafio no manejo destes compostos está relacionado a sua estabilidade ser fortemente influenciada pela presença de luz, oxigênio, variação de pH e temperatura (SCHIOZER, 2007). Além disso, sua potência pode sofrer influência do método de síntese utilizado em sua obtenção, a partir do qual o nível de pureza apresenta interferência direta na atividade (DANANJAYA et al., 2017). No caso da lawsona, a ficha de segurança de sua utilização disponibilizada pela indústria EXTRASYNTHESE (Regulamento (CE) N° 1272/2008) indica que a molécula apresenta maior solubilidade em solução etanolólica e deve ser preservada em recipiente fechado, ao abrigo da luz, em temperaturas abaixo de 8°C. Estas condições de armazenamento foram obedecidas no presente trabalho, além da

preparação de novas soluções para uso imediato para evitar possível degradação do produto ao longo do tempo e perda de potência.

Para identificar possível degradação e descartar a presença de impurezas, amostras da solução de lawsona foram avaliadas por meio Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Esta técnica consiste em um método de separação de misturas (Fase móvel) baseada nas diferentes velocidades de migração em razão da afinidade relativa com solventes, fixado na fase sólida (Fase estacionária). O produto testado reage produzindo manchas na placa cromatográfica, cuja intensidade do produto é diretamente proporcional a sua concentração (Collins, 2010). A Figura 14 apresenta o cromatograma de duas amostras de soluções testadas de lawsona (linhas 1 e 2) com perfil semelhante àquela produzida pelo padrão técnico representado pela amostra de lawsona em pó (linha Law). A única diferença observada foi na intensidade das manchas produzidas em relação ao controle (Law), sendo basicamente mantido o mesmo padrão de intensidade para as amostras. Este resultado aponta a presença do composto testado, demonstrando que não houve degradação do produto. Além disso, não foi possível identificar manchas em outros tempos de retenção, o que poderia indicar algum tipo de impureza.

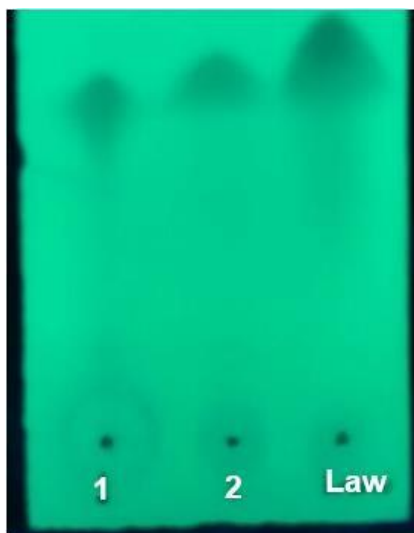


Figura 14 - Placa de Cromatografia em camada Delgada (CCD) preparada para as amostras de lawsona em solução hidroalcoólica a 70% v/v. Amostra 1- solução de lawsona armazenada a quatro meses; Amostra 2 - solução de lawsona armazenada por uma semana; Law – Amostra em pó da lawsona (Padrão). (Fonte: Dados do autor).

Diante do resultado negativo acerca da presença de impurezas, a justificativa para este problema poderia estar relacionada com a solubilidade da lawsona. Alguns trabalhos mostram que as soluções de lawsona foram preparadas em diferentes

soluções como veículo, a depender da finalidade do estudo, tais como: dissolução em meio BSA (Caldo Batata Dextrose) (DANANJAYA et al, 2017); em solução estabilizante de DMSO (Dimetilsufóxido) (RAMOS-PÉREZ et al, 2014); como também em solução hidroalcoólica. A solução hidroalcoólica foi utilizada nos testes em levedura neste trabalho, por se tratar de uma solução citada na literatura como solúvel para lawsona, além de não ser tóxica a célula utilizada como modelo de estudo. Porém, a dissolução completa da lawsona não foi alcançada, mesmo após vários testes de solubilidade em baixa concentração. Sendo assim, assume-se que a dificuldade na padronização da concentração nos experimentos é devida à insolubilidade da lawsona no diluente. Com isto, durante toda a discussão do trabalho o foco será dado ao efeito que a lawsona tem sobre a levedura referindo-se às concentrações CIM (quando não há crescimento) e sub-CIM, quando ocorrer crescimento celular, mas inferior ao da condição de referência sem a substância teste.

4.2 EFEITO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Para se avaliar o efeito do tipo de meio de cultura, as células foram cultivadas em meio sintético mineral ou meio rico YPD contendo concentração tóxica da lawsona (574,21 mM). Os resultados mostram que nessa concentração não houve crescimento das células da linhagem BY4741 quando cultivadas em meio sintético. No entanto, absolutamente nenhum efeito tóxico foi observado quando o meio de cultura foi o YPD (Figura 15, painel A). Para se tentar identificar qual o componente do meio rico estaria inibindo o efeito tóxico da lawsona, o meio sintético foi alterado das seguintes maneiras:

1) substituição do componente YNB pelo extrato de levedura do meio rico; 2) substituição do sulfato de amônia pela peptona do meio rico. Os resultados mostraram que tanto o extrato de levedura quanto a peptona produziram supressão no efeito tóxico da lawsona (Figura 15, painel B). O extrato de levedura é constituído, como o nome indica, de um extrato do conteúdo intracelular de leveduras, provendo vitaminas e outros fatores de crescimento indispensáveis para o cultivo de microrganismos. A peptona bacteriológica é uma preparação comercial de hidrolisado protéico constituída de oligopeptídeos e aminoácidos. Neste caso, os aminoácidos são importantes em prover estrutura para muitas atividades biológicas

e síntese de peptídeos e proteínas. Como os dois componentes foram igualmente capazes de reverter o efeito da lawsona, muito provavelmente estes possuem um conjunto de moléculas de difícil identificação que inibem a ação da lawsona.

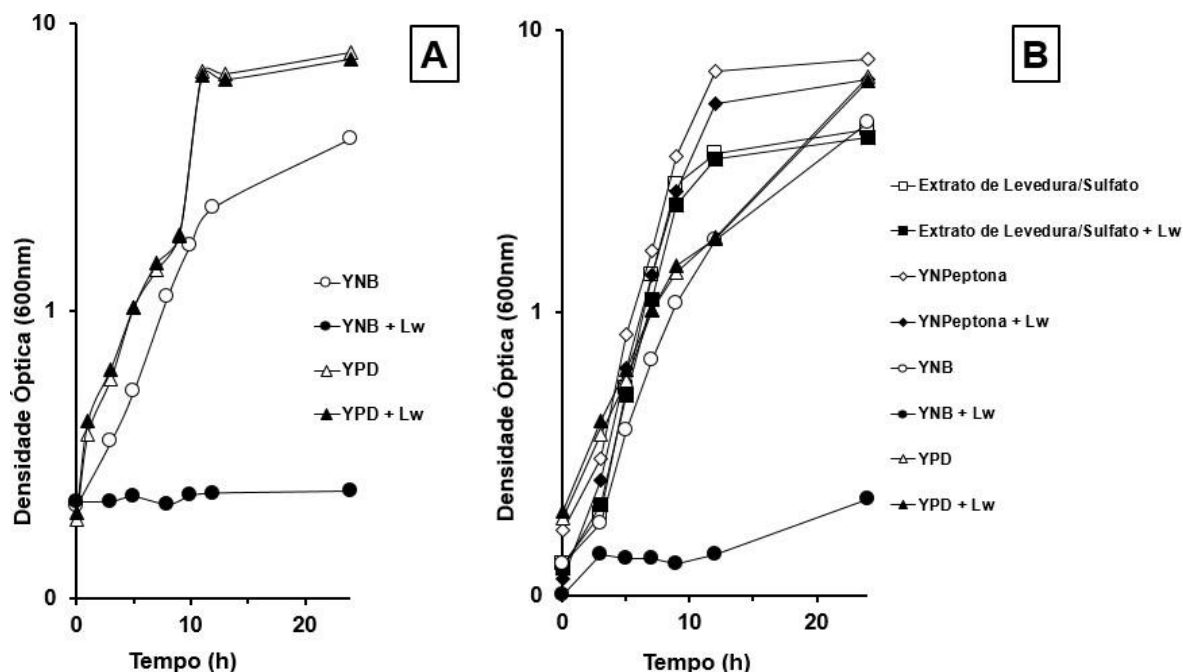


Figura 15 - Painel A - Curvas de crescimento em meio sintético (YNB) e meio rico (YPD); Painel B – Curvas de crescimento em meios preparados: Extrato de Levedura/Sulfato, YNPeptona, junto as curvas padrões referência: YNB e YPD. Todos os ensaios foram realizados para a linhagem BY4741 sob concentração tóxica da lawsona (574 mM). (Fonte: Dados do autor).

Além da composição, outra diferença significativa entre os dois meios de cultivo é o valor de pH inicial de cada um: o meio sintético apresenta pH inicial de 5,4 enquanto o meio YPD, assim como os meios sintéticos contendo extrato de levedura ou peptona, apresentam valores de pH inicial acima de 6,3. Os compostos químicos de ação terapêutica são, em sua maioria, ácidos ou bases fracas, que em meio biológico se apresentam mais ou menos ionizados. Considerando que a forma não ionizada de um composto é mais lipossolúvel que a forma ionizada, o pKa e o pH da substância são dois parâmetros que influem diretamente a passagem através das membranas biológicas e, portanto, estes dois parâmetros são determinantes em vários processos, principalmente de absorção (Rang & Dale, 2012). A força de um ácido depende, na definição de Bronsted Lowry, da sua constante de equilíbrio ácido base em água, ou seja, do seu valor de pKa, onde cada função orgânica possui seu valor específico. O pKa consiste basicamente no pH em que o composto químico se apresenta 50% ionizado e 50% não ionizado. Em escala de valores e força ácida,

quando o pKa é menor que 1 se tem um ácido muito forte, quando o vai de 1 a 5 se tem um ácido forte, entre 5 e 15 se tem um ácido fraco e quando é maior que 15 o ácido é muito fraco.

Considerando que o valor de pKa de 9,88 para a lawsona, têm-se um ácido bastante fraco que em solução aquosa não apresenta tendência a ionizar. Desta forma, os valores de pH encontrados nos meios não são capazes de modificar a carga formal do composto químico e, conseqüentemente, interferir na sua ação biológica. Em vista desses resultados, os experimentos a seguir foram realizados utilizando-se células cultivadas em meio mineral sintético para que seja possível avaliar o efeito biológico da lawsona na levedura.

4.3 POSSÍVEL RELAÇÃO DA LAWSONA COM ESTRESSE OXIDATIVO

O mecanismo pelo qual as naftoquinonas agem em sistemas biológicos, sugerem que a toxicidade seja resultado do acúmulo de dois principais mecanismos: o primeiro relacionado com a capacidade desses compostos em gerar estresse oxidativo (ciclo redox) pela presença característica do anel quinoide e sua eletrofilia; e o segundo pelo poder alquilante em formação de adutos pela reação de Michael (RAHMOUN et al., 2012). Para se investigar sua possível ação oxidante, as células da linhagem BY4741 foram cultivadas em meio suplementado ou não com o agente antioxidante NAC na presença de concentrações de lawsona acima do CIM (>229 mM). Não houve nenhuma alteração no padrão de crescimento pela presença de NAC, ou seja, a inibição do crescimento foi completa para todas as concentrações testadas (dados não apresentados). Isto sugeriu que a ação biológica da lawsona não se manifesta a partir da produção de estresse oxidativo. No entanto, quando foram testadas concentrações sub-letais de lawsona foi verificado um efeito aditivo do antioxidante sobre sua atividade inibitória. Na Figura 16 (painel A) pode-se verificar que a presença de NAC na concentração de 5 mM não alterou o perfil de crescimento da levedura em meio sintético contendo glicose. Devido ao chamado efeito Crabtree, células de *S. cerevisiae* cultivadas em aerobiose na presença de glicose em concentrações superiores a 5 mM ativam o mecanismo de repressão catabólica e, conseqüentemente, o metabolismo respiro-fermentativo (BRAUER et al, 2005). Com isso, o menor fluxo metabólico pela cadeia respiratória resulta na menor produção mitocondrial de EROs. Neste caso, não é esperado nenhum tipo de

efeito positivo do NAC sobre o crescimento celular, tal qual como observado. A presença de Lawsona na concentração sub-CIM de 172,26 mM produziu um pequeno efeito sobre o crescimento celular (Figura 16, painel A) tal qual observado anteriormente (Figura 13). Curiosamente, a associação do NAC com a Lawsona potencializou o efeito da substância de tal forma que o perfil de crescimento foi semelhante àqueles na presença de concentrações acima do CIM, ou seja, nenhum crescimento celular foi observado (Figura 16, painel A).

Em seguida, as células da linhagem BY4741 foram cultivadas em meio sintético contendo glicerol como fonte de carbono. Esta molécula é metabolizada diretamente na mitocôndria e, portanto, induz metabolismo estritamente respiratório. Os resultados mostraram que a mesma concentração sub-CIM de lawsona determinadas em meio com glicose, promove inibição do crescimento celular em meio com glicerol (Figura 16, painel B). Deve-se levar em consideração que a produção teórica de ATP por mol de glicerol é a metade do que em glicose, o que explica a diferença na biomassa final observada entre os dois cultivos (Figura 16). Esses dados indicam que a ação biológica da lawsona em doses sub-CIM deve se concentrar principalmente na mitocôndria, podendo afetar a cadeia respiratória ou o ciclo de Krebs. Neste caso, a adição de NAC ao meio de cultivo não alterou o perfil de crescimento na presença de lawsona (Figura 16, painel B) e possivelmente deve potencializar o efeito da lawsona tal como também observado no meio com glicose.

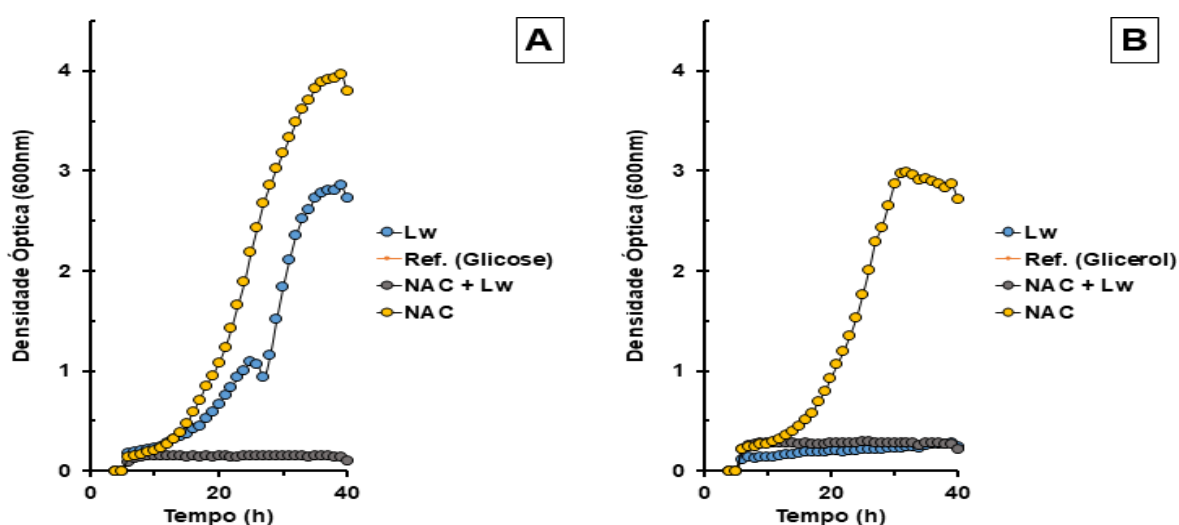


Figura 16 - Plano A – Perfil da curva de crescimento em meio sintético YNB na presença de Glicose; Plano B – Curva de crescimento em YNB apresentando Glicerol como fonte de Carbono. Ambas foram tratadas em concentração sub-CIM de Lawsona a 172,26 mM, avaliando o comportamento da linhagem referência BY4741, na presença do antioxidante exógeno N-acetilcisteína (5mM) e a associação dos dois compostos (Lawsona e NAC). (Fonte: Dados do autor).

O processo de potencialização do efeito da lawsona pelo NAC não havia sido descrito e os resultados obtidos neste trabalho não são capazes de elucidar esse efeito. No entanto, LEE et al. (2011) relataram a reação espontânea entre NAC e um dos produtos de degradação da glicose chamado 3,4-dideoxiglicosona-3-eno (3,4-DGE) para formação de um aduto NAC-DGE. Em apenas uma hora depois da mistura das duas moléculas apenas 25% de 3,4-DGE livre estava presente no meio de reação. A reação de ligação foi proposta como mostrado na Figura 17 envolvendo o grupamento sulfidril do NAC. Dada a similaridade estrutural da lawsona com o 3,4-DGE é possível supor que a adição de NAC e lawsona no meio de cultura produza, por meio de uma reação espontânea envolvendo o radical -SH do NAC, uma molécula complexa que apresente efeito tóxico muito pronunciado para as células de levedura. Em adição à essa possibilidade, a capacidade reacional da lawsona com outros compostos contendo radicais-SH poderia explicar a ausência de efeito desta molécula quando as células são cultivadas no meio rico YPD (Figura 15). Com isso, a presença de aminoácidos sulfurados como cisteína (presente na peptona) ou de moléculas tiólicas como glutatona e proteínas sulfuradas como tiorredoxina (presentes no extrato de levedura) poderiam rapidamente reagir com lawsona produzindo adutos que nesses casos seriam biologicamente inertes.

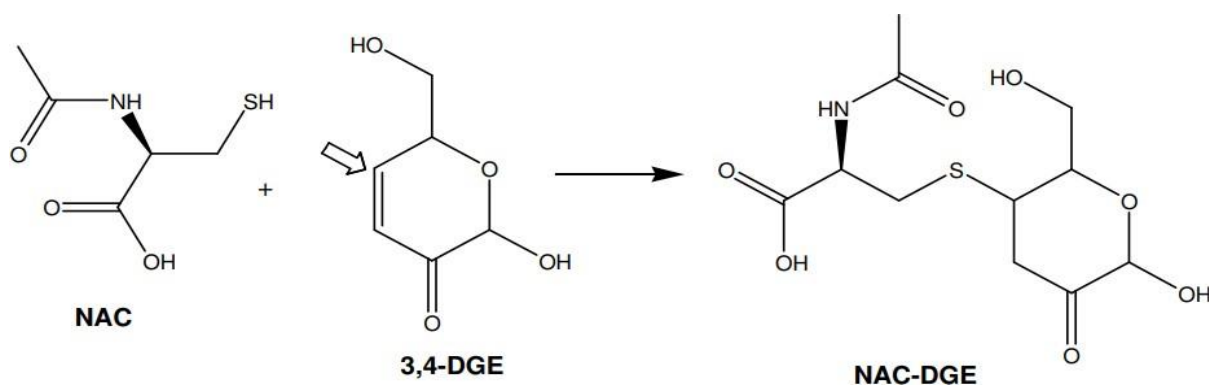


Figura 17- Modelo de reação espontânea entre N-acetilcisteína (NAC) e 3,4-dideoxiglicosona-3-eno (3,4- DGE) proposto por LEE et al (2011). (Fonte: LEE et al, 2011)

Para avaliar essa possível ligação entre a lawsona e compostos tiólicos celulares, os níveis de tióis livres (basicamente glutatona reduzida - GSH) foram determinados em extratos de células da linhagem BY4741 tratadas em concentração tóxica de lawsona a 574,21 mM. Os resultados mostram a diminuição dos tióis livres em 34,75% após tratamento em relação a condição sem tratamento (Figura 20). Isto

indica que a lawsona é capaz de depletar parte da reserva intracelular de GSH por um processo do tipo quelatação a partir de uma possível ligação química espontânea entre essas duas moléculas (Lawsona e NAC), como elucidado anteriormente, em uma reação do tipo reação de adição de Michael (RAMOS-PÉREZ et al, 2014).

Esta capacidade reativa das quinonas em arilar diretamente grupos nucleófilos é usualmente associada com a desintoxicação e a excreção, porém, a depender das condições, resultam em grave toxicidade por inibição de grupos tios em enzimas e alteração do balanço protetor na célula (BOLTON et al, 2000; ZHANG et al., 2009). Estudos mostram que a presença da hidroxila no C-2 torna os compostos quinoides (1,4-naftoquinonas) menos ativos que os hidroxilados em C-5 (KLAUS et al, 2010). Esse evento ocorre pelo fato de que a presença da estrutura enol em C-2 provoca tautomerização que resulta em um C-3 saturado, tornando mais difícil as reações de adição do tipo Michael nessa posição. Além disso, a tautomerização traz mais estabilidade a estrutura quinoide e diminui seu potencial de redução eletrônico (KLAUS et al, 2010). Diante disto, a lawsona apresenta capacidade em arilar compostos tiólicos, porém, em menor força se comparada a outras naftoquinonas (Klaus et al, 2010)

A queda na reserva de GSH, e consequentemente no potencial redutor intracelular, poderia explicar a queda no crescimento celular em glicose, que depende parcialmente do metabolismo respiratório, e a inibição completa do crescimento em glicerol que depende completamente do metabolismo respiratório, mesmo em dose sub- CIM. Deve-se levar em consideração que o metabolismo respiratório leva à grande produção de EROs que deve ser neutralizada pelo potencial redutor da célula expresso pela razão GSSG/GSH. Quanto maior essa razão, menor potencial redutor e consequentemente menor capacidade das células de se defenderem de agentes oxidantes.

Por fim, a possibilidade da ação da lawsona como agente causador de estresse oxidativo foi testado a partir do cultivo das células da linhagem BY4741 em anaerobiose, no qual o metabolismo fermentativo pleno está funcionando. A influência do oxigênio molecular (O_2) sobre o efeito de toxicidade das naftoquinonas baseia-se na hipótese de que, sob a normoxia (condições normais de oxigênio), a substância potencializa a produção de EROs a partir de dois possíveis ciclos redox que produzem grandes quantidades de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . O principal é mediado pela citocromo P450 oxidoreductase responsável pela doação de um elétron para a

quinona (Q) que se transforma no radical ânion semiquinônico ($SQ^{\bullet-}$) e na presença de O_2 volta a forma Q a partir da formação do ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$. O secundário é mediado pela enzima NQO1 que adiciona dois elétrons a quinona (Q) gerando a hidroquinona (QH_2). Devido a instabilidade, a QH_2 perde prótons e doa elétrons para o O_2 , gerando mais $O_2^{\bullet-}$. Em condições de hipóxia, a primeira reação de cada ciclo ainda é possível, porém, na ausência do oxigênio molecular (O_2) como receptor, o intermediário radical ânion $SQ^{\bullet-}$ perder-se em reações secundárias que acabam por deslocar a toxicidade da naftoquinona, tornando-a menos tóxica para a célula (RAMOS-PÉREZ et al, 2014).

A Figura 18 (painel A) mostra que o crescimento celular da linhagem BY4741 foi reduzido quando lawsona foi adicionada na concentração sub-CIM de 172 mM na mesma proporção em aerobiose e em anaerobiose. Isso mostra que sua ação tóxica independe da presença de oxigênio no meio. A adição de NAC ao meio de cultivo promoveu aumento no potencial tóxico da lawsona também na ausência de oxigênio (Figura 18, painel A). O estudo realizado por RAMOS-PÉREZ et al (2014) mostrou que o derivado naftoquinônico β -lapachona apresenta ação tóxica sobre *S. cerevisiae* que é parcialmente dependente da presença de oxigênio. Esse resultado foi reproduzido no presente trabalho (Figura 18, painel B). A adição de β -lapachona ao meio de cultura na concentração sub-CIM de 247 mM resultou no decréscimo de 20% no crescimento celular em aerobiose em relação à condição de referência. Este efeito tóxico foi suprimido quando as células foram cultivadas em anaerobiose, com valores de biomassa final dos cultivos contendo β -lapachona semelhantes ao da condição de referência (Figura 18, painel B). Portanto, pode-se concluir que de fato o efeito tóxico da lawsona é independente da presença de oxigênio e, provavelmente, não deve ter relação com a cadeia respiratória ou produção de EROs em níveis letais. Adicionalmente, a adição de NAC ao meio potencializou o efeito tóxico da β -lapachona, sendo mais evidente em anaerobiose (Figura 18, painel B). Ou seja, possivelmente ocorre também uma reação espontânea entre essas duas moléculas gerando um aduto tóxico para as células de levedura, cuja ação independe da presença de oxigênio.

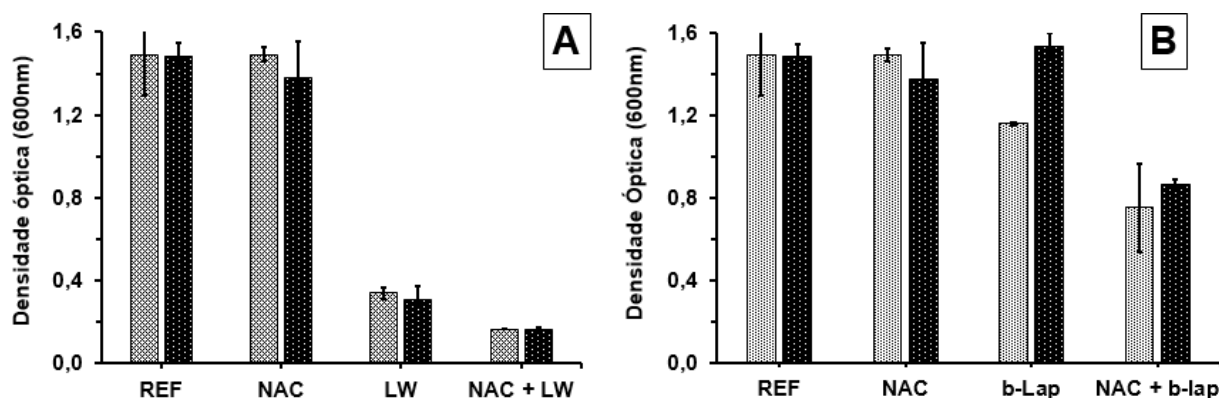


Figura 18 - Crescimento celular da linhagem BY4741 estimado na diferença da DOInicial pela DOFinal após 24h de ensaio em YNB sintético, na presença e ausência de oxigênio, sob efeito de lawsona a 172 mM (Painel A). O composto naftoquinônico β -lapachona também foi testado a 247 Mm (Painel B). As barras com pontilhados mais claros expressam a presença de oxigênio (Aerobiose), e as barras pontilhadas mais escuros consistem nos ensaios realizados na ausência de Oxigênio (Anaerobiose) (Fonte: Dados do autor).

4.4 PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA YAP1 NA PROTEÇÃO CONTRA LAWSONA

No estudo realizado por RAMOS-PÉREZ et al. (2014) foi mostrado que a proteína Yap1 desempenha um papel fundamental na proteção das células de levedura aos efeitos tóxicos da β -lapachona. Esta proteína é um fator de transcrição que pertence à família bZip (basic domain/leucine zipper) que regula a expressão de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo, a qual é ativada por mecanismos que captam o estado redox intracelular causado por espécies reativas de oxigênio e tióis oxidados (HE et al., 2005; TASHIBANA et al., 2011). Este mecanismo envolve resíduos de cisteína de Yap1p que são sensíveis ao estado redox da célula. Sob estresse oxidativo, esses resíduos são ligados de forma reversível por pontes dissulfeto, promovendo mudanças conformacionais na proteína que ativam a sua função regulatória para a expressão dos genes alvo (HERRERO et al, 2008). Dentre esses genes estão aqueles envolvidos na manutenção da reserva tiólica (GSH e tiorredoxina) da célula, tais com os genes que codificam as enzimas γ -glutamylcysteine sintetase, glutathione sintetase, tiorredoxina peroxidase e ribonucleotídeo peroxidase (HE et al., 2005). Por outro lado, a expressão do próprio gene YAP1 é regulado por proteínas que se encontram a montante na via dos mecanismos de proteção a EROs: Gpx3p (glutathione peroxidase), Ybp1p (proteína requerida para a oxidação e localização nuclear de Yap1p) e a própria Tsa1p (tiorredoxina peroxidase) (TACHIBANA et al, 2009). Diante do fato de que a presença de lawsona leva a diminuição na reserva de GSH, o papel da proteína Yap1 na proteção a esta substância foi avaliado a partir do uso da linhagem mutante

yap1 Δ que corresponde a linhagem de referência BY4741 com deleção completa do gene YAP1.

Os resultados da **Figura 19** (painel A), em glicose como fonte de carbono, mostram que a presença de lawsona em concentração sub-CIM de 172 mM promoveu queda no crescimento da linhagem mutante yap1 Δ que foi mais pronunciada do que a queda no crescimento observada para a linhagem de referência BY4741 (Figura 16, painel A). Também pode ser observado que a adição de NAC promoveu aumento no crescimento da cultura da linhagem mutante (Figura 19, painel A). E semelhante ao que foi observado para a linhagem BY4741, a adição de NAC ao meio de cultura potencializou o efeito da lawsona (Figura 19, painel A). Quando glicerol foi utilizado como fonte de carbono, induzindo ao crescimento puramente respiratório, foi observada uma quebra acentuada no perfil de crescimento da linhagem mutante (Figura 19, painel B) quando comparado a linhagem parental (Figura 16, painel B). Isto se deve a deficiência das células mutantes em eliminar o estresse oxidativo promovido para intensa produção de EROs pelas mitocôndrias devido a menor disponibilidade de GSH (ver abaixo). No entanto, o crescimento celular do mutante foi restaurado ao nível da linhagem de referência quando NAC foi adicionado ao meio (Figura 19, painel B). Também nessa condição, a adição de lawsona na concentração considerada sub-CIM em cultivos com glicose foi extremamente tóxica para as células mutantes em glicerol (Figura 19). A partir desses resultados, conclui-se que a tolerância das células de *S. cerevisiae* aos efeitos tóxicos da lawsona é parcialmente dependente da presença da proteína Yap1.

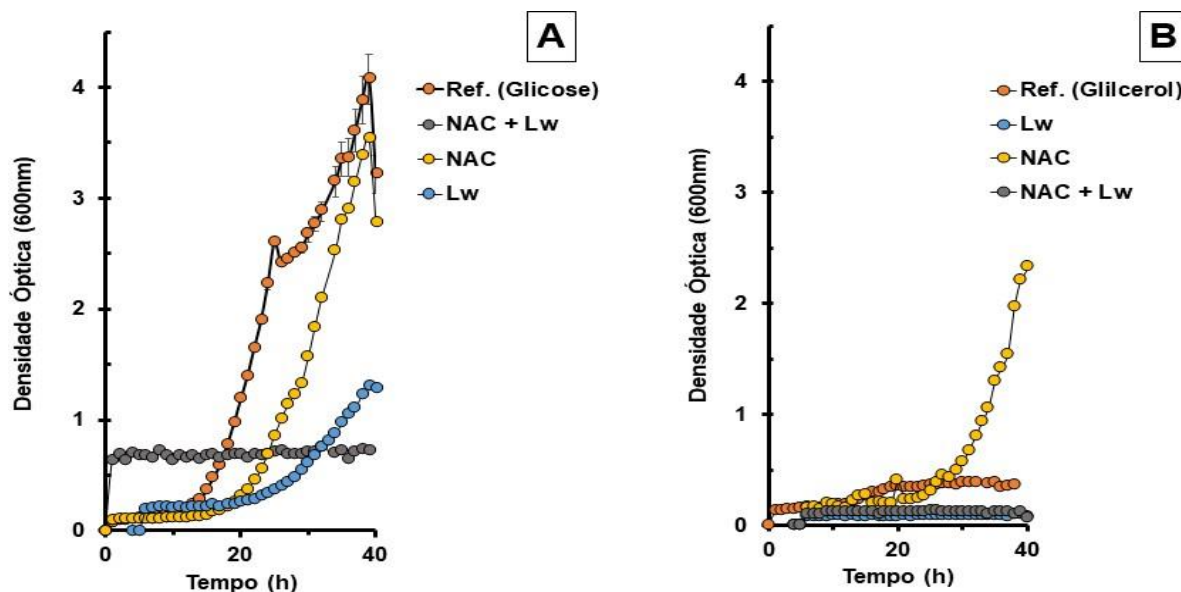


Figura 19 - Painel A – Perfil da curva de crescimento em meio sintético YNB na presença de Glicose; B–Curva de crescimento em meio YNB com Glicerol como fonte de carbono. A linhagem mutante isogênica *yap1D* foi utilizada em ambos os crescimentos e foram tratadas em concentração sub-CIM de Lawsonia a 172 mM, para avaliar o comportamento da levedura na presença do antioxidante exógeno N- acetilcisteína (5mM) e o efeito da associação dos dois compostos (Lawsonia e NAC). (Fonte: Dados do autor).

Possivelmente a dependência da proteína Yap1 deve estar relacionada ao conteúdo intracelular de compostos tiólicos, cujos genes de síntese são positivamente regulados por este fator de transcrição. A partir dessa hipótese determinamos o conteúdo de tióis livres no extrato das células mutantes *yap1D*. Os resultados mostraram que esse mutante apresenta 27% menos conteúdo de tióis livres no seu interior do que a linhagem BY4741 (Figura 20), tornando-o mais sensível aos efeitos tóxicos de EROs produzidos pelo metabolismo respiratório (Figura 19, painel B). Depois do tratamento com lawsona, esse conteúdo de tióis foi reduzido em 11,3%, resultando numa queda total de mais de 38% no conteúdo intracelular de tióis em relação a linhagem BY4741 não tratada (Figura 20). Isto representa uma redução de mais de 3% em relação a queda de 35% observada para linhagem BY4741 tratada com lawsona (**Figura 20**).

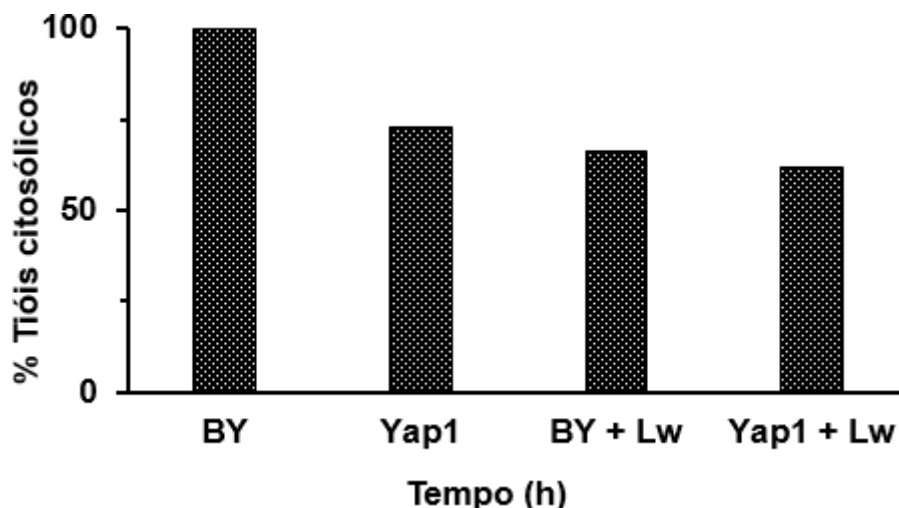


Figura 20 - Mostra o gráfico em barra da diferença em percentual dos grupamentos tióis citosólicos livres, do mutante *yap1Δ* em relação a linhagem parental BY4741 em condições normais, assim como a perda em percentual apresentada após tratamento com lawsona a 574 mM (Fonte: Dados do autor).

O efeito do metabolismo oxidativo sobre a ação da lawsona foi testado novamente a partir de cultivos da linhagem mutante *yap1Δ* em condições de anaerobiose. Os resultados mostram que as células mutantes cresceram um pouco mais em anaerobiose do que em aerobiose (Figura 21). A adição de lawsona ao meio em concentração sub-CIM de 172 mM foi mais tóxica tanto em aerobiose quanto em anaerobiose para a linhagem mutante (Figura 21, painel A) do que para a linhagem BY4741 (Figura 18, painel A). Foi observado também que β -lapachona foi muito mais tóxico em aerobiose para as células mutantes (Figura 21, painel B) do que foi para a linhagem BY4741 (Figura 18, painel B). No entanto, embora tenha havido aumento no crescimento celular da linhagem mutante em anaerobiose (Figura 21, painel B), essa condição não restaurou o crescimento celular aos níveis normais como foi observado para linhagem parental (Figura 18, painel B). Isso mostra que de fato a presença da proteína Yap1 é muito mais importante para a tolerância a β -lapachona do que para a tolerância a lawsona. Portanto, se a lawsona atua na formação de algum tipo de dano oxidativo, estes não induzem o mecanismo de detoxificação dependente de glutatona e tiorredoxinas que é independente de Yap1p.

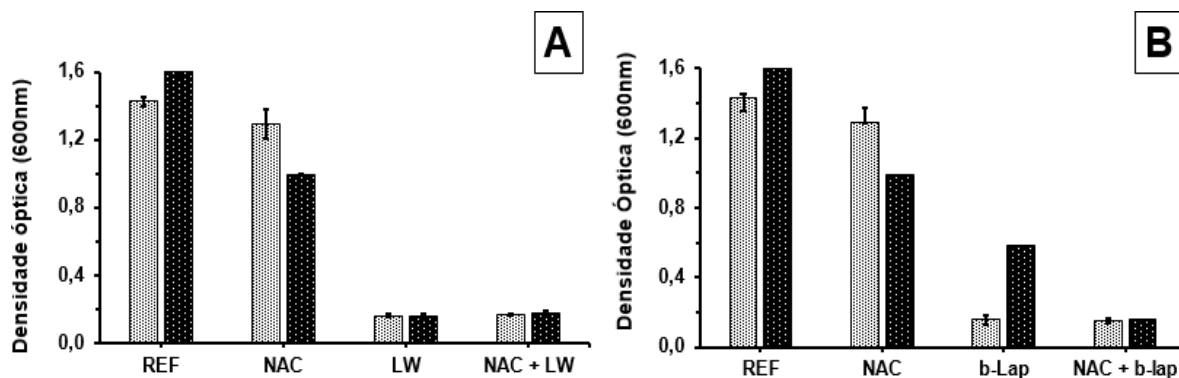


Figura 21 - Crescimento celular da linhagem mutante *yap1Δ* estimado na diferença da DO_{Inicial} pela DO_{Final} após 24h de ensaio em YNB sintético, na presença e ausência de oxigênio, sob efeito de lawsona a 172 mM (Painel A). O composto naftoquinônico b-lapachona também foi testado a 247 Mm (Painel B). As barras com pontilhados mais claros expressam a presença de oxigênio (Aerobiose), e as barras pontilhadas mais escuros consistem nos ensaios realizados na ausência de Oxigênio (Anaerobiose) (Fonte: Dados do autor).

4.5 INVESTIGAÇÃO DO EFEITO TÓXICO DA LAWSONA SOBRE A PAREDE CELULAR DE *S. CEREVISIAE*

Em trabalho muito recente, DANANJAYA et al (2017) mostraram que a lawsona tem efeito fungicida sobre *Fusarium oxysporum* devido a alterações morfológicas significativas, com danos severos a parede celular do fungo. Um conjunto de alterações compensatórias na expressão gênica e na composição e arquitetura da parede celular ocorrem quando a integridade da parede celular está comprometida, e estas alterações resultam em células mais resistentes a possíveis perturbações da parede celular (BOORSMA et al, 2004). O trabalho realizado por BOURDINEAUD et al (2000) mostrou que o fator de transcrição Yap1 teria alguma função na manutenção da parede celular, regulando a expressão do gene *SRP1* responsável por codificar uma manno-proteína de parede necessária integridade. Além disso, o fenótipo do mutante Yap1 apresenta sensibilidade ao corante Vermelho Congo, agente tóxico que perturba a montagem das microfibras β 1-3-Glucanos. Também foi mostrado que a proteína Yap1 teria papel importante na restauração de danos causados na parede celular de *S. cerevisiae* pelo agente biocida polihexametil bisguanida (ELSZTEIN et al., 2011). Diante desse conjunto de fatos, analisamos a possível influência da lawsona sobre a estrutura da parede celular de *S. cerevisiae* e possível participação de Yap1p nesse processo. Para isso, foram realizados experimentos de lise celular usando a enzima litcase, uma enzima com atividade β -glicolítica, que revelaria a ação da lawsona influenciando na

fragilidade da parede celular. As células das linhagens BY4741 e *yap1Δ* cultivadas em diferentes meios de cultura foram tratadas com lawsona na concentração CIM de 574 mM e submetidas ao ensaio de lise. Os resultados mostraram que não houve diferença no perfil de lise entre as linhagens parental e mutante cultivadas em meio sintético (Figura 22, painel A, B e C). Nessa condição, a incubação com lawsona não alterou o perfil de lise nem da linhagem parental (Figura 22, painel B) e nem da linhagem mutante (Figura 22, painel C), embora os resultados anteriores tenham mostrado que o crescimento celular é completamente inibido nessa concentração de lawsona. Portanto, conclui-se que o efeito biológico dessa substância não se expressa pela produção de danos na parede celular da levedura.

Dada a diferença encontrada na ação da lawsona dependendo da composição do meio (Figura 15, painel A), as células de levedura foram cultivadas em meio rico YPD antes do tratamento com lawsona. Os resultados mostraram que nesse meio as células de levedura, parental e mutante, são 24% mais sensíveis à ação da litase (Figura 22, painel D) do que as células cultivadas em meio sintético (Figura 22, painel A). Quando as células da linhagem parental BY4741 cultivadas em YPD foram incubadas com lawsona, estas se tornaram muito mais sensíveis à ação lítica da litase, com apenas 16% das células íntegras ao final do ensaio (Figura 22, painel E), embora o cultivo nesse meio tenha eliminado o efeito tóxico da lawsona (Figura 15, painel A). O fato intrigante neste caso é que a ausência da proteína Yap1 nas células mutantes suprimiu o efeito sensibilizante da lawsona em meio YPD (Figura 22, painel F). Dados da literatura mostraram que mutações nos genes *GAS1* e *GAS3* (MOUYNA et al., 2000), *TOS1* (YIN et al., 2005) e *NCW2* (Elsztein et al., 2016), todos envolvidos na síntese e manutenção da malha de β -glucanos da parede celular, apresentaram um efeito supressor da sensibilidade celular à lise a partir da indução de um mecanismo de compensação que envolve o aumento no conteúdo de quitina depositada na parede celular. Essa quitina aumentada elevaria a resistência à lise pela litase. De fato, foi percebido neste estudo a partir de análise Microscopia de fluorescência um pequeno aumento qualitativo na deposição de quitina das células *yap1Δ* tratadas com lawsona (dados não mostrados), mas a falta de quantificação neste aumento não permite maiores conclusões. Entretanto, pode-se concluir que a lawsona causaria alguma perturbação na parede celular da levedura cultivada em meio YPD que não estaria associada à sua ação tóxica,

mas que aumentaria a sensibilidade à lise enzimática de maneira dependente da presença da proteína Yap

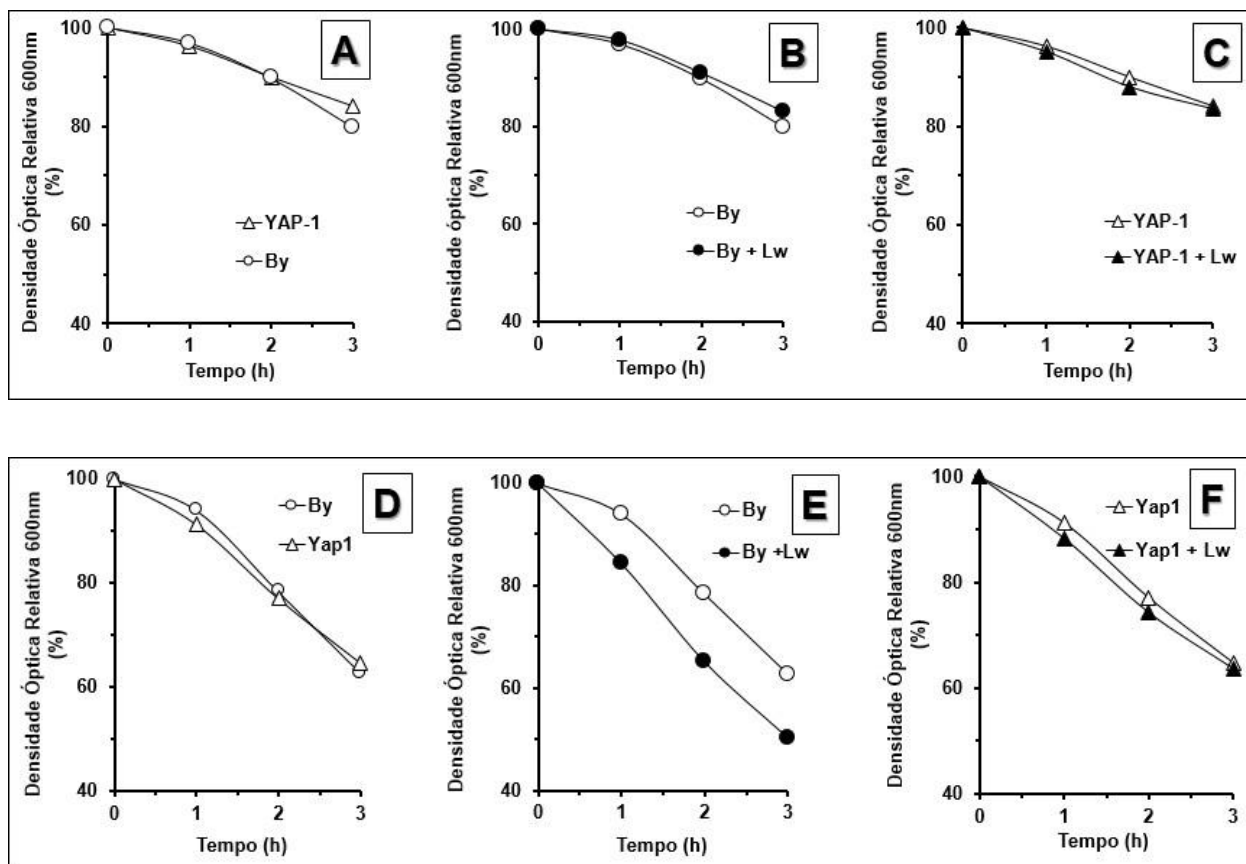


Figura 22 – Experimento de sensibilidade da lisecelular com a enzima liticase (2,25U/ml), após incubação em altas concentrações de Lawsona a 574mM por 4h sobre as linhagens: BY4741 (Parental) e *yap1Δ*(Mutante); **Gráfico A, B e C** – As linhagens cultivas em meio sintético YNB; **Gráfico A** – submetidas a lise celular, sem pré-tratamento (CondiçãoReferência); **GráficoB**–A linhagem BY4741 após incubação em Lawsona; **Gráfico C** – Mutante *yap1Δ* após encubação em Lawsona; **Gráficos D, E e F** – As linhagens cultivadas em meio rico YPD; **Gráficos D** – Linhagens submetidas a lise sem pré-tratamento (Condição Referência); **Gráficos E** – A linhagem BY 4741 após encubação em Lawsona; **Gráfico F** – Mutante Yap1 após encubação em Lawsona. As células foram coletadas na fase estacionária de crescimento, e o decaimento da curva foi monitorado através densidade óptica relativa (%) à 600nm por 3h. (Fonte: Dados do autor).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, iniciamos a análise sobre o mecanismo de ação da Lawosna utilizando a levedura *S. cerevisiae* como modelo experimental. Os resultados mostraram que o efeito tóxico da Lawosna independe da presença de oxigênio e, provavelmente, não deve ter relação com a cadeia respiratória ou produção de EROs em níveis letais. Além disso, revelaram que a tolerância das células de *S. cerevisiae* aos efeitos tóxicos da lawsona é parcialmente dependente da presença da proteína Yap1 e baseia-se em sua capacidade de arilar compostos tiólicos. Possivelmente a dependência da proteína Yap1 deve estar relacionada ao conteúdo intracelular de compostos tiólicos, cujos genes de síntese são positivamente regulados por este fator de transcrição. Estes efeitos podem ser justificados por uma possível reação espontânea envolvendo o radical -SH do NAC e a Lawosna na formação de uma molécula complexa que apresenta efeito tóxico muito pronunciado para as células de levedura. Em adição à essa possibilidade, a capacidade reacional da lawsona com outros compostos contendo radicais -SH poderia explicar a ausência de efeito desta molécula quando as células são cultivadas no meio rico YPD, pela reversão total do efeito tóxico. Além disso, neste estudo foi possível inferir que a Lawosna causa danos a parede celular pela alteração na resistência da ação enzimática após encubação das células em meio YPD.

REFERÊNCIAS

- ATIA, A. *et al.* A Review of NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase 1 (NQO1); A Multifunctional Antioxidant Enzyme. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research**, 4, 118-122, 2014.
- AUSUBEL, B. *et al.* **Currents protocols in molecular biology**. John wiley & Sons Inc, New York, USA, 2003.
- AVERY, A.M; AVERY, S.V. *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperox-ide glutathione peroxidases. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 33730–33735, 2001.
- AZEVEDO, D. *et al.* Two redox centers within Yap1 for H₂O₂ and thiol-reactive chemicals signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, 35, 889-900, 2003.
- BAE, Y.S. *et al.* Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. **Molecules and cells**, 32, 491-509, 2011.
- BARBOSA, T. P. *et al.* New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from norlapachol with molluscicidal activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 13, 6464-6469, 2005.
- BORADE, A.S. *et al.* phytopharmacological review on *Lawsonia inermis* (Linn.). **International Journal Pharmacy and Life Sciences**, 2, 536-541, 2011.
- BOORSMA, A. *et al.* Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, 21, 413–427, 2004.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. *Brewing Yeast and Fermentation*. **Blackwell Science Ltd.**, p. 643, 2001.
- BOISNARD, S. *et al.* H₂O₂ activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, 8, 1429–1438, 2009.
- BOLTON, J.L. *et al.* Role of quinones in toxicology. **Chemistry Research Toxicology**, 13, 135 – 60, 2000.
- BOTROS, R. M. *et al.* Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves, **Zeitschrift fur Naturforschung C.**, 59, p. 468–476, 2004.
- BOURDINEAUD, J.P. *et al.* A Rox1-independent hypoxic pathway in yeast. Antagonistic action of the repressor Ord1 and activator Yap1 for hypoxic expression of the SRP1/TIR1 gene. **Molecular Microbiology**, 38, 879-90, 2000.
- BRIHELIUS-FLOHE, R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. **Biology Chemistry**, 387, 1329–1335. 2006.

BUDZIAK, C.R. *et al.* Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, 27, p. 399, 2004.

CABIB, E. *et al.* Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 307-333, 1998.

CANSIAN, R. L. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activities of ho-sho (Cinnamomum camphora Ness e Eberm Var. Linaloolifera fujita) essential oil. **Food Chemistry and Technology**, 30, 378-384, 2010.

CARTWRIGHT-JONES, C. **Developing Guidelines on Henna: A Geographical Approach** (Dissertação de Mestrado), 2006. Disponível em: www.hennapage.com/henna/encyclopedia/mastersessay/index.html. Acesso em: 20 de maio de 2018.

CUI, K. *et al.* Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 28, 771-799, 2004.

CULOTTA, J. L. T. Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. **Journal of Biology Chemistry**, 280, 41373–41379, 2005.

DANANJAYA, S. H. S. *et al.* In vitro and in vivo antifungal efficacy of plant based lawsone against *Fusarium oxysporum* species complex. **Microbiological Research**, 201, 21-29, 2017.

DEGANI, A. L. G. *et al.* CROMATOGRAFIA: Um breve ensaio. **Química na Escola**, 7, 21-25, 1998.

DELAUNAY, A. *et al.* The oxidative stress response mediated via POS9/Skn7 in regulated BY4741 the RAS/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetic and Genomics**, 261, 740-752, 2002.

DOHERTY, M. D. *et al.* Mechanisms of Toxicity of 2- and 5-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone; Absence of a Role for Redox Cycling in the Toxicity of 2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinone to Isolated Hepatocytes. **Journal of Applied Toxicology**, 7, p. 123-129, 1998.

DRAKULIC, T. Involvement of oxidative stress response genes in redox homeostasis, the level of reactive oxygen species, and ageing in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, 5, 1215-1228, 2005.

EL-SHAER, N.S. *et al.* Determination of lawsone in henna powders BY4741 high performance thin layer chromatography. **Journal of Separation Science**, 30, 3311-3315, 2007.

EVANS, P; HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **British Journal of Nutrition**, 85, 67–74, 2001.

FELDMANN, H. (Editor). **Yeast: Molecular and Cell Biology**. Ed. WileyBlackwell: Estados Unidos da América, 2, 2012.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43, 61-68, 1997.

FERREIRA, S. B. *et al.* β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, 2, 140-141, 2010.

FERREIRA, D. C. M. **Detecção amperométrica, com Microeletrodos, de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células isoladas estimuladas por substâncias biologicamente ativas**. (Tese de doutorado). Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2008. Disponível em: www.hennapage.com/henna/encyclopedia/mastersessay/index.html. Acesso em: 30 de setembro de 2018.

FERRAZ, P. A. L. *et al.* Electrochemical aspects of the reduction of biologically active 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones. **Journal Electroanalytical Chemistry**, 504, 275-286, 2001.

FREI, B.; HIGDON, J. V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. **The Journal of Nutrition**, 133, 3275-84, 2003.

FLEURI, L. F., HÉLIA, H. S. Produção, Purificação, Clonagem e aplicação de enzimas lítica. **Química Nova**, 28, 871-879, 2005.

FORSBERG H, *et al.* The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. **Molecular Microbiology**, 42, 215-228, 2001.

GAYTAN, A.V. *et al.* Functional profiling discovers the dieldrin organochlorinated pesticide affects leucine availability in yeast. **Toxicology Science**, 132, 347–358, 2013.

GIL, F.N. *et al.* Suitability of a *Saccharomyces cerevisiae*-based assay to assess the toxicity of pyrimethanil sprayed soils via surface runoff: comparison with standard aquatic and soil toxicity assays, **Science of the Total Environment**, 505, 161–171, 2015.

GIAEVER, G. *et al.* Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, **Nature**, 418, 387–391, 2002.

GOFFEAU, A. *et al.* Life with 6000 genes, **Science**, 274, 63–67, 1996.

GOMBERT, A. K. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. **Journal of Bacteriology**, 183, 1441-51, 2001.

GREEN, K. *et al.* Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, 53, 110-118, 2004.

GURVITZ, A., ROTTENSTEINER, H. The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. **Biochimica Biophysica Acta**, 12, 1392-1402, 2006.

HABBAL, O. *et al.* Antibacterial activity of lawsonia inermis linn (Henna) against pseudomonas aeruginosa, **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, 3, 173–176, 2011.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, 141, 312-322, 2006.

HALLIWELL, B. e GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, 186, 1-85, 1990.

HAMADEH, H.K., *et al.* Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles, **Toxicology Science**, 67, 219–23, 2002.

HAN, G. S., *et al.* Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DPP1-encoded diacylglycerol pyrophosphate phosphatase by zinc. **Journal Biology Chemistry**, 13, 10126-10133, 2001.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radicals and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, 11, 298-300, 1956.

HATEM, E., *et al.* Glutathione is essential to preserve nuclear function and cell survival under oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, 67, 103–114. 2014.

HEMA, R., *et al.* Gas chromatography – mass spectroscopic analysis of Lawsonia inermis leaves. **New York Academy of Sciences**, 3, 142–143, 2010.

HENNICKE, F. *et al.* Factors Supporting Cysteine Tolerance and Sulfite Production in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, 12, 604–613, 2013.

_____. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism. **John Wiley & Sons**, Inc., 319-368, 2005.

HERRERO, E. *et al.* Redox control and oxidative stress in yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1780, 1217–1235, 2008.

HERMES-LIMA, M. Gas chromatography–Mass Spectroscopic analysis of Lawsonia inermis leaves. **Life Science Journal**, 7, 48–50, 2010.

HE, X.J.; FASSLER, J.S. Identification of novel YAP1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.58, 1454-67, 2005.

HILTUNEN, J.K.*et al.* The biochemistry of peroxisomal beta-oxidation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, 23, 2735–2764. 2003.

HSOUNA, B. A. *et al.* Antioxidant constituents from Lawsonia inermis leaves: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity, **Food Chemistry**, 125, 193–200, 2011.

HUESO-FALCÓN, I. *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of Naphthoquinone-Coumarin Conjugates as Topoisomerase II Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 27, 484-489, 2017.

INOUE, Y.*et al.* Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Biology Chemistry**, 274, 27002–27009, 1999.

IWAI, K., *et al.* Peroxiredoxin Ahp1 acts as a receptor for alkyl hydroperoxides to induced disulfid bond formation in yhe Cad 1 transcription fator. **Journal Biology Chemistry**, 285, 10597-10604, 2010.

JORDAO, A. K., *et al.* Lawsone in organic synthesis. **RSC Advances**. 5, p. 67909-67943, 2015.

JOHNSTON, M., CARLSON, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. In the molecular and cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2, 1991.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**, 1, 244-257, 2013.

KAYSER, O. *et al.* In vitro leishmanicidal activity of monomeric and dimeric Naphthoquinones. **Acta Tropica**, 76, 131-138, 2000.

KAPTEYN, J. C. *et al.* Altered extent of cross-linking of β 1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall β 1,3 glucan content. **Journal of Bacteriology**, 179, 6279-6284, 1997.

KAPPUS, H.; SIES, H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. **Experientia**, 37, 1233–1241, 1981.

KELLY, G. S. Clinical application of N-acetylcysteine. **Alternative medicine review**, 3, 114 – 127, 1998.

KLAUS, V.*et al.* 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in HaCaT human keratinocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 496, 93–100, 2010.

KLIS, F. M. *et al.* Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, 26, 239-256, 2002.

KLIS, F. M. *et al.* Review: cell wall assembly in yeast. **Yeast**, 10, 851- 869, 1994.

KLOTZ, *et al.* 1,4-Naphthoquinones: From Oxidative Damage to Cellular and Intercellular Signaling. **Molecules**, 19, 14902-14918, 2014.

KOLLE, S.N. *et al.* Assessment of combinations of antiandrogenic compounds vinclozolin and flutamide in a yeast based reporter assay, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 60, 373–380, 2011.

KRAELING, M.E., BRONAUGH, R.L, Jung, C.T. Absorption of lawsona through human skin. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, 26, 45–56, 2007.

KRAELING, M.E. *et al.* Absorption of lawsona through human skin. **Cutaneous and Ocular Toxicology**, 26, 45–56, 2007.

KRZEPILKO, A., *et al.* Ascorbate restores lifespan of superoxide-dismutase deficient yeast. **Free Radical Research**, 38, 1019–1024, 2004.

KUMAGAI, Y., *et al.* The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. **Annual Review Pharmacology Toxicology**, 52, 221–247, 2012.

KURTYKA, R. *et al.* Effects of juglone and lawsone on oxidative stress in maize coleoptile cells treated with IAA. **AOB PLANTS**, 8, 73, 2016.

KURTZMAN, C. P. Discussion of teleomorphic and anamorphic ascomycetous yeasts and a key to genera. **The yeasts, a taxonomic study**, 4, 111–121, 1997.

KUGE, S. *et al.* Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. **The EMBO Journal**, 7, 1710–1720, 1997.

LEE, J. *et al.* Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. The **Journal of Biology Chemistry**, 274, 16040–16046, 1999.

LESAGE. G.; BUSSEY, H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, 70, 317-343, 2006.

LEVIN, D. Cell Wall integrity Singnaling in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 69, 262-291, 2005.

LÓPEZ-LÓPEZ, L. I. *et al.* Ultrasonic and microwave assisted synthesis of nitrogen-containing derivatives of juglone as potential antibacterial agents. **Letters in Organic Chemistry**, 11, 573-82, 2014.

LUTHFUN, N. *et al.* Nazmun, Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and CNS depressant activities of methanolic extract of Lawsonia inermis barks in mice, **Avicenna Journal of Phytomedicine**, 4, 287–296, 2014.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14 ed. São Paulo: Artmed, 2016.

MAHAL, k. *et al.* Improved anticancer and antiparasitic activity of new lawsona Mannich bases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 126, 421-431, 2017.

MARTIN, S. G.; ARKOWITZ, R. A. Cell polarization in budding and fission yeasts. **FEMS Microbiology Reaserch**, 38, 228–253, 2014.

MASELLA, R. *et al.* Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. The **Journal of Nutritional Biochemistry**, 16, 577–86, 2005.

MIGDAL, C.; SERRES, M. Reactive oxygen species and oxidative stress. **Medicine Science**, 27, 405-412, 2011.

MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal Biology Chemistry**, 22, 6049-55, 1969.

NORTH, M.; VULPE, C.D. Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology, **International Journal of Molecular Science**, 11, 4796–4813, 2010.

MORADAS-FERREIRA P, et al. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. **Molecular Microbiology**, 19, 651-658, 1996.

MOUYNA, I. *et al.* Play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. **Journal Biology Chemistry**, 275, 14882–14889, 2000.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, 70, 461–477, 2007.

NISHIYAMA, M. F. et al. Brazilian green tea (*Camellia sinensis* var *assamica*): effect of infusion time, mode of packaging and preparation on the extraction efficiency of bioactive compounds and on the stability of the beverage. **Food Science and Technology**, 30, 191-196, 2010.

OSUMI, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, 29, 207-33, 1998.

PRADHAN, R. *et al.* From body art to anticancer activities: perspectives on medicinal properties of Henna. **Current Drug Targets**, 13, 1777-1798, 2012.

PRETORIUS L.S. Tailoring wine yeast for the new Millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, 6, p. 675-729, 2000.

RAFTOS, J.E. *et al.* Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes. **International Journal Biochemistry Cell of Biology**, 39, 1698–1706, 2007.

RAHMOUN, N.M.*et al.* Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. **Medicine Maladies Infectieuses**, 42, 270–275, 2012.

_____. Antifungal activity of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). **Pharmaceutical Biology**, 51, 131–135, 2013.

_____. Antimicrobial activities of the henna extract and some synthetic naphthoquinones derivatives. **American Journal of Medical and Biological Research**, 1, 16–22, 2013.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

BRAUER, M. J.*et al.* Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. **Molecular Biology of Cell**, 16, 2503-2517, 2005.

RAMOS-PÉREZ, C.*et al.* Yeast cytotoxic sensitivity to the antitumour agent b-lapachone depends mainly on oxidative stress and is largely independent of microtubule- or topoisomerase-mediated DNA. **Biochemical Pharmacology**, 92, 206–219, 2014.

REES, D. A., *et al.* Shapes and interactions of carbohydrate chains. **The Polysaccharides**, 1, 196-290, 1982.

ROOSEBOOM, M.*et al.* Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. **Pharmacology Review**, 56, 53–102, 2004.

SALUNKE-GAWALI, S. Metal complexes of hydroxynaphthoquinones: Lawsone, Bis-Lawsone, Lapachol, Plumbagin and Juglone. **Journal of Molecular Structure**, 1148, 435-458, 2017.

SANCHEZ-CALVO, J. M. *et al.* Synthesis, antibacterial and antifungal activities of naphthoquinone derivatives: a structure–activity relationship study. **Medicinal Chemistry Research**. 25, 1274–1285, 2016.

SANTOS, A. F.*et al.* Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4 naphthoquinones and derivatives. **International Journal Parasitology**, 30, 1199-1202, 2000.

SANTOS, E. V. M.*et al.* Quantitative structure-activity relationship in aziridiny-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations BY4741 the PM3 method. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 12, 87-93, 2004.

SCHERENS, B., GOFFEAU, A. The uses of genome-wide yeast mutant collections. **Genome Biology**, 5, p. 229, 2004.

SHAWN, J. A.*et al.* The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. **Journal of Cell Biology**, 114, 111-123, 1991.

SMITH, A. E.*et al.* The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97, 9871-9874, 2000.

SILVA, M. S. *et al.* Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, 13, p.193, 2000.

SIRIPONG, P. *et al.* Antitumor activity liposomal naphthoquinone esters isolated from a thai medicinal plant: *Rhinacanthus nasutus kurz*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 29, 2279-2283, 2006.

SEMWAL, R. B. *et al.* *Lawsonia inermis* L. (henna): Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. **Journal of Ethnopharmacology**, 155, 80–103, 2014.

SJODIN, K. *et al.* Metabolism of N-acetyl-Lcysteine. Some structural requirements for the deacetylation and consequences for the oral bioavailability. **Bio-chemistry Pharmacology**, 38, 3981–3985, 1989.

SUZUKI, M. *et al.* Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature Cell Biology**, 6, 861-871, 2004.

TACHIBANA, T. *et al.* Major Peroxiredoxin-induced activation of YAP1 transcription factor is mediated BY4741 reduction-sensitive disulfide Bonds and reveal a Low Level of transcription activation. **Journal of Biology Chemistry**, 284, 4464-4472, 2009.

TEMPLE, M. D. *et al.* Complex cellular responses to reactive oxygen species (Review). **Trends in Cell Biology**, 15, 319 – 225, 2005.

THOMSON, R. H. Benzoquinones. **Naturally Occurring Quinones**, 2, 93–94, 1971.

THOR, H. *et al.* The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) BY4741 isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. **Journal of Biology Chemistry**, 257, 12419–12425, 1982.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Tortora funke**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TUKAJ, Z., AKSMANN, A. Toxic effects of anthraquinone and phenanthrenequinone upon *Scenedesmus* strains (green algae) at low and elevated concentration of CO₂. **Chemosphere**, 66, p. 480, 2007.

VALDERRAMA, J. A. *et al.* Studies on quinones. Part 44: Novel angucyclinone N-heterocyclic analogues endowed with antitumoral activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 16, 10172-10181, 2008.

_____. Studies on quinones. Part 45: Novel 7-aminoisoquinoline-5,8-quinone derivatives with antitumoral properties on cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17, p. 2894-2901, 2009.

VALKO, M., *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, 160, p. 1-40, 2006.

_____. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Biochemistry & Cell Biology**, 39, 44-84 2007.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. *Saccharomyces Meyen ex Reess* (1870). The Yeasts, 50, 733-746, 2011.

WANG, S. *et al.* Lawsona suppresses azoxymethane mediated colon cancer in rats and reduces proliferation of DLD-1 cells via NF-kB pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 89, 152–161, 2017.

WELCH, J., *et al.* The CUP2 gene product regulates the expression of the CUP1 gene, coding for yeast metallothionein. **EMBO**, 8, p. 255-260, 1989.

YIN, Q.Y. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. **Journal of Biology Chemistry**, 280, 20894–20901, 2005.

ZHANG, D. X.; GUTTERMAN, D. D. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. **American Journal Physiology-Heart Circulatory Physiology**, 292, 2023-2031, 2007.

ZHANG, Q. *et al.* Balance of beneficial and deleterious health effects of quinones: a case study of the chemical properties of genistein and estrone quinones. **Journal of the American Chemical Society**, 131, 1067-76, 2009.

ZIOTNIK, H. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. **Journal of Bacteriology**, Washington, 159, p. 1018-1026, 1984.