

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DA GAILDH NA VIA DE BIOSÍNTESE DO
ÁCIDO ASCÓRBICO, NA PRODUÇÃO DE H₂O₂ E NOS DANOS OXIDATIVOS
EM MAMÃO 'GOLDEN'**

THAMIRIS FERNANDES DE OLIVEIRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
Fevereiro – 2018**

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DA GAILDH NA VIA DE BIOSÍNTESE DO
ÁCIDO ASCÓRBICO NA PRODUÇÃO DE H₂O₂ E NOS DANOS OXIDATIVOS
EM MAMÃO 'GOLDEN'**

THAMIRIS FERNANDES DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira (D. Sc., Biologia Vegetal)

CAMPOS DOS GOYTACASES – RJ
Fevereiro – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca do **CCH / UENF**

36/2018

048 Oliveira, Thamiris Fernandes de.

Influência da atividade da GalLDH na via de biossíntese do ácido ascórbico na produção de H₂O₂ e nos danos oxidativos em mamão 'Golden' / Thamiris Fernandes de Oliveira. – Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

68 f. : il.

Bibliografia: f. 48 – 57.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2018.

Orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira.

1. *Carica papaya* L.. 2. Peróxido de Hidrogênio. 3. Estresse Oxidativo. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 634.651

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DA GAILDH NA VIA DE BIOSÍNTESE
DO ÁCIDO ASCÓRBICO NA PRODUÇÃO DE H₂O₂ E NOS DANOS
OXIDATIVOS EM MAMÃO 'GOLDEN'

THAMIRIS FERNANDES DE OLIVEIRA

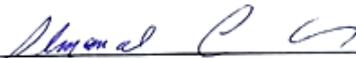
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2018.

Comissão Examinadora:



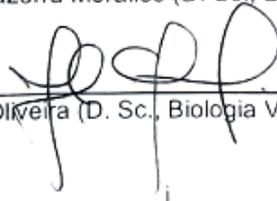
Aroldo Gomes Filho (D. Sc., Genética e Melhoramento de Plantas) – IFNMG -
Campus Januária



Alessandro Coutinho Ramos (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF



Luis Miguel Mazorra Moralles (D. Sc., Bioquímica) – UENF



Jurandi Gonçalves de Oliveira (D. Sc., Biologia Vegetal) – UENF (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e não permitir que desanimasse diante das dificuldades;

Agradeço aos meus amados pais, Donato e Geralda, que apesar de todas as dificuldades não mediram esforços para que esse sonho se realizasse. A vocês eu expressei meu maior agradecimento!

Ao meu irmão Gabriel pelo carinho e momentos de alegria;

A Daniel Bitencourt Malta, que sempre esteve ao meu lado durante esta caminhada apoiando e incentivando;

A todos os professores e em especial ao professor Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira pela orientação, compreensão, confiança e por transmitir seus conhecimentos ao longo desses dois anos;

Aos amigos do Laboratório da unidade de Bioquímica e Fisiologia Pós-colheita pela convivência agradável, em especial a Raissa, André, Barbara, Luana e Edinaldo pelo auxílio em muitos trabalhos;

À Dra. Gláucia Michelle Cosme Silva que sempre esteve ao meu lado ajudando nos momentos de adversidade, agradeço pela ajuda teórica e prática e pela amizade;

Ao Diederson Bortolini Santana pela disposição em me ajudar sempre que precisei e pela amizade;

A Aline Angélica Oliveira pelo companheirismo e amizade;

Ao Dr. Luís Miguel Mazorra Morales por transmitir seus conhecimentos;

À professora Dra. Claudete Santa Catarina pela concessão de equipamentos na etapa de avaliação em HPLC no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – LBCT;

Ao professor Dr. Vanildo Silveira pela colaboração na etapa de análise proteômica no Laboratório de Biotecnologia – LBT;

À Dra. Ellen de Moura Vale e ao Dr. Victor Paulo Mesquita Aragão pelo auxílio no manuseio de equipamentos;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização desse sonho;

A FAPERJ e ao CNPq pela concessão da bolsa;

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação. Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial e sua Função na Respiração.....	4
2.2. Geração de Espécies Reativas de Oxigênio e Mecanismos Antioxidantes	7
2.3. Biossíntese do Ácido Ascórbico.....	11
2.4. Atividade da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) e a Respiração.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL DE MÉTODOS.....	18
4.1. Obtenção e Padronização dos Frutos	18
4.2. Isolamento de Mitocôndrias	19
4.3. Atividade Respiratória em Mitocôndrias Purificadas	20
4.4. Influência da Presença de GalL na Capacidade das Vias Respiratórias em Mitocôndrias Purificadas.....	20
4.5. Determinação da Concentração de Proteínas Totais.....	21
4.6. Avaliação da Biossíntese de AA	21

4.6.1. Avaliação da Biossíntese e Acúmulo de AA em Função do Tempo.....	21
4.6.2. Avaliação da Biossíntese de AA em Função dos Tratamentos	22
4.7. Avaliação da Atividade da GalLDH.....	22
4.8. Quantificação da Produção de H ₂ O ₂	22
4.9. Avaliação da Atividade da Peroxidase (POD).....	23
4.10. Quantificação da Peroxidação Lipídica (MDA)	23
4.11. Quantificação da Oxidação de Proteínas	24
4.12. Análises Estatísticas.....	25
5. RESULTADOS	26
5.1. Padronização Inicial dos Frutos	26
5.2. Atividade Respiratória em Mitocôndrias Purificadas.....	27
5.3. Efeito do GalL na Capacidade das Vias Respiratórias em Mitocôndrias Purificadas	28
5.4. Biossíntese e Acúmulo de AA.....	29
5.4.1. Biossíntese e Acúmulo de AA em Mitocôndrias Purificadas	29
5.4.2. Efeito do Substrato GalL, H ₂ O ₂ e Inibidores Respiratórios no Acúmulo de AA em Mitocôndrias Purificadas	30
5.5. Atividade da Enzima GalLDH em Função da Presença de H ₂ O ₂ e dos Inibidores SHAM e DPI	31
5.6. Produção de H ₂ O ₂ em Função do Tempo de Incubação em Mitocôndrias Purificadas	33
5.7. Efeito da Presença do Substrato GalL e do H ₂ O ₂ na Atividade da Peroxidase (POD) Durante a Biossíntese de AA.....	34
5.8. Efeito do Substrato GalL e H ₂ O ₂ na Peroxidação Lipídica.....	35
5.9. Efeito do Substrato GalL, do H ₂ O ₂ e dos Inibidores da AOX e GalLDH na Oxidação de Proteínas Mitocondriais	36
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES.....	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

OLIVEIRA, Thamiris Fernandes de. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2018. Influência da atividade da GalLDH na via de biossíntese do ácido ascórbico, na produção de H₂O₂ e nos danos oxidativos em mamão 'Golden'. Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

O ácido ascórbico (AA) é um importante antioxidante presente nos vegetais. As espécies reativas de oxigênio (ERO) são inevitavelmente formadas pelo metabolismo aeróbico. Entretanto, quando há o acúmulo de ERO e os mecanismos de defesa antioxidantes não funcionam adequadamente ocorre o estresse oxidativo, resultando em diminuição da função mitocondrial e oxidação de lipídios, proteínas e até mesmo ácidos nucleicos. Há evidências de que durante a biossíntese do AA a enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH, EC 1.3.2.3) localizada em mitocôndrias de células vegetais, estaria produzindo peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi compreender o papel da GalLDH na produção de H₂O₂ e no dano oxidativo em frutos de mamão 'Golden'. Os frutos foram padronizados pela coloração da casca a partir do ângulo *hue* e pela firmeza da polpa. Foi determinada a influência da atividade da GalLDH nas vias oxidases terminais durante a respiração, no acúmulo de AA e sua interação com a via oxidase alternativa (AOX) e com a produção de H₂O₂ em mitocôndrias purificadas da polpa dos frutos. Também foi determinada a influência da biossíntese do AA na

oxidação de proteínas mitocondriais, na atividade da peroxidase (POD) e na peroxidação lipídica (medida pela formação de MDA) em extrato de polpa de mamão. Os resultados mostraram que na presença de GalL como substrato respiratório, ao adicionar o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e azida, respectivamente, inibidores da AOX e do citocromo c oxidase (COX), não foi observada diferença no consumo de O_2 . Por outro lado, ao adicionar cloreto de difenileno iodônio (DPI), um bloqueador de flavoenzimas, foi observado um decréscimo significativo na taxa respiratória das mitocôndrias isoladas. O acúmulo de AA foi maior em mitocôndrias tratadas com GalL e menor na presença de H_2O_2 , assim como dos inibidores DPI e SHAM, com destaque para a redução mais expressiva ao utilizar SHAM. A atividade da GalLDH foi quantificada por meio da redução do citocromo c, sendo verificado na presença de GalL um estímulo em 100% na atividade da enzima, enquanto que na presença de SHAM houve redução de 97% na atividade GalLDH. A produção de H_2O_2 foi analisada via fluorescência em mitocôndrias tratadas e não tratadas com GalL, sendo observado um aumento progressivo da produção de H_2O_2 em função do substrato GalL. A adição de GalL foi responsável pelo aumento na atividade da peroxidase (POD) e na peroxidação lipídica que foi avaliada a partir da produção de malondialdeído (MDA). Verificou-se também que a adição de GalL aumentou a quantidade de proteínas mitocondriais oxidadas, enquanto que a adição de GalL combinada com SHAM reduziu essa quantidade. De modo geral os resultados demonstraram que durante a biossíntese de AA, a atividade GalLDH é dependente da atividade AOX. Paralelamente à produção de AA, a atividade GalLDH está relacionada ao incremento na produção de ERO com aumento na peroxidação lipídica e oxidação de proteínas. O bloqueio da via AOX resultou em redução na quantidade de proteínas oxidadas indicando uma estreita ligação entre a atividade AOX, a GalLDH e a produção de H_2O_2 . Este trabalho apresenta resultados inéditos em relação à atividade da GalLDH influenciando no transporte de elétrons e na produção de H_2O_2 , que resultou em estresse oxidativo afetando o metabolismo mitocondrial. Outros estudos devem ser feitos para verificar o efeito da oxidação das proteínas assim como a caracterização funcional dessas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thamiris Fernandes de. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2018. Influence of GalLDH activity on ascorbic acid biosynthesis pathway, H₂O₂ production and oxidative damage in 'Golden' papaya. Advisor: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Ascorbic acid (AA) is an important antioxidant in plants. Reactive oxygen species (ROS) are inevitably formed by aerobic metabolism. However, when there is accumulation of ROS and antioxidant defense mechanisms do not function properly oxidative stress occurs, resulting in decreased mitochondrial function and oxidation of lipids, proteins and even nucleic acids. There is evidence that during the synthesis of AA the enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH, EC 1.3.2.3) located in plant cell mitochondria, would be producing hydrogen peroxide (H₂O₂). In view of the above, the objective of this work was to understand the role of GalLDH in H₂O₂ production and oxidative damage in 'Golden' papaya fruits. The fruits were standardized by the coloring of the shell from the hue angle and by the firmness of the pulp. The influence of GalLDH activity on the terminal oxidase pathways during respiration, on AA accumulation and its interaction with the alternative oxidase pathway (AOX) and on the production of H₂O₂ in purified mitochondria of the fruit pulp were determined. The influence of AA biosynthesis on mitochondrial protein oxidation, peroxidase activity (POD) and lipid peroxidation (measured by MDA formation) in papaya pulp extract was also determined. The results showed that in the presence of GalL as a respiratory substrate, by adding

salicylhydroxamic acid (SHAM) and azide, respectively, AOX and cytochrome c oxidase (COX) blockers, no difference was observed in O_2 consumption. On the other hand, when adding diphenylene iodonium chloride (DPI), a flavoenzyme blocker, a significant decrease in the respiratory rate of isolated mitochondria was observed. The AA accumulation was higher in GalL-treated mitochondria and lower in the presence of H_2O_2 , as well as DPI and SHAM inhibitors, especially the most significant reduction when using SHAM. The activity of GalLDH was quantified by the reduction of cytochrome c and a 100% stimulus in enzyme activity was verified in the presence of GalL, whereas in the presence of SHAM there was a 97% reduction in GalLDH activity. The H_2O_2 production was analyzed via fluorescence in treated and non-GalL treated mitochondria and a progressive increase of H_2O_2 production was observed as a function of the GalL substrate. Addition of GalL was responsible for the increase in peroxidase activity (POD) and lipid peroxidation which was evaluated from the production of malondialdehyde (MDA). It was also found that the addition of GalL increased the amount of oxidized mitochondrial proteins, while the addition of GalL combined with SHAM reduced that amount. In general, the results showed that during the synthesis of AA, there was an increase in ERO production and that when blocking the AOX pathway there was a reduction in the amount of oxidized proteins indicating a close link between GalLDH activity and H_2O_2 production. This work presents unpublished results in relation to the activity of GalLDH influencing the electron transport and H_2O_2 production, which resulted in oxidative stress affecting mitochondrial metabolism. Other studies should be done to verify the effect of protein oxidation as well as the functional characterization of proteins.

1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) ($C_6H_8O_6$), também conhecido como vitamina C (Barata-Soares et al., 2004) é uma vitamina hidrossolúvel que apresenta função antioxidante (Leferink et al., 2009b), ou seja, ao reagir contra os radicais livres protege a célula de danos oxidativos (Couto e Canniatti-Brazaca, 2010; Sharma et al., 2012). O AA também desempenha papel importante em diversos processos fisiológicos, tal como no crescimento e na diferenciação (Foyer e Noctor 2003; Sharma et al., 2012).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham duplo papel na biologia vegetal. Estas são necessárias para reações de sinalização em resposta a estresse biótico e abiótico (Pauly et al., 2006), mas também são subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbio, que em concentrações elevadas podem causar modificações irreversíveis, principalmente, na estrutura de proteínas e lipídios afetando a atividade de enzimas e causando danos em membranas (Cakmak e Horst, 1991; Levine et al., 2000). De modo geral, a consequência disso é a destruição oxidativa da célula em um processo denominado estresse oxidativo (Mittler, 2017).

As mitocôndrias são organelas altamente susceptíveis a danos oxidativos (Pinto et al., 2003) e ao mesmo tempo são as principais geradoras de ERO durante a respiração celular (Sinha et al., 2013). As ERO são formadas pela redução parcial do oxigênio principalmente nos complexos I, II e III da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTEm) (Liu et al., 2002; Turrens, 2003; Kolossov et al., 2015) e podem ser removidas por mecanismos enzimáticos e não

enzimáticos (Pinto et al., 2003; Sharma et al., 2012). Esse processo de formação e remoção de ERO ocorre constantemente na célula para evitar que seja desencadeado o estresse oxidativo (Mittler, 2017).

A biossíntese de AA está associada a CTE_m, principalmente pela localização da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) e sua função na montagem do complexo I (Pineau et al., 2008). Durante a biossíntese do AA, a GalLDH catalisa a reação de oxidação do L-galactono-1,4-lactona (GalL), sendo os elétrons do GalL doados diretamente para o citocromo c, localizado na membrana interna da mitocôndria. O citocromo c, por sua vez, doa elétrons para o citocromo c oxidase (COX), reduzindo o O₂ a H₂O (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003). Em condições de estresse ocorre o aumento na geração de ERO, que promove a maior participação da oxidase alternativa (AOX) na atividade respiratória e conseqüentemente aumenta a biossíntese de AA (Bartoli et al., 2006).

Millar et al. (2003) demonstraram que a respiração pode controlar a síntese de AA nas plantas. A evidência deste controle está relacionada com a localização da GalLDH próxima ao complexo I da CTE_m. Assim, é necessário um fluxo de elétrons pelo complexo I da CTE_m para que a biossíntese de AA ocorra de forma plena.

Trabalhos recentes realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram em mitocôndrias isoladas de mamão, tomate e morango que durante a biossíntese de AA o consumo de oxigênio, iniciado pela oxidação do GalL, não era afetado pela inibição da AOX e COX. Fato esse surpreendente, levantou a hipótese, portanto do que seria então o responsável pela manutenção do consumo de O₂ quando AOX e COX estão inibidas? Ou ainda, por que não haveria inibição das vias oxidases terminais (AOX e COX) durante a síntese de AA? Na tentativa de explicar tais evidências foram realizados ensaios (dados não publicados) que demonstraram que a atividade da GalLDH estava utilizando o oxigênio molecular para produzir H₂O₂ (Silva, 2016).

A produção de ERO ocorre inevitavelmente durante a respiração aeróbica (Mittler et al., 2002) e pode ser utilizado como mecanismo de defesa às variações ambientais (Choudhury et al., 2013). As plantas podem utilizar, por exemplo, o H₂O₂ para sinalizar diversos processos metabólicos (Soares e Machado, 2007). Por outro lado, os mecanismos de defesa antioxidante nas plantas agem a favor

da célula, para combater o estresse oxidativo. Assim sendo, o ponto principal a ser demonstrado neste trabalho, seria entender melhor a relação entre a atividade GalLDH, responsável pela biossíntese de AA e a produção de H_2O_2 inerente desse processo (biossíntese de AA). Qual o sentido da biossíntese de AA contribuir com o estresse oxidativo (uma vez que gera H_2O_2), tendo em vista que este é um dos principais antioxidantes presentes nos vegetais e componente do sistema de defesa da planta contra o excesso de H_2O_2 e outras ERO.

Leferink et al. (2008) isolaram a GalLDH de *A. thaliana* e observaram que apesar da enzima possuir baixa afinidade pelo oxigênio molecular, a reação com o oxigênio ocorre lentamente, demonstrando que pode existir uma pequena afinidade da GalLDH com oxigênio molecular.

Diante disso, este estudo vem demonstrar que, durante a atividade GalLDH pode estar ocorrendo a produção de H_2O_2 . A alta concentração de H_2O_2 no meio intracelular estaria supostamente interferindo nos processos de regulação entre a formação e a remoção de ERO que mantém a célula em constante equilíbrio para evitar que ocorram danos oxidativos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial e sua Função na Respiração

A respiração é um processo comum a todos os organismos aeróbicos, onde a molécula de adenosina trifosfato (ATP) é gerada; sua função é a conservação e disponibilização de energia na célula (Millar et al., 2011). Taiz e Zeiger (2013) definiram como um processo biológico, no qual compostos orgânicos reduzidos são mobilizados e em seguida oxidados de maneira controlada.

De acordo com Taiz e Zeiger (2013), a respiração inicia-se com a glicólise, convertendo a glicose em piruvato no citosol que, por sua vez, é completamente oxidado dentro da matriz mitocondrial, via ciclo dos ácidos tricarboxílicos, gerando NADH e FADH₂ que são oxidados na CTE_m. Os elétrons são transferidos ao longo da CTE_m, onde há liberação de energia para a síntese de ATP e a redução do O₂ a H₂O (Millar et al., 2011).

A mitocôndria possui envoltório formado por duas membranas de estruturas e funções distintas. Estas membranas delimitam o espaço intermembranar, separando a membrana interna da externa e um segundo espaço, gerado pela membrana interna, que delimita a matriz mitocondrial. A membrana interna possui invaginações que geram as cristas mitocondriais, onde estão localizados os componentes da cadeia respiratória responsáveis pela síntese de ATP (Molinari et al., 2009).

A CTE_m é composta pelo complexo I (NADH-ubiquinona oxidorreductase), complexo II (succinato-ubiquinona oxidorreductase), complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductase) e o complexo IV (citocromo c oxidase - COX), que interagem através da ubiquinona (carreador de prótons e elétrons - UQ) e a proteína citocromo c (transfere elétrons entre os complexos III e IV) (Ferreira et al., 2008; Taiz e Zeiger, 2013). O complexo V (ATP sintase) que não faz parte da CTE_m catalisa a etapa final da fosforilação oxidativa (Millar et al., 2011). Esquema representativo da CTE_m, na Figura 1.

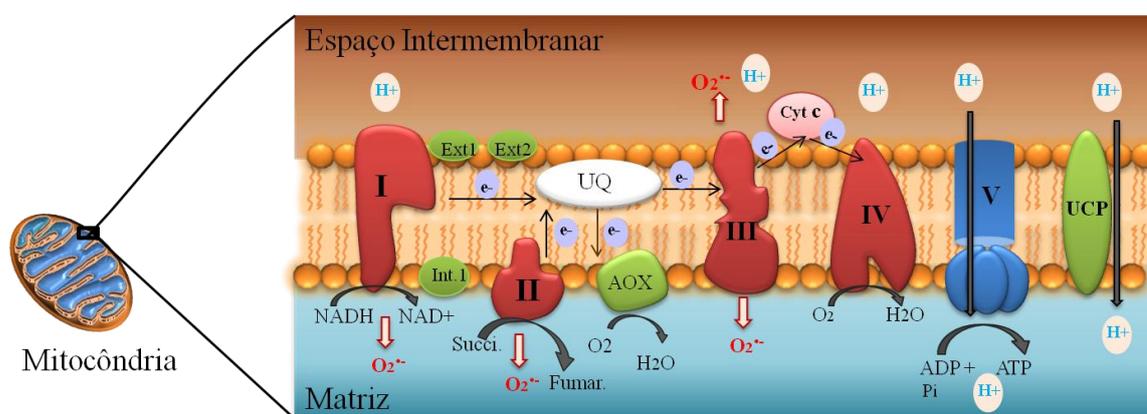


Figura 1: Esquema representativo da cadeia de transporte de elétrons, incluindo vias principais e alternativas. Transporte de elétrons pelas vias principais (complexos I, II, III e IV); bombeamento de prótons pelos complexos I, III e IV e formação de ERO pelos complexos I, II e III. Enzimas alternativas NADH desidrogenase externa (Ext.1 e Ext. 2) e interna (Int.1). AOX: oxidase alternativa e a Ucp: proteína desacopladora. Adaptado de Taiz e Zeiger (2013).

O transporte de prótons na membrana interna da mitocôndria cria o gradiente eletroquímico responsável pela síntese de ATP, enquanto o fluxo de elétrons entre os complexos tem como destino o oxigênio que é o aceptor final de elétrons (Blokhia e Fagerstedt, 2010).

A CTE_m possui vias alternativas para o transporte de elétrons, tais como, as NADH desidrogenases externas (exclusiva de plantas) e internas, a AOX (Joseph-Horne et al., 2001), além da Ucp.

Ao desfazer o gradiente eletroquímico, a Ucp influencia positivamente no transporte de elétrons. Os prótons são transportados do espaço intermembranar para a matriz, o que leva ao baixo rendimento energético da respiração e perda de energia na forma de calor (Echtay e Brand, 2007; Vanlerberghe et al., 2009).

Echtay et al. (2002) avaliaram a interação da Ucp com o radical ânion superóxido e observaram que este mecanismo diminuiu a concentração de ERO em mitocôndrias, assim como diminuiu o bombeamento de H^+ com diminuição da atividade ATP sintase.

A AOX é uma oxidase terminal que não conserva energia na CTE_m (Vanlerberghe et al., 2013). Esta enzima é insensível ao cianeto e à antimicina A, porém pode ser inibida por ácido salicílicohidroxâmico (SHAM). A AOX recebe elétrons diretamente do *pool* de ubiquinona (Millar et al., 2011) e catalisa a redução do O_2 a H_2O (Lorence et al., 2004) desviando o fluxo de elétrons dos complexos III e IV (Mittler et al., 2004). Ao desviar o fluxo de elétrons, a AOX contribui evitando o sobrefluxo de energia e atua na redução da formação de ERO na CTE_m (Vanlerberghe et al., 2009).

A influência da AOX na redução de ERO produzidas durante o transporte de elétrons em células de tabaco com níveis alterados de AOX foi testada por Maxwell et al. (1999). Foi verificado que, a supressão da AOX resultou em aumento do nível de ERO em relação às células do tipo selvagem, ao passo que, a expressão da enzima resultou em células com níveis mais baixos de ERO. Os autores sugeriram que o aumento da respiração pela via alternativa é vital para manter a função mitocondrial e prevenir a morte celular.

A atividade da AOX é importante na tolerância ao estresse biótico e abiótico, por exemplo, o déficit hídrico (Vanlerberghe et al., 2013). Bartoli et al. (2005) estudaram o papel da AOX em plantas de trigo que foram submetidas ao estresse hídrico. Os autores observaram que as folhas submetidas ao estresse apresentaram aumento da proteína AOX na forma reduzida e aumento na taxa respiratória. Segundo Vanlerberghe et al. (2013), a atividade da AOX pode afetar o nível de moléculas sinalizadoras, proporcionando uma ligação entre a função mitocondrial, a transdução de sinal e a aclimação ao estresse.

De acordo com Van-Aken et al. (2009), a AOX não é apenas parte da resposta ao estresse nas plantas, mas apresenta função principal na regulação de sinais que induzem a resposta. Os autores sugeriram que a expressão da AOX é desencadeada por uma variedade de sinais e também atua na regulação de sinais que induzem a morte celular programada.

2.2. Geração de Espécies Reativas de Oxigênio e Mecanismos Antioxidantes

As ERO, de modo geral, são formadas a partir da redução parcial do oxigênio molecular, que é fundamental no processo de respiração celular em mitocôndrias (Turrens, 2003). As principais ERO incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Turrens, 2003; Blokhia e Fagerstedt, 2010; Sharma et al., 2012). A formação dos radicais livres em condições normais é inevitável, pois eles são sintetizados como subproduto do metabolismo aeróbico em vários complexos na CTE_m (Mittler, 2002). A formação do $O_2^{\cdot -}$ se dá através do escape de elétrons pelos centros redox da CTE_m, sendo este convertido a H_2O_2 ou podendo reagir com o H_2O_2 produzindo o radical OH^{\cdot} (Turrens, 2003).

Durante os processos metabólicos as plantas produzem ERO, que estimulam respostas fisiológicas como mecanismo de proteção antioxidante (Espinosa-Diez et al., 2015). Dentre as ERO, o H_2O_2 representa um importante mensageiro secundário envolvido na transdução de sinais metabólicos (Choudhury et al., 2013) e atuando na regulação de processos de desenvolvimento e sobrevivência das plantas em condições adversas (Choudhury et al., 2013).

Pastore et al. (2007) demonstraram em mitocôndrias de trigo, que o aumento na produção de ERO sinaliza para os sistemas de dissipação de energia, por exemplo, a AOX, que reduz a produção de ERO. Dessa forma, o H_2O_2 atua na regulação de processos de sobrevivência das plantas (Choudhury et al., 2013), pois em um nível mais baixo, desencadeia uma cascata de reações que promove a defesa antioxidante (Gonzalez-Agulilar et al., 2010).

A importância da produção de ERO no desenvolvimento da planta foi estudada por Potocky et al. (2007) ao cultivarem tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* L.. Estes autores verificaram que ao incubar culturas do tubo polínico em meio simples de polietileno glicol (PEG) contendo tanto superóxido dismutase quanto a catalase, que são enzimas antioxidantes responsáveis pela remoção de ERO, houve a inibição do crescimento do tubo polínico. Concluindo que a produção de ERO é essencial para o desenvolvimento do tubo polínico da planta de tabaco (Potocky et al., 2007).

As ERO podem ser produzidas em mitocôndrias (Sinha et al., 2013), cloroplastos, peroxissomos (Foyer e Noctor, 2003), apoplastos (Cona et al., 2006), membrana plasmática (Heyno et al., 2011) e retículo endoplasmático (Espinosa-Diez et al., 2015). No entanto, a cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte intracelular de ERO (Sinha et al., 2013). Situações de estresse podem afetar o potencial de membrana (Dlasková et al., 2010) e resultar na inibição ou modificação dos componentes da CTE_m (complexos I, II, III e IV) (Blokha e Fagerstedt, 2010). Com isto, pode haver a redução na atividade dos transportadores de elétrons, com consequente formação de ERO pelos complexos I e III (Turrens, 2003), além do transporte reverso de elétrons no complexo II (Liu et al., 2002).

Liu et al. (2002) comprovaram que as ERO são geradas pelo complexo II através do transporte reverso de elétrons e sugeriram que o grupo mononucleótido de flavina (FMN) do complexo I limita a geração destas ERO nas mitocôndrias. Ao isolar mitocôndrias de células de ratos, Clarke e Porter (2013) destacaram que as ERO são produzidas no complexo I independente da presença de rotenona e concluíram que o transporte reverso de elétrons ocorre na ausência deste inibidor do complexo I. A inibição do complexo I e III evidenciou que o complexo II é um sítio gerador de altas taxas de superóxido e peróxido de hidrogênio (Quinlan et al., 2012). Huang e Liu (2014) investigaram o papel da CTE_m como fonte potencial de ERO e observaram que ao inibir o complexo III, com antimicina A, houve redução na produção de ERO, indicando que o complexo III é um local gerador de ERO.

Para regular os níveis de ERO e proteger as células de danos, as mitocôndrias possuem defesas, tais como a AOX, a Ucp (Foyer e Noctor 2003; Møller e Kristensen, 2004; Blokha e Fagerstedt 2010) e os mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Pinto et al., 2003; Sharma et al., 2012).

As ERO produzidas em mitocôndrias são eliminadas por diversas enzimas. A exemplo da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), que converte $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 por ação da enzima Mn-SOD (Zwacka et al., 1998). O H_2O_2 por sua vez, pode ser convertido à água pela catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e pela glutatona peroxidase (GPx) (Pinto et al., 2003; Orrenius et al., 2007, Bolisetty e Jaimes, 2013; Ribas et al., 2014). A GPx ao reduzir o H_2O_2 a água converte a

glutationa reduzida (GSH) em glutaciona oxidada (GSSG) (Espinosa-Diez et al., 2015).

A ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) e a peroxirredoxinas (PrX) também atuam como enzimas antioxidantes, pois reduzem peróxidos. A remoção do H_2O_2 por peroxidases requer uma pequena molécula redutora para agir como um cofator de regeneração (Barbosa et al., 2014). O AA é utilizado como um redutor para a remoção do H_2O_2 pela APX (Pinto et al., 2003) e atua no ciclo ascorbato-glutationa, sendo uma das enzimas antioxidantes amplamente distribuídas em células vegetais, apresentando maior afinidade pelo H_2O_2 do que a CAT (Sharma et al., 2012; Barbosa et al., 2014). As PrX são tiol-peroxidases que catalisam a desintoxicação do H_2O_2 e outros peróxidos (Barbosa et al., 2014).

As peroxidases incluem um grupo de enzimas (POD, EC 1.11.1.7) capazes de catalisar um número grande de reações oxidativas em plantas e utilizam o H_2O_2 como molécula aceptora de elétrons, ou em alguns casos, o oxigênio como acceptor de hidrogênio (Rossi et al., 1997; Freitas et al., 2008). Sua atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse oxidativo (Barbosa et al., 2014). A remoção de H_2O_2 por estes mecanismos enzimáticos é de suma importância, uma vez que o peróxido pode dar origem a outras ERO ainda mais reativas (Ronsein et al., 2006).

Dentre os mecanismos não enzimáticos, incluem-se o AA e a glutaciona (Mittler et al., 2004; Leferink et al., 2009b; Ribas et al., 2014). O AA por intermédio de reações enzimáticas e não enzimáticas suprime os efeitos dos danos da presença de radicais livres nas células, reduzindo o O_2^{\bullet} a H_2O (Sharma et al., 2012). Juntamente com a glutaciona, o AA participa do ciclo do ascorbato-glutationa (Espinosa-Diez et al., 2015) e atua na manutenção do balanço redox e na preservação da integridade de proteínas e lipídios (Circu e Aw, 2010).

A glutaciona é considerada um importante mecanismo de defesa antioxidante (Zeevalk et al., 2007; Ribas et al., 2014). A redução do seu nível na célula contribui para que haja danos oxidativos provocados pelas ERO (Zeevalk et al., 2007). Após reagir com as ERO, a GSH é oxidada formando GSSG (Apel e Hirt, 2004); a conversão da GSSG para GSH utiliza NADPH sendo catalisada pela enzima glutaciona redutase (GR), que mantém o equilíbrio entre os níveis GSH/GSSG na célula (Espinosa-Diez et al., 2015).

A razão GSH/GSSG define o estado redox da célula (Ghezzi e Bonetto, 2003) e as alterações no estado redox geram o estresse oxidativo e conseqüentemente a produção de ERO que pode ser eliminada pelo ciclo ascorbato glutationa ao regenerar o AA (Apel e Hirt, 2004; Lorence et al., 2004).

O mamão é considerado um fruto de padrão respiratório climatérico, o aumento na taxa respiratória durante o amadurecimento (Souza et al., 2014), bem como injúrias provocadas pelo frio podem intensificar a produção de ERO (Mittler, 2002). Como resultado, podem ocorrer alterações na fluidez da membrana (Sinha et al., 2013), eliminação ou acumulação de proteínas oxidadas nas células (Ghezzi e Bonetto, 2003), redução ou inativação de enzimas antioxidantes (Mittler, 2002), podendo ainda provocar danos ao DNA (Espinosa-Diez et al., 2015) e a peroxidação lipídica (Sweetlove et al., 2002). Este desequilíbrio entre a formação de ERO e a defesa antioxidante resulta em estresse oxidativo que provoca perdas significativas na qualidade do fruto.

A peroxidação lipídica é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, podendo ser mensurada por um dos produtos resultantes, principalmente, da peroxidação de ácidos graxos insaturados das membranas (Lima e Abdalla, 2001; Taulavuori et al., 2001). Um dos testes mais utilizados é a mensuração da formação do malondialdeído (MDA) pela reação deste com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Cakmak e Horst, 1991). De outro modo, as modificações oxidativas em proteínas, podem ser quantificadas através da carbonilação proteica (Ghezzi e Bonetto, 2003).

A formação de grupos carbonila (aldeídos e cetonas) é considerada um indicador da modificação oxidativa na proteína, que pode ser detectado por meio da reação com o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) obtendo seu correspondente, 2,4-dinitrofenilhidrazona (Levine et al., 2000; Hawkins et al., 2009).

Camejo et al. (2015) estudaram o padrão de proteínas mitocondriais modificadas por carbonilação em frutos de pimentão em dois estágios de maturação (verde e vermelho). Segundo estes autores, a maturação dos frutos intensifica a ocorrência de processos oxidativos, que são responsáveis pela alteração no metabolismo celular com aumento na susceptibilidade das proteínas à carbonilação.

A oxidação por carbonilação de proteínas da CTE_m, como, por exemplo, a ATP sintase, pode provocar mudanças no estado energético da mitocôndria,

regulação da transferência de elétrons e acumulação de $O_2^{\cdot -}$ na CTE_m (Camejo et al., 2015).

2.3. Biossíntese do Ácido Ascórbico

A vitamina C é o nome dado ao AA com atividade biológica. Sua fórmula química é: $C_6H_8O_6$ (Barata-Soares et al., 2004; Spínola et al., 2013). Este composto é encontrado naturalmente na sua forma reduzida, como L-AA, ou na forma oxidada, como ácido dehidroascórbico (DHAA) (Borsook et al., 1937) (Figura 2). A primeira etapa da sua oxidação é facilmente reversível; na maioria dos vegetais frescos é encontrado em sua forma reduzida, i.e. a forma ativa, podendo ser rapidamente decomposto (forma oxidada) por altas temperaturas (Fiorucci, 2003).

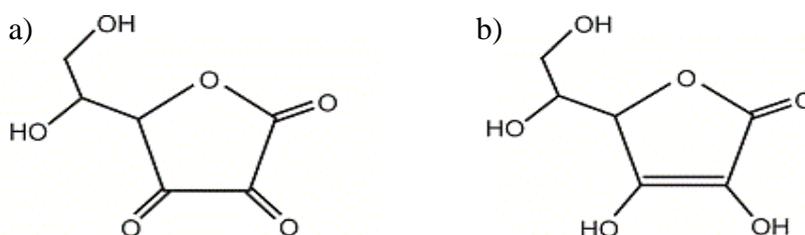


Figura 2: Estrutura molecular do ácido dehidroascórbico (DHAA) (a) e ácido L-ascórbico (L-AA) (b). Fonte: Spínola et al. (2013).

A vitamina C foi descoberta através de estudos que visavam identificar uma substância presente em frutas e verduras que evitasse o escorbuto (Dantas et al., 2012). O escorbuto foi uma doença muito comum entre povos do Norte Europeu durante a idade média que congelavam seus alimentos para consumirem em períodos de inverno. Essa vitamina pode ser decomposta por enzimas específicas presentes no próprio vegetal no qual, mesmo após o congelamento continuam atuantes nos processos oxidativos. Dentre a população geral, a enfermidade era mais comum entre os marinheiros, já que esses não dispunham

de frutas ou verduras frescas para sua alimentação durante as longas navegações (Fiorucci, 2003).

O AA é um antioxidante multifuncional abundante nos vegetais (Leferink et al., 2009b), considerado cofator enzimático e um dos componentes principais de regulação do estado redox das células (Schertl et al., 2012). Possui baixo peso molecular e protege os vegetais contra o estresse oxidativo provocado por ERO, formados durante o metabolismo fotossintético e respiratório (Pinto et al., 2003; Barata-Soares et al., 2004). Em estudo sobre produção de AA em tubérculos de batata, Upadhyaya et al. (2009) relataram que o maior acúmulo de AA promoveu maior tolerância a diferentes estresses bióticos e abióticos no meio celular.

Segundo Aboobucker e Lorence (2016), há evidências de pelo menos quatro vias de biossíntese de AA em plantas; os principais precursores são o D-manose (Wheeler et al., 1998), o L-gulose (Wolucka e Montagus, 2003), o D-galacturônico (Agius et al., 2003) e o mio-inositol (Lorence et al., 2004) (Figura 3).

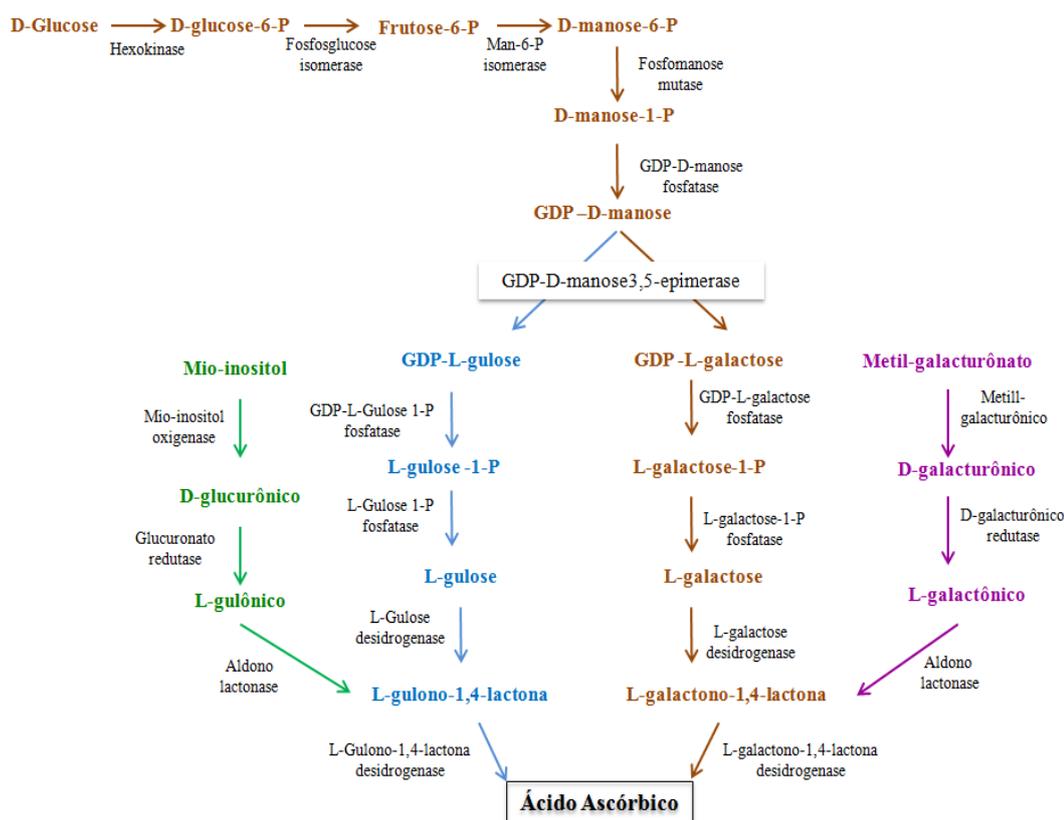


Figura 3: Esquema representativo das principais rotas de biossíntese de ácido ascórbico. Fonte: Venkatesh e Park (2014).

A via de biossíntese proposta por Smirnoff e Wheeler envolve o GDP-D-manose, GDP-L-galactose, L-galactose (GAL) e GalL (oxidado pela enzima

mitocondrial, GalLDH) (Wheeler et al., 1998). Segundo a via 'Smirnoff-Wheeler' a GDP-D-manose-3,5-epimerase (GMPase) catalisa o passo inicial (Tabata et al., 2002) e a GalLDH catalisa a etapa final para biossíntese do AA (Leferink et al., 2008). A eficácia dos precursores, GAL e GalL, foi relatada por Barata-Soares et al. (2004), que verificaram a participação da GAL, da D-manose e da D-glucose-1P na biossíntese do AA em plantas.

Wolucka e Montagus (2003) demonstraram que o GDP-D-manose é um intermediário, que é transformado pela enzima GDP-D-manose-3,5-epimerase e catalisa a formação de GDP-L-galactose e GDP-L-gulose.

Tabata et al. (2002) verificaram que a expressão de mRNAs de GalLDH e GMPase em células isoladas de tabaco foi suprimida ao adicionar o AA ao meio; sugerindo que a biossíntese dessas enzimas pode ser regulada pela concentração do AA. Wolucka e Montagus (2003) observaram a inibição da via biossintética do AA, pelo próprio AA, no âmbito da GMPase através do mecanismo *feedback*. De acordo com Leferink et al. (2009b), a GalLDH de *Arabidopsis* pode ser facilmente inativada por agentes modificadores de sítios tiol, assim como por H₂O₂.

O AA também pode ser sintetizado a partir do ácido D-galacturônico, um precursor metabólico do GalL. Agius et al. (2003) evidenciaram que a biossíntese do AA em frutos de morango, ocorre através da redução do ácido D-galacturônico para o ácido L-galactônico pela enzima ácido galacturônico redutase (GalUR). O L-galactônico posteriormente é convertido em GalL pela oxidação da aldono lactonase. Em estudo sobre a produção de AA, Upadhyaya et al. (2009) desenvolveram plantas de batata transgênicas que sobre expressam a enzima GalUR. As plantas foram desenvolvidas por meio da integração da GalUR presente em morango sob controle do promotor CaMV 35S, mediada por *Agrobacterium tumefaciens* estirpe EHA 105. Os autores concluíram que a sobre expressão da atividade da enzima GalUR aumentou proporcionalmente o nível de AA nos tubérculos transgênicos, o que conferiu maior tolerância ao estresse biótico e abiótico em relação às plantas não transgênicas.

Foram apresentadas por Lorence et al. (2004) evidências bioquímicas e moleculares para a biossíntese de AA em plantas pelo precursor mio-inositol através da identificação do gene da mio-inositol oxigenase (*MIOX*) no cromossomo 4 do ecotipo de *Arabidopsis columbia*. A confirmação da sua

expressão ocorreu em tecido de flores e folhas de *Arabidopsis* do tipo selvagem, apresentando concentração elevada de AA e indicando que o mio-inositol seria o precursor do AA.

2.4. Atividade da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) e a Respiração

A GalLDH é uma flavoenzima que catalisa a etapa final da biossíntese de AA, utilizando como substrato para esta reação o GalL que é oxidado, doando elétrons para o citocromo c (Bartoli et al., 2000; Leferink et al., 2008) (Figura 4).

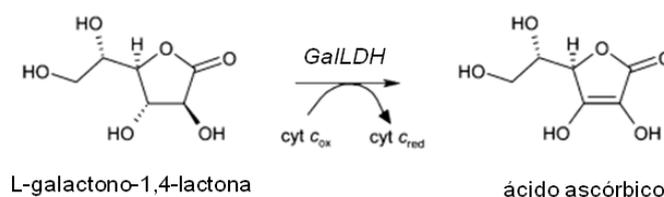


Figura 4: Conversão de L-galactono-1,4-lactona em ácido ascórbico pela enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase com participação do citocromo c. Fonte: Leferink et al., 2009b.

A GalLDH é uma aldonolactona oxidoredutase que pertence ao grupo vanilil-álcool oxidase (VAO), uma família de flavoproteínas (Fraaije et al., 1998). A GalLDH foi caracterizada por Østergaard et al. (1997), a partir do extrato mitocondrial de couve-flor, possuindo pH ótimo entre 8,0 e 8,5 e massa molecular de 56 kDa. Em 1998, esta enzima foi purificada a partir de mitocôndrias de batata doce; os resultados indicaram a presença de flavina como grupo prostético, associado não covalentemente à enzima e a presença de grupo sulfidrila no sítio catalítico (Imai et al., 1998).

A GalLDH possui baixa afinidade pelo oxigênio molecular. Ao estudar sobre determinantes moleculares da GalLDH em *A. thaliana*, Leferink et al. (2009a) revelaram que uma boa parte das oxidases da família VAO contém glicina ou prolina em uma posição estruturalmente conservada pelo átomo de C4a do anel de isoaloxazina da flavina. Enquanto que a GalLDH e outras desidrogenases possuem alanina, treonina ou isoleucina nessa posição. Os autores abordaram o papel do resíduo correspondente em GalLDH na reação da

Alanina (Ala-113) com o oxigênio molecular e caracterizaram uma variante da GalLDH capaz de utilizar o oxigênio como aceptor de elétrons, enquanto mantém a atividade redutase do citocromo c; mostrando pela primeira vez que é possível converter uma flavoproteína desidrogenase em uma oxidase (Leferink et al., 2009a).

A porção ativa da GalLDH está voltada para o espaço intermembranar da membrana interna de mitocôndrias (Yabuta et al., 2000). Rodríguez-Ruiz et al. (2017) caracterizaram a GalLDH de frutos de pimenta. Os autores sugeriram com base nos dados de hidrofobicidade, que um domínio transmembranar muito curto de 20 aminoácidos estaria anexado à membrana mitocondrial e que o resto da estrutura proteica da enzima seria periférica. No entanto, os autores destacam que é preciso realizar estudos mais detalhados.

A fim de identificar a relação da GalLDH com complexo I, Pineau et al. (2008) caracterizaram mutantes de *A. thaliana* em que a GalLDH estava silenciada e verificaram que houve redução na quantidade do complexo I, enquanto que outros complexos respiratórios não foram afetados. Resultados semelhantes foram encontrados por Schertl et al. (2012), que ao isolar mitocôndrias de *A. thaliana* propuseram que além de ser importante para a biossíntese de AA, essa enzima está associada à montagem do complexo I que possui massa molecular de cerca de 850 kDa. Os autores verificaram que a GalLDH está associada com mais dois complexos proteicos, constituintes de subunidades do complexo I de 470 e 420 kDa (Schertl et al. 2012).

A localização da GalLDH próximo ao complexo I seria reforçada pela presença de domínio de ligação FAD à região N-terminal da sequência proteica ligada a uma flavina, e a conformação estérica da GalLDH permitiria uma ligação mais próxima com o citocromo c para doação de elétrons durante oxidação do GalL (Rodríguez-Ruiz et al., 2017).

O silenciamento do gene que codifica a GalLDH em tomate (*Solanum lycopersicum*) possibilitou o estudo da sua função fisiológica no metabolismo do AA e no desenvolvimento vegetal. Resultados obtidos por Alhag Dow et al. (2007) revelaram que a GalLDH silenciada afeta o crescimento e o desenvolvimento do tomate e do tomateiro, e altera o metabolismo energético relacionado às mitocôndrias. Zhang et al. (2016) estudaram três genes homólogos que codificam a GalLDH em plântulas de trigo designados como (*TaGalLDH-A1*, *-B1* e *-D1*) e

evidenciaram que a redução da expressão destes genes implicou na perda significativa da atividade da GalLDH e conseqüentemente no conteúdo de AA.

A atividade da GalLDH afeta o transporte de elétrons e a taxa respiratória, indicando que há uma relação entre a respiração e a biossíntese de AA pela localização desta enzima próximo ao complexo I (Millar et al., 2003; Pineau et al., 2008; Schertl et al. 2012), que contribui para o transporte de elétrons na etapa de redução da COX (Bartoli et al., 2006).

Ao fornecer GalL em folhas de *A. thaliana*, Bartoli et al. (2006) verificaram que além do aumento na atividade da GalLDH e no acúmulo de AA, o GalL foi responsável pelo aumento na respiração e maior atividade da COX e da AOX.

A AOX ao regular o estado de alta energia da membrana, influencia na biossíntese de AA, pois ao receber elétrons diretamente do *pool* de ubiquinona, impede a superprodução de ERO e disponibiliza mais citocromo c na forma oxidada (Bartoli et al., 2006). O citocromo c, quando está na forma oxidada, favorece a maior acumulação de AA em virtude de ser o acceptor final de elétrons no último passo da sua via de síntese (Leferink et al., 2009b).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Compreender o papel da GalLDH na produção de H_2O_2 e no dano oxidativo em frutos de mamão 'Golden'.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a influência da atividade da GalLDH nas oxidases terminais da CTEM durante a respiração em mitocôndrias purificadas;
- ✓ Relacionar a atividade da GalLDH com o acúmulo de AA e sua interação com a via AOX em mitocôndrias purificadas;
- ✓ Relacionar a interação da GalLDH com a via AOX, por meio da atividade da GalLDH mediada pela redução do citocromo c em presença de GalL em mitocôndrias purificadas;
- ✓ Relacionar a biossíntese de ácido ascórbico pela atividade da enzima GalLDH com a produção de H_2O_2 em mitocôndrias purificadas;
- ✓ Quantificar a peroxidação lipídica e a atividade peroxidase relacionada com a biossíntese de AA em extrato de polpa de mamão;
- ✓ Determinar o nível de oxidação de proteínas relacionado com a biossíntese de AA em mitocôndrias purificadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido entre os anos de 2016 e 2017, na Unidade de Bioquímica e Fisiologia Pós-colheita do Setor de Fisiologia Vegetal (LMGV/CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), situada em Campos dos Goytacazes – RJ.

4.1. Obtenção e Padronização do material vegetal

Foram utilizados frutos de mamão ‘Golden’, adquiridos em comércio local em Campos dos Goytacazes – RJ, no estágio I de amadurecimento (fruto com até 15% da superfície da casca amarelada, rodeada de verde claro) (maturação fisiológica) (Ritzinger e Souza, 2000).

Os frutos foram higienizados e a firmeza foi avaliada utilizando texturômetro (Texture Analyser, modelo TA.XT Express, UK), com ponta de prova de 2 mm de diâmetro e velocidade de penetração de 1 mm.s⁻¹. Foram feitas três medições em pontos equidistantes na região equatorial de cada fruto e a firmeza do pericarpo foi definida como força de resposta a 0,1961 Newton de força aplicada.

A padronização da colocação da casca foi baseada no ângulo *hue* (0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde, 360° = azul), utilizando um colorímetro portátil (Croma meter, modelo CR-300, Minolta, Japão), sendo realizadas três medições equidistantes por fruto sempre na região equatorial (McGuire, 1992).

4.2. Isolamento de Mitocôndrias

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando aproximadamente 0,3 kg de polpa do fruto. Os frutos foram homogeneizados em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) utilizando 1 L de solução de extração, preparada sob agitação constante, contendo manitol (0,35 M), EDTA (3 mM), MOPS (50 mM), PVP - 25 000 (0,6%), PMSF (1 mM) e cisteína (8 mM) em pH 7,4. Após homogeneização o extrato foi filtrado em duas camadas de gazes e uma de Miracloth (Calbiochem®, UK). O homogenato foi então centrifugado a 1.500 g por 15 min e o sobrenadante centrifugado a 15.000 g por 15 min, sendo o *pellet* coletado e ressuspensionado em solução tampão de lavagem preparada em agitação constante contendo manitol (0,35 M), EDTA (0,5 mM) e MOPS (10 mM) com pH 7,2. A seguir o material foi centrifugado a 9.000 g por 15 min, obtendo-se assim mitocôndrias lavadas no precipitado.

Para a purificação das mitocôndrias foi utilizado um gradiente de sacarose. O precipitado (mitocôndrias lavadas) foi suspenso em 0,4 mL de solução tampão de lavagem (mesma composição descrita acima) e vertido em 25 mL de solução contendo BSA (0,5%), MOPS (20 mM) em pH 7,2, e sacarose a 2 M, 1,45 M, 1,20 M, 0,9 M e 0,6 M, posteriormente centrifugado a 55.000 g por 90 min. As mitocôndrias purificadas foram coletadas com auxílio de uma pipeta Pasteur, no terço basal do tubo, sendo diluídas em aproximadamente dez vezes o seu volume com tampão de lavagem e centrifugadas a 10.000 g por 15 min, conforme protocolo proposto por Oliveira et al. (2015) (Figura 5).

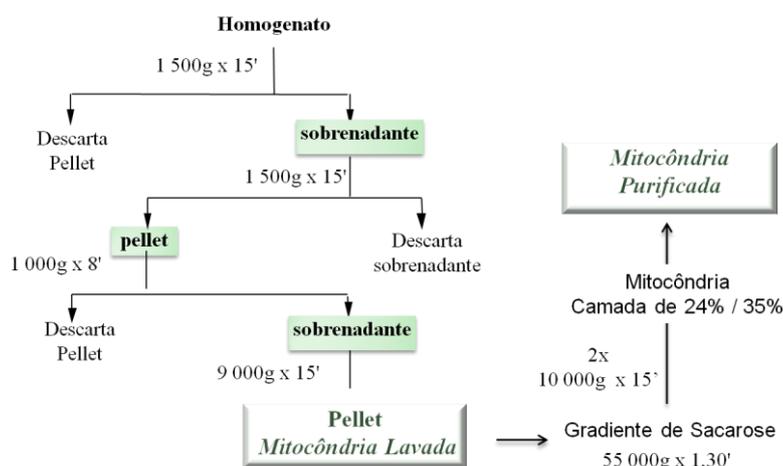


Figura 5: Esquema de extração e isolamento de mitocôndrias de polpa de mamão "Golden".

4.3. Atividade Respiratória em Mitocôndrias Purificadas

A atividade respiratória de mitocôndrias purificadas foi determinada utilizando o método polarográfico com auxílio de um eletrodo do tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK). Foi utilizado 1 mg de proteína mitocondrial por ensaio em 0,5 mL de meio de reação contendo manitol 0,35 M, mops 10 mM, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM e BSA 0,5% (p/v) em pH 7,2. O procedimento ocorreu à temperatura de 25°C e o consumo de O₂ foi quantificado adicionando 10 µL de NADH 8 mM. Em seguida foi adicionado 100 nmoles de ADP, momento este em que foi verificado o estágio 3 e após alguns minutos foi registrado o estágio 4 da respiração, em que o ADP adicionado e consumido, evidenciando a taxa de fosforilação das mitocôndrias. Para obter o coeficiente respiratório (CR), foi feito o cálculo da razão entre o estágio 3 e 4. O CR é um parâmetro importante para determinar o acoplamento das organelas purificadas (Duque e Arrabaça, 1999; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008; Oliveira et al., 2015).

A participação da via AOX foi determinada adicionando SHAM (4 mM), inibidor da via AOX em mitocôndrias no estágio 4 da respiração e expresso em porcentagem. Em seguida adicionou-se Azida (3 mM), inibidor da COX, confirmando assim que a respiração foi proveniente da COX, conforme protocolo adaptado de Duque e Arrabaça (1999) e Oliveira et al. (2015).

4.4. Influência da Presença de GalL na Capacidade das Vias Respiratórias em Mitocôndrias Purificadas

Para determinar o transporte de elétrons via oxidação do GalL a AA, a respiração foi mensurada apenas com o GalL (5 Mm) como substrato inicial.

Foi utilizado 1 mg de proteína mitocondrial por ensaio em 0,5 mL de meio de reação contendo manitol 0,35 M, MOPS 10 mM, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM e BSA 0,5% (p/v) em pH 7,2. O procedimento ocorreu à temperatura de 25°C com auxílio de um eletrodo do tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK). A respiração foi estimulada utilizando GalL como substrato, em seguida para inibir a AOX foi adicionado SHAM (4 mM), para inibir a COX foi

adicionado azida (3 mM) e por fim foi adicionado DPI (2 mM), um inibidor de flavoenzimas.

4.5. Determinação da Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi mensurada pelo método de Bradford (1976). A leitura da absorbância de cada amostra e da curva padrão foi feita em espectrofotômetro a 595 nm e utilizando BSA como proteína padrão.

4.6. Avaliação da Biossíntese de AA

A quantificação do AA foi realizada em condições neutras adicionando tampão fosfato 100 mM, pH 10,4 (K_2HPO_4). As mitocôndrias purificadas foram tratadas com 5 mM de DTT por 5 min. e filtradas com filtro de nylon em PVDF, com diâmetro de poro de 0,22 μm e 0,45 μm . Em seguida, 20 μL das amostras foram injetadas em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), modelo LC-10AD (Shimadzu, Japan) acoplado a um registrador/integrador – chromatopac, modelo C-R6A (Shimadzu, Japan). A corrida foi realizada com uma coluna “Spherisorb ODS C18” com velocidade do fluxo de 1 mL min^{-1} e o pico de AA foi identificado aos 2,69 min. Os resultados foram expressos em $\mu mol\ mg^{-1}$ proteína⁻¹.

4.6.1. Avaliação da Biossíntese e Acúmulo de AA em Função do Tempo

Para avaliar a produção de ácido ascórbico em função do tempo, as mitocôndrias purificadas foram pré-tratadas com GalL 5 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 com o volume final de 250 μL . As reações foram interrompidas após 15 min, 30 min, 60 min e 120 min com ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v). Em seguida, estas foram centrifugadas em microcentrífuga a 10.000 g por 5 min a 4°C e o sobrenadante coletado, para determinação do AA no HPLC, seguindo condições descritas no item 4.6..

4.6.2. Avaliação da Biossíntese de AA em Função dos Tratamentos

Para avaliar a produção de ácido ascórbico, as amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos: T1) controle, T2) H₂O₂ (1 mM), T3) H₂O₂ (1 mM) e DPI (2 mM), T4) H₂O₂ (1 mM) e SHAM (4 mM), T5) GalL (5 mM), T6) GalL (5 mM) e H₂O₂ (1 mM), T7) GalL (5 mM) e SHAM (4 mM), T8) GalL (5 mM) e DPI (2 mM) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 com o volume final de 250 µL. As reações foram interrompidas após 120 min com ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v). Em seguida, estas foram centrifugadas em microcentrífuga a 10.000 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado para determinação do AA no HPLC, seguindo condições descritas no item 4.6..

4.7. Avaliação da Atividade da GalLDH

A avaliação da atividade da GalLDH foi realizada utilizando (20 µL) de mitocôndria purificada e incubada em tampão Tris (50 mM), pH 8,4, citocromo C (5 mM), Triton X-100 5% (v/v) e azida (5 mM) para manter o citocromo C reduzido. A leitura da absorbância de cada amostra foi feita em espectrofotômetro a 550 nm em intervalos de 10 segundos durante 1 min., utilizando o método enzimático descrito por Ôba et al. (1995) com modificações.

As amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos: T1) Controle; T2) GalL (5 mM); T3) GalL (5 mM) e H₂O₂ (1 mM); T4) GalL (5 mM) e SHAM (4 mM); T5) GalL (5 mM) e DPI (2 mM) em volume final de 1 mL. Uma unidade de atividade da GalLDH foi definida como a quantidade de citocromo C reduzido durante 1 min.

4.8. Quantificação da Produção de H₂O₂

A taxa de produção de H₂O₂ foi determinada em extrato mitocondrial utilizando Kit de ensaio Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (#A22188; Molecular Porbes, Invitrogen®) de acordo com instruções do fabricante. A fluorescência emitida foi medida na faixa de excitação de 550 nm e

emissão de 600 nm nos períodos de 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min.

Para verificar a formação de H_2O_2 pela atividade da GalLDH foi adicionado GalL (50 mM). O tratamento controle foi avaliado considerando as amostras não tratadas com GalL.

A fluorescência foi registrada e a curva padrão foi obtida por adição de quantidades conhecidas de H_2O_2 no meio de reação descrito anteriormente. Os níveis de H_2O_2 foram expressos em μmol de H_2O_2 mg^{-1} de proteína de cada amostra. As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método de Bradford (1976).

4.9. Avaliação da Atividade da Peroxidase (POD)

Para a avaliação da atividade da POD foi macerado 300 mg de pericarpo de mamão em meio de homogeneização contendo tampão Tris pH 7,5 (100 mM), EDTA (0,1 mM), Triton (p/v) 0,1%, glicerol (p/V) 10% e DTT (2 mM). Em seguida foi centrifugado a 23.000 g por 20 min a 4°C conforme metodologia proposta por Ruiz-Rodrigues et al. (2017). O sobrenadante contendo a enzima foi coletado e utilizado para as análises.

A reação iniciou-se após a adição do extrato vegetal contendo a enzima no meio de reação. O meio de reação foi preparado conforme metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). Foi utilizado tampão fosfato potássio pH 6,8 (25 mM), pirogalol (20 mM) e H_2O_2 (20 mM).

As amostras foram submetidas aos seguintes tratamentos: T1) controle; T2) GalL (5 mM); T3) H_2O_2 (1 mM); T4) GalL (5 mM) e H_2O_2 (1 mM).

A atividade da POD foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}$ e a leitura da absorbância de cada amostra foi feita em espectrofotômetro a 420 nm em intervalos de 3 seg. durante 1 min, usando o coeficiente de extinção de $2,47 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.10. Quantificação da Peroxidação Lipídica (MDA)

A determinação de MDA foi realizada conforme metodologia proposta por Cakmak e Horst (1991) com modificações. Discos contendo 300 mg de pericarpo

de mamão foram incubados por 2 h e 30 min em solução tampão contendo MOPS (500 mM) e os seguintes tratamentos: T1) controle; T2) GalL (10 mM); T3) H₂O₂ (1 mM); T4) GalL (10 mM) e H₂O₂ (1 mM).

Os discos foram macerados em meio contendo TCA 0,1%, em seguida foi centrifugado a 10.000g por 15 min. a 4°C. Posteriormente 500 µL das amostras foram incubadas em banho-maria por 20 min a 90°C em solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% e TCA 20%. No branco foi adicionado 500 µL TCA 0,1%. A reação foi encerrada em banho de gelo por 1 min e em seguida as amostras foram centrifugadas a 13.000g por 4 min em temperatura ambiente. A leitura da absorbância de cada amostra foi feita em espectrofotômetro a 535 nm para aldeído malônico e a 600 nm para absorbância inespecífica. A concentração de MDA foi expressa em nmol g⁻¹ MS usando o coeficiente de adsorvidade de 155 mM⁻¹cm⁻¹.

4.11. Quantificação da Oxidação de Proteínas

Para determinar a oxidação de proteínas, foram retiradas quantidades iguais de mitocôndrias purificadas (100 µL), as quais foram incubadas por 30 min e submetidas aos seguintes tratamentos: T1) Controle, T2) GalL (5 mM), T3) GalL (5 mM) e DPI (2 mM), T3) GalL (5 mM) e SHAM (4 mM), T5) GalL (5 mM) e H₂O₂ (1 mM).

A reação foi encerrada com a adição de ácido tricloroacético (TCA), de maneira a obter a concentração final de 20% (p/v), sendo o extrato incubado a 4°C durante 10 min, após os quais foi centrifugado em microcentrifuga a 11.000 g por 10 min. Por fim, foi descartado o sobrenadante e o *pellet* coletado, conforme Link e Laber (2011) com modificações.

Ao *pellet* obtido no passo anterior foi adicionado 300 µL de solução de derivatização contendo guanidina HCl (6 M) e DNP (1 mM) para marcação das proteínas oxidadas. As amostras foram deixadas à temperatura ambiente durante 10 min, sendo então centrifugadas a 11.000 g por 3 min, conforme descrito por Levine et al. (2000).

Foi recolhido o sobrenadante e incubado com o anticorpo anti-DNP (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a 4°C por overnight. Posteriormente, a proteína

A/G (resina Ultralink, Thermo Scientific) foi ligada ao complexo antígeno-anticorpo e incubada em temperatura ambiente por 2 h. O complexo de proteínas foi eluído adicionando DTT (10 mM) seguido de incubação por 5 min com posterior centrifugação a 2.500 g por 5 min, sendo o sobrenadante coletado conforme Camejo et al. (2015) com modificações. Por fim, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976).

4.12. Análises Estatísticas

A avaliação da biossíntese de AA em função do tempo e a produção de H₂O₂ foram conduzidas seguindo o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial. Para a biossíntese de AA foi utilizado o esquema fatorial 2 x 4, sendo o primeiro fator correspondente aos tratamentos (controle e GalL) e o segundo aos tempos de incubação (15, 30, 60 e 120 min). Para a produção de H₂O₂ foi utilizado o esquema fatorial 2 x 6, sendo o primeiro fator correspondente aos tratamentos (controle e GalL) e o segundo aos tempos de avaliações (5, 10, 15, 20, 25 e 30 min). Os resultados representam a média de três repetições de cada experimento. As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico Asistat (SILVA e AZEVEDO, 2016).

A avaliação da biossíntese de AA em função dos tratamentos e as avaliações da atividade da GalLDH, Peroxidase (POD), peroxidação lipídica (MDA) e oxidação de proteínas foram realizadas em DIC. Os resultados são a média de pelo menos três repetições de cada experimento. As médias foram submetidas à ANOVA e comparadas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade, utilizando o software estatístico Asistat (SILVA e AZEVEDO, 2016).

5. RESULTADOS

5.1. Padronização Inicial dos Frutos

A padronização quanto à colocação do epicarpo e firmeza dos frutos de mamão 'Golden' está apresentada na Figura 6.



Ângulo de cor *hue* (°h) $111,2 \pm 2,5$

Firmeza (N) $16,4 \pm 1,5$

Figura 6: Imagem ilustrativa dos frutos de mamão 'Golden' e valores médios de 10 amostras para o ângulo de cor *hue* casca e firmeza dos frutos.

Os frutos foram avaliados quando apresentaram médias de ângulo de cor *hue* de 111,2 °h e firmeza de 16,4 N. O ângulo de cor *hue* e a firmeza são importantes parâmetros físicos indicadores da maturação usados para estabelecer a homogeneidade do material vegetal utilizado no experimento.

5.2. Atividade Respiratória em Mitocôndrias Purificadas

Ao isolar e purificar mitocôndrias, por meio do gradiente de sacarose, foi registrado o coeficiente respiratório (CR) de 1,85 indicando um nível satisfatório de acoplamento mitocondrial na oxidação do NADH (Oliveira et al., 2017).

A taxa de consumo de O₂ total e a respiração em função da participação da COX e AOX utilizando NADH 8 mM como substrato respiratório estão representadas na Figura 7.

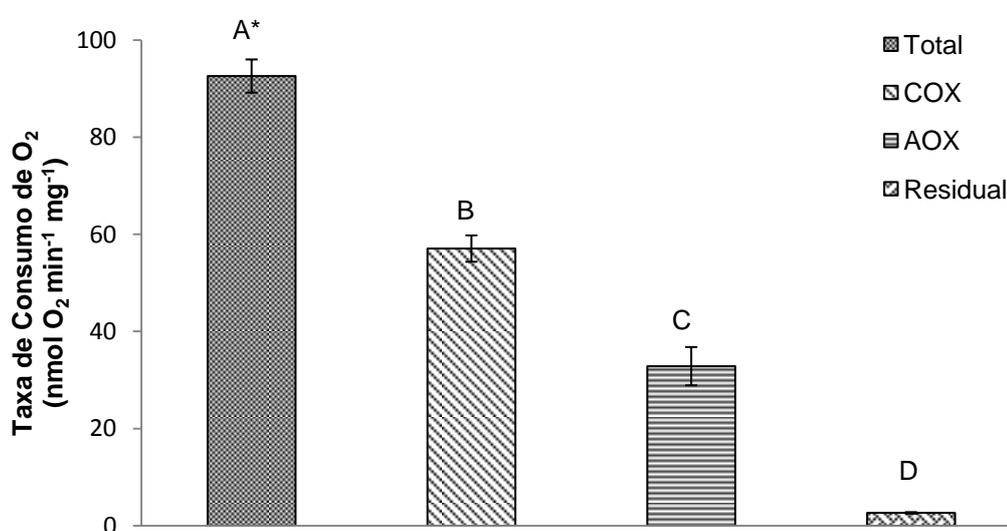


Figura 7: Taxa de consumo de O₂ total e específica para as vias citocromo C oxidase (COX) e oxidase alternativa (AOX) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', utilizando NADH (8 mM) como substrato respiratório. A respiração residual representa o consumo de O₂ registrado quando as vias COX e AOX estão bloqueadas. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A taxa respiratória total utilizando NADH como substrato foi de 92,6 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹. Os resultados demonstraram que nos frutos de mamão utilizados no experimento a participação da COX foi responsável pelo consumo de 62% do O₂ total, enquanto que apenas 35% é devido à participação da via AOX e 3% correspondente à respiração residual. A menor participação da via AOX no consumo de O₂ nas amostras de mitocôndrias analisadas está relacionada ao estágio verde de maturação do mamão (Figura 7).

5.3. Efeito do GalL na Capacidade das Vias Respiratórias em Mitocôndrias Purificadas

As taxas de consumo de O_2 em mitocôndrias purificadas em função da participação da COX, AOX e GalLDH utilizando GalL (5 mM) como substrato respiratório estão representadas na Figura 8.

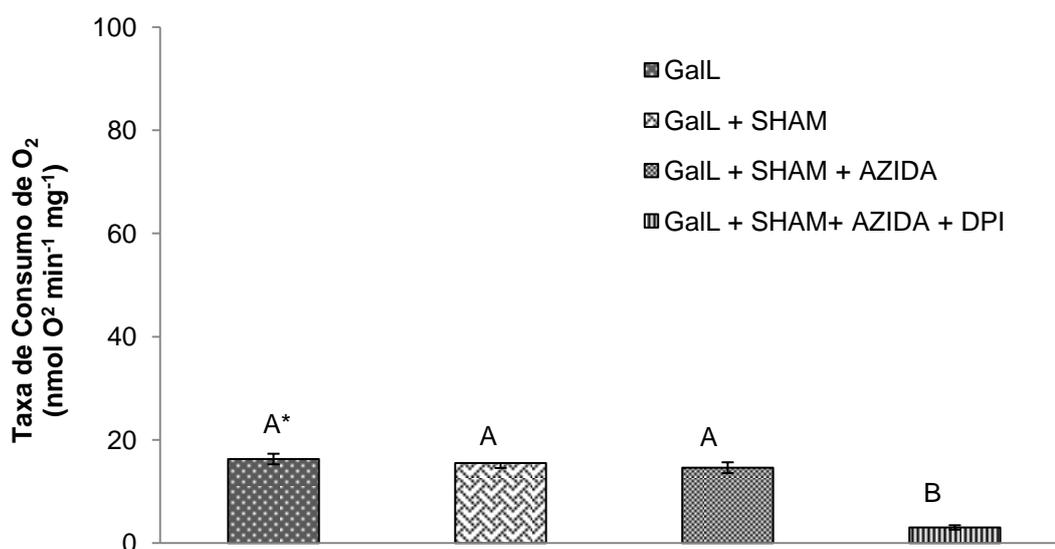


Figura 8: Taxa de consumo de O_2 em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', utilizando GalL (5 mM) como substrato respiratório na presença ou não da presença de SHAM (4 mM), azida (3 mM) e DPI (2 mM), inibidores da AOX, COX e GalLDH, respectivamente. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A taxa respiratória total utilizando GalL como substrato foi de 16,3 nmol O_2 min $^{-1}$ mg $^{-1}$; após adição de SHAM o consumo de O_2 foi de 15,5 nmol O_2 min $^{-1}$ mg $^{-1}$ e de 14,6 nmol O_2 min $^{-1}$ mg $^{-1}$ após a adição de azida, respectivamente inibidores da AOX e COX (Figura 8). De acordo com os resultados apresentados, a taxa respiratória com GalL como substrato respiratório, assim como na presença de SHAM, bloqueador da AOX, ou na presença de azida, bloqueador da COX, não diferem ($P < 0,05$) entre si.

Por outro lado, ao adicionar DPI, um bloqueador de flavoenzimas, foi observado decréscimo ($P < 0,05$) na taxa respiratória das mitocôndrias isoladas. Os resultados indicam que o O_2 consumido na mitocôndria purificada de polpa de

mamão no estágio de maturação verde, pode ser devido à atividade da GalLDH, pois ao adicionar DPI o consumo de O_2 reduziu de cerca de 15,5 para 3,0 $nmol O_2 min^{-1} mg^{-1}$ (Figura 8).

5.4. Biossíntese e Acúmulo de AA

5.4.1. Biossíntese e Acúmulo de AA em Mitocôndrias Purificadas

A biossíntese de AA mensurada com e sem a presença de GalL (5 mM) durante os períodos de 15 min, 30 min, 60 min e 120 min está representada na Figura 9.

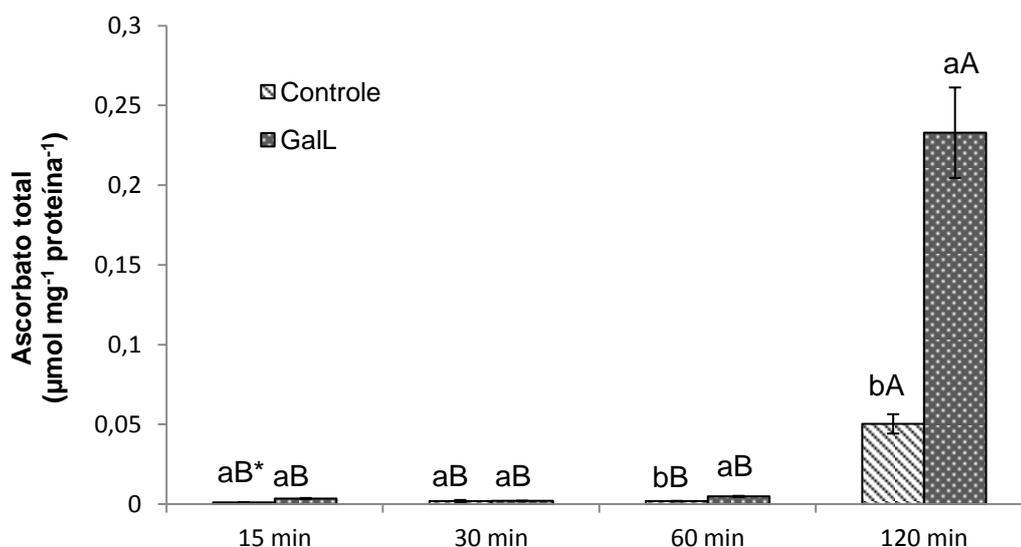


Figura 9: Produção de AA em ($\mu mol mg^{-1} prote\acute{a}ina^{-1}$) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', em função do tempo de incubação de 15 min, 30 min, 60 min e 120 min, na presença ou não (controle) de GalL (5 mM). * Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação da produção de AA, em cada tempo de incubação, na presença ou não (controle) de GalL (5 mM), enquanto as letras maiúsculas representam a comparação da produção de AA com ou sem GalL em função do tempo de incubação em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Os resultados mostram que a produção de AA difere ($P < 0,05$) entre mitocôndrias controle e aquelas tratadas com GalL a partir de 60 min de incubação (Figura 9). As amostras de mitocôndrias que não foram incubadas com

GaLL 5mM apresentaram produção de AA muito baixa, ao passo que ao utilizar o GaLL, a produção de AA foi maior ($P < 0,05$) (Figura 9). De acordo com os resultados apresentados, o período de 120 min de incubação com GaLL (5 mM), pode ser considerado como o mais indicado para as análises da produção de AA em mitocôndrias purificadas de mamão 'Golden' com média de $0,23 \mu\text{mol}$ de AA mg proteína⁻¹, enquanto que o controle apresentou média de $0,05 \mu\text{mol}$ de AA mg proteína⁻¹ (Figura 9).

5.4.2. Efeito do Substrato GaLL, H₂O₂ e Inibidores Respiratórios no Acúmulo de AA em Mitocôndrias Purificadas

A produção de AA em mitocôndrias de mamão 'Golden' incubadas na presença ou não (controle) de H₂O₂ (1 mM) e GaLL (5 mM) em função da adição do inibidor da GaLLDH, DPI (2 mM), bloqueador da AOX, SHAM (4 mM) e da adição de GaLL combinada com H₂O₂, avaliadas após o período de 120 min está representada na Figura 10.

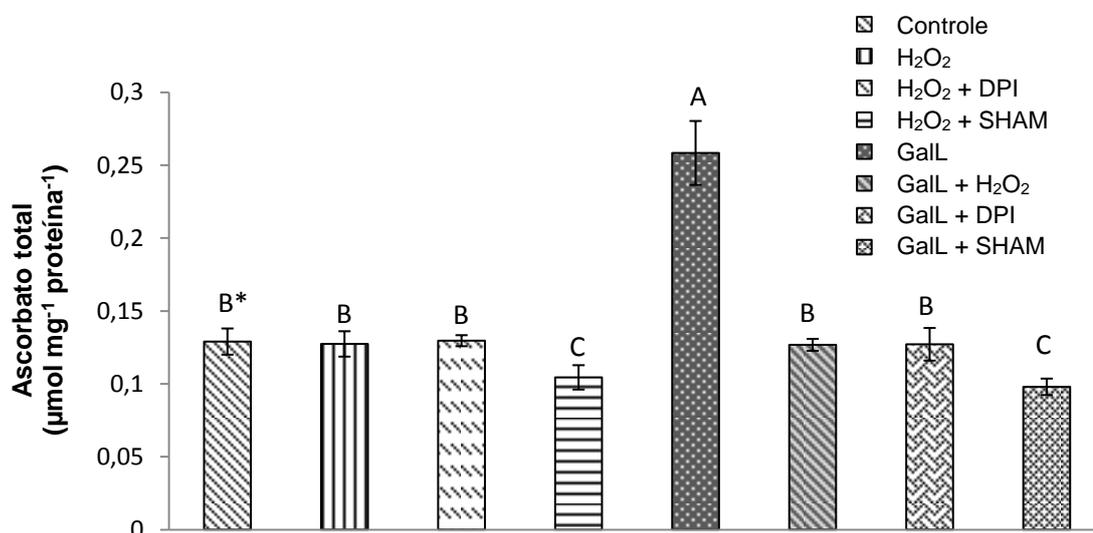


Figura 10: Produção de AA em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden' em função da incubação ou não com GaLL (5 mM) por 120 min e a adição de H₂O₂ (1 mM), inibidor da GaLLDH, DPI (2 mM) e inibidor da AOX, SHAM (4 mM). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Os resultados demonstraram que nas amostras mitocondriais onde não houve a adição de GalL (controle), a produção de AA foi baixa ($P < 0,05$), com média de $0,13 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ (Figura 10). No tratamento com H_2O_2 e no tratamento com H_2O_2 combinado com DPI, não foi observada diferença ($P < 0,05$) na produção de AA quando comparado ao controle.

A redução na produção de AA foi observada tanto ao combinar H_2O_2 com SHAM, quanto na combinação de GalL com SHAM, apresentando médias de $0,10 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ e $0,09 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ respectivamente, diferindo ($P < 0,05$) do que foi observado no controle (Figura 10).

A maior produção de AA foi observada nas amostras incubadas apenas com GalL. O GalL influenciou positivamente na produção de AA apresentando média de $0,23 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$, diferindo ($P < 0,05$) comparativamente ao observado no controle. No tratamento em que as amostras foram incubadas com GalL e H_2O_2 houve redução ($P < 0,05$) da produção de AA em relação às amostras incubadas apenas com GalL, apresentando média de $0,13 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$. Resultado semelhante foi observado ao combinar GalL com DPI, em que foi observada média de produção de AA de $0,13 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$. Estes tratamentos não diferiram ($P < 0,05$) entre o controle e nem quando comparados entre si, mas diferiram na comparação com as amostras incubadas apenas com GalL, ou quando esteve presente o SHAM (Figura 10).

De acordo com estes resultados pode-se destacar que adição de SHAM, bloqueador específico da AOX, influenciou negativamente no acúmulo de AA em mitocôndrias purificadas dos frutos de mamão 'Golden', tratadas e não tratadas com GalL. E, que a adição de H_2O_2 e DPI anularam o efeito positivo da adição de GalL.

5.5. Atividade da Enzima GalLDH em Função da Presença de H_2O_2 e dos Inibidores SHAM e DPI

A atividade da GalLDH na presença ou não do seu substrato, GalL (5 mM), em função da presença de H_2O_2 (1 mM), SHAM (4 mM) ou DPI (2 mM) está representada na Figura 11.

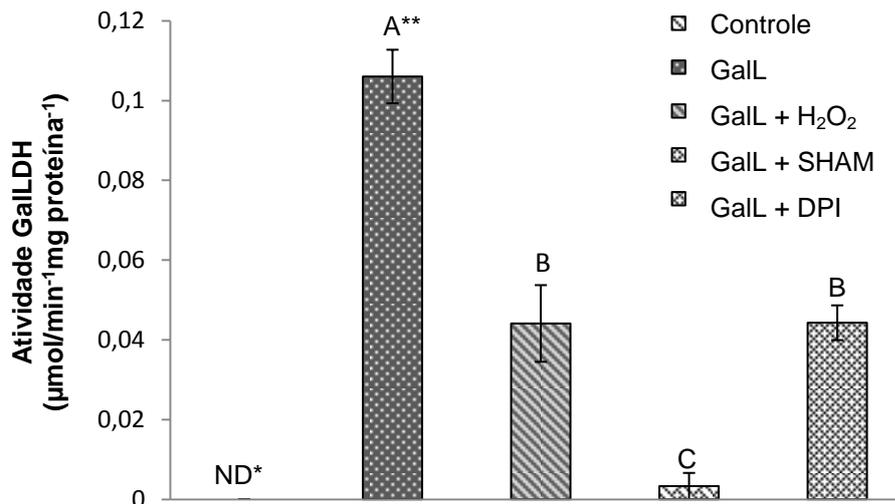


Figura 11: Atividade da GalLDH em mitocôndrias purificadas de mamão 'Golden' na presença ou não (controle) de GalL (5 mM) e em função da adição de H₂O₂ (1 mM) e os inibidores da AOX e GalLDH, respectivamente, SHAM (4 mM) e DPI (2 mM). *ND: Não detectado. **Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

As amostras mitocondriais apresentaram resultados distintos quanto à atividade GalLDH após a adição de H₂O₂, SHAM e DPI. A atividade GalLDH nas amostras controle (sem a adição de GalL) não foi detectada, enquanto que a adição de GalL 5mM estimulou ($P < 0,05$) a atividade GalLDH (Figura 11). Na presença de GalL, a atividade GalLDH foi reduzida ($P < 0,05$) após adição de H₂O₂ e adição dos inibidores da GalLDH e AOX, respectivamente, DPI e SHAM (Figura 11). A adição de SHAM resultou em maior queda ($P < 0,05$) na atividade GalLDH em relação à queda de 58% na atividade da enzima registrada após a adição de H₂O₂ ou DPI. Foi observada a redução de 97% na atividade da enzima quando adicionado GalL combinado com SHAM, sendo considerada estatisticamente ($P < 0,05$) similar ao controle, apresentando média de $0,003 \mu\text{mol}/\text{min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$.

5.6. Produção de H₂O₂ em Função do Tempo de Incubação em Mitocôndrias Purificadas

A produção de H₂O₂ em mitocôndrias incubadas ou não (controle) com GalL (50 mM) pelos tempos de reação de 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min está representada na Figura 12.

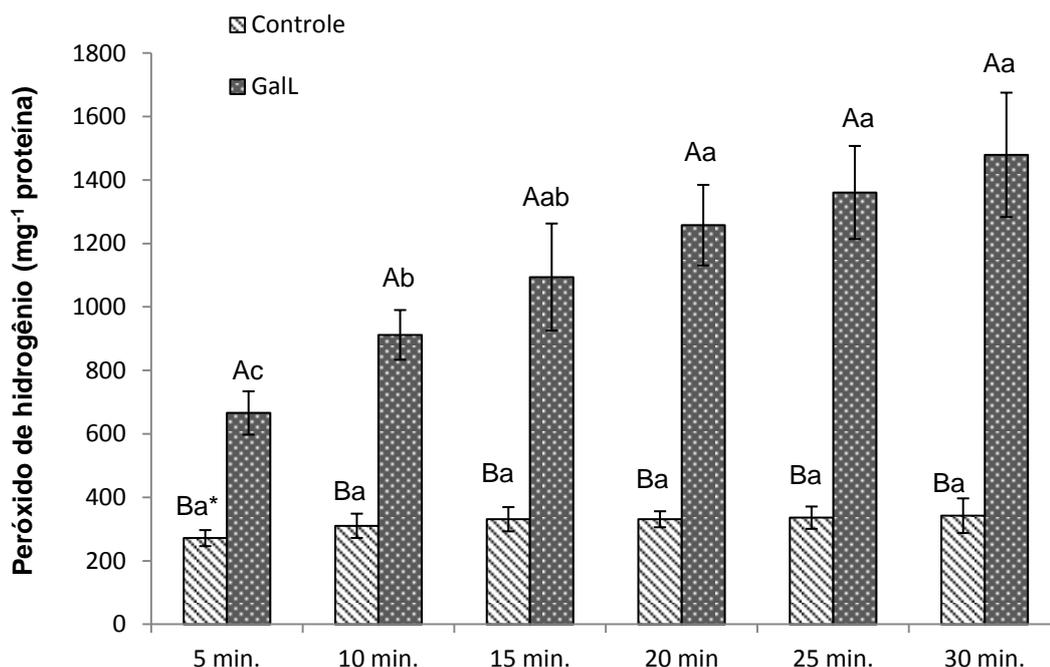


Figura 12: Produção de H₂O₂ (μmol de H₂O₂ mg⁻¹ proteína) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden' incubadas ou não (controle) com GalL (50 mM) pelos tempos de reação de 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min e 30 min. * Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação da produção de H₂O₂ em função do tempo de incubação ou não (controle) com GalL (50 mM), enquanto as médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na produção de H₂O₂ na comparação entre amostras incubadas ou não (controle) com GalL (50 mM) considerando o mesmo tempo de incubação em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

As amostras mitocondriais não incubadas com GalL apresentaram produção basal de H₂O₂, não diferindo entre si ($P < 0,05$) durante os intervalos de avaliação.

A produção de H₂O₂ verificada em mitocôndrias incubadas com GalL foi maior ($P < 0,05$) comparativamente à registrada nas amostras controle (Figura 12). O fornecimento de GalL, substrato para a GalLDH, influenciou positivamente ($P < 0,05$) na produção de H₂O₂ (Figura 12). A produção de H₂O₂ foi crescente

($P < 0,05$) durante o período de avaliação. Foi observada diferença ($P < 0,05$) entre os intervalos de 5 min e 10 min, apresentando médias de $666,0 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ e $912,2 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$, respectivamente. Apesar do padrão crescente na produção H_2O_2 , a partir do intervalo de 15 min de avaliação não foi mais observada diferença ($P < 0,05$) na produção de H_2O_2 até o intervalo de 30 min.

5.7. Efeito da Presença do Subtrato GalL e do H_2O_2 na Atividade da Peroxidase (POD) Durante a Biossíntese de AA

A atividade da POD foi modulada diferencialmente ($P < 0,05$) na presença ou não (controle) de GalL (5 mM) no extrato de polpa de mamão 'Golden'. Os resultados estão representados na Figura 13.

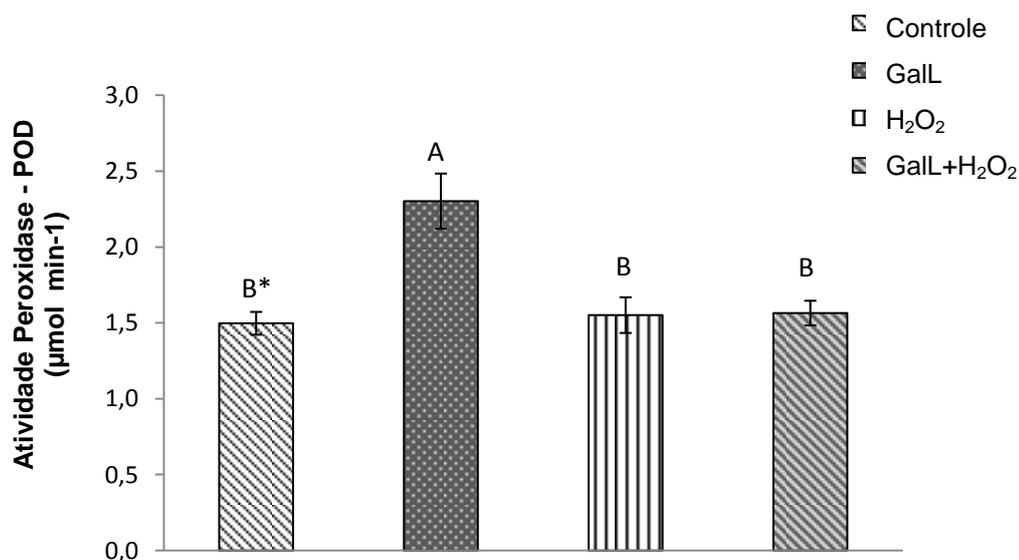


Figura 13. Atividade da peroxidase (POD) no extrato de polpa de mamão 'Golden' e incubadas na presença ou não (controle) de GalL (5 mM) e em função da adição de H_2O_2 (1 mM) de forma isolada ou em combinação com GalL. * Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

A atividade da POD foi estimulada pela adição de GalL, apresentando maior ($P < 0,05$) média ($2,30 \mu\text{mol min}^{-1}$) quando comparada aos demais tratamentos e o controle ($1,49 \mu\text{mol min}^{-1}$) (Figura 13).

A adição de H_2O_2 (1 mM) de forma isolada ou em combinação com GalL não interferiu ($P < 0,05$) na atividade da POD; nem na comparação entre estes dois tratamentos, nem na comparação com o controle. Foi observado que as amostras tratadas com H_2O_2 apresentaram atividade POD média de $1,55 \mu\text{mol min}^{-1}$, enquanto que ao combinar o H_2O_2 com GalL a atividade da enzima apresentou valores médios de $1,56 \mu\text{mol min}^{-1}$ (Figura 13).

5.8. Efeito do Substrato GalL e H_2O_2 na Peroxidação Lipídica

Os resultados do ensaio para avaliar o nível de peroxidação lipídica, a partir da produção de MDA no extrato polpa de mamão 'Golden', incubado na presença ou não (controle) de GalL (5 mM) e quando adicionado H_2O_2 (1 mM) de forma isolada ou em combinação com GalL, estão representados na Figura 14.

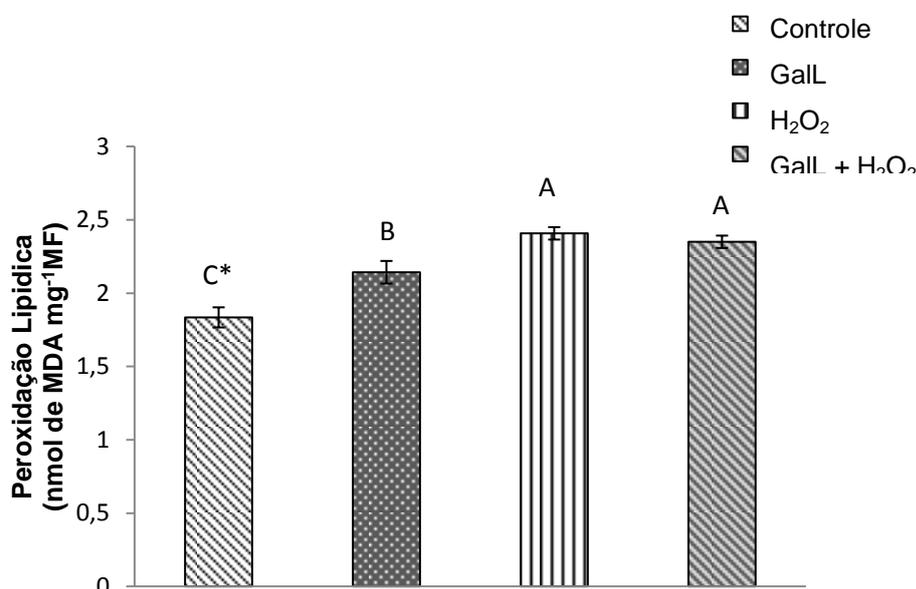


Figura 14: Peroxidação lipídica, expressa pela concentração de malondialdeído (MDA) em extrato de polpa de mamão 'Golden' e incubadas na presença ou não (controle) de GalL (5 mM) e em função da adição de H_2O_2 (1 mM) de forma isolada ou em combinação com GalL. * Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Os níveis de MDA utilizados para avaliar a peroxidação lipídica no extrato de polpa de mamão apresentaram diferença ($P < 0,05$) entre o controle e as amostras incubadas com GalL, apresentando valores médios de 1,83 nmol de MDA mg^{-1} MF e 2,14 nmol de MDA mg^{-1} MF, respectivamente (Figura 14).

A adição de H_2O_2 de forma isolada, assim como a adição de H_2O_2 combinada com GalL aumentaram a formação do complexo MDA-TBA. Foi observada diferença ($P < 0,05$) quando comparado ao controle e às amostras com GalL, no entanto quando comparado entre si não houve diferença ($P < 0,05$), apresentando valores médios de 2,40 nmol de MDA mg^{-1} MF e 2,34 nmol de MDA mg^{-1} MF, respectivamente (Figura 14).

5.9. Efeito do Substrato GalL, do H_2O_2 e dos Inibidores da AOX e GalLDH na Oxidação de Proteínas Mitocondriais

Os resultados da modificação oxidativa de proteínas mitocondriais incubadas ou não com GalL (5 mM) e em combinação com H_2O_2 (1 mM) e os inibidores da AOX, SHAM (4 mM) e da GalLDH, DPI (2 mM) estão representados na Figura 15.

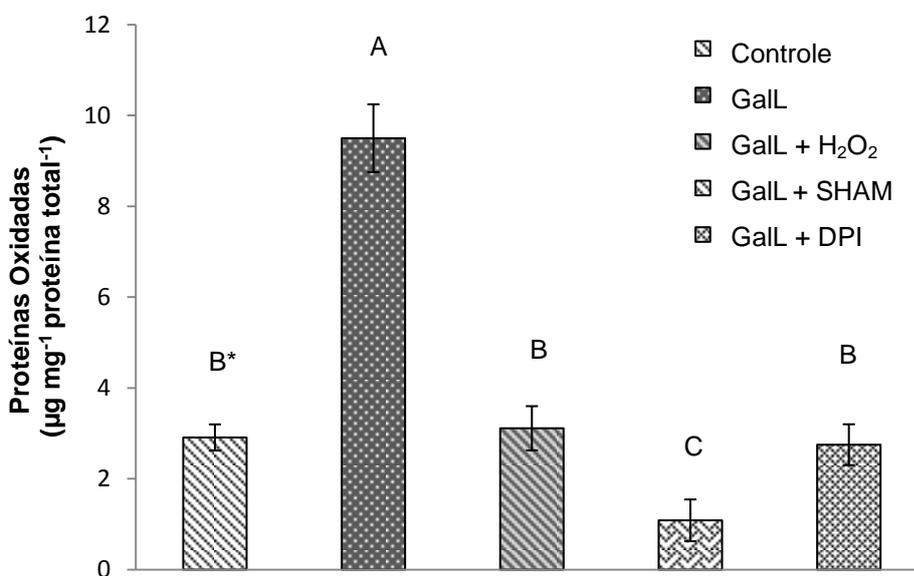


Figura 15. Oxidação de proteínas em mitocôndrias purificadas de mamão 'Golden' e incubadas na presença ou não (controle) de GalL (5 mM) e em função da adição de H_2O_2 (1 mM), inibidor da AOX, SHAM (4 mM) e inibidor da GalLDH, DPI (2 mM). * Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si em nível de 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

As amostras mitocondriais incubadas com GalL apresentaram maior ($P < 0,05$) teor de proteínas oxidadas em comparação com os demais tratamentos, apresentando médias de $9,1 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ (Figura 15). Por outro lado, quando o extrato mitocondrial foi incubado com GalL em combinação com H_2O_2 e com o inibidor da GalLDH, DPI, a oxidação proteica não diferiu ($P < 0,05$) entre si e o controle, apresentando médias de $3,2 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$; $3,1 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ e $3,2 \mu\text{mol mg}^{-1}$, respectivamente (Figura 15). Os resultados mostram, entretanto, que ao combinar GalL com o inibidor da AOX, SHAM houve uma redução ($P < 0,05$) nos níveis de proteínas oxidadas ($1,4 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$) (Figura 15). De acordo com estes resultados pode-se destacar que adição de SHAM, bloqueador específico da AOX, resultou em maior redução nos teores de proteínas de mitocôndrias oxidadas.

6. DISCUSSÃO

Foram realizados ensaios em mitocôndrias purificadas de frutos de mamão 'Golden' para verificar a relação da atividade da GalLDH durante a biossíntese de AA, com a atividade respiratória envolvendo as vias AOX e COX, assim como o papel da enzima GalLDH na produção de H₂O₂ e nos danos provocados em virtude do estresse oxidativo.

O mamão é considerado um fruto de padrão respiratório climatérico (Souza et al., 2014). Deste modo, quando colhido fisiologicamente maduro apresenta rápido amadurecimento em condições ambiente, o que resulta em mudanças na coloração da casca e da polpa e perda de firmeza da polpa, que afetam os padrões visuais de qualidade (Godoy et al., 2010).

As avaliações quanto ao ângulo *hue* e firmeza são importantes para a padronização do material vegetal. Neste experimento foi observado valor de 111,2 de ângulo *hue* (Figura 6). Em trabalhos utilizando mamão 'Golden' Souza et al. (2014) registraram valores semelhantes variando entre 112,1 °h a 104,3 °h entre o primeiro e o terceiro dia após a colheita.

Os frutos utilizados nos experimentos foram caracterizados e padronizados como pertencentes ao estágio 1 de maturação (fruto em amadurecimento cuja coloração amarela da casca não cobre mais do que 15% da superfície do fruto) (Prates, 2005). Frutos neste estágio de maturação apresentam características mais homogêneas para as avaliações.

No mamão, o aumento da respiração durante o amadurecimento está associado a redução da participação da COX e aumento da participação da AOX

(Oliveira et al., 2015; Silva et al., 2015). Aqui nesse trabalho, foi feita a quantificação da respiração utilizando como substrato respiratório o NADH (Figura 7), tendo sido verificado uma menor participação da AOX em relação à COX. Tais valores observados estão de acordo com a característica do material vegetal, que foi padronizado no estágio 1 de maturação, onde se observa uma menor participação da AOX. Resultados semelhantes foram verificados por Silva et al. (2015), quando avaliaram a respiração em mitocôndrias isoladas de polpa de mamão UENF/Caliman01 e Tainung 01 e encontraram valores da participação da AOX no início do amadurecimento em torno de 35%, enquanto que a COX representou 65% da respiração total no mesmo período.

Aqui também foi feita uma segunda quantificação da respiração, porém, utilizando o GalL como substrato respiratório. Segundo Bartoli et al. (2000) e Millar et al. (2003), há ligação funcional entre a biossíntese de AA. Durante a oxidação do GalL a AA, os elétrons são transferidos diretamente ao citocromo c, sendo oxidado pela COX, ocorrendo a redução do O₂ a H₂O (Rodríguez-Ruiz et al., 20017). Desta forma, os elétrons provenientes da biossíntese de AA contribuem para a formação do gradiente eletroquímico, demonstrando que a respiração pode ser controlada pela biossíntese de AA em plantas. (Millar et al., 2003). Os resultados aqui observados mostraram que o consumo de O₂ em mitocôndrias que utilizavam GalL como substrato foi menor em relação à respiração utilizando NADH. Este resultado é devido à menor disponibilidade de elétrons vindo apenas da oxidação do GalL (Millar et al., 2011). Quando o NADH é oxidado, os elétrons são transferidos para o complexo I, passando pela UQ e pelos complexos respiratórios (III e IV) onde há liberação de energia para a síntese de ATP e a redução do O₂ a H₂O (Millar et al., 2011). O maior fornecimento de elétrons provenientes da oxidação do NADH possibilita a maior redução do O₂ que é acceptor final de elétrons (Blokha e Fagerstedt, 2010).

Foi observado aqui, que quando o transporte de elétrons é iniciado pela oxidação do GalL a AA, ao adicionar SHAM (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) o consumo de O₂ não foi influenciado, mantendo-se nos mesmos níveis de antes da adição dos inibidores.

Recentemente, trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando mitocôndrias isoladas de mamão, tomate e morango demonstraram que, a adição de GalL como substrato respiratório aumentou a atividade da

GaLLDH e influenciou no transporte de elétrons. Porém, o resultado mais marcante observado foi a insensibilidade das vias AOX e COX aos seus respectivos inibidores (Silva, 2016), como também verificado aqui. Com base nestes estudos preliminares, surgiram então as seguintes hipóteses: 1) a adição de GalL, ao influenciar no fluxo de elétrons, estaria provocando a insensibilidade das vias oxidases terminais aos seus respectivos inibidores? ou 2) admitindo que as vias AOX e COX estão inibidas, o que poderia estar consumindo o O₂? Poderia ser a atividade da GaLLDH?

A atividade da GaLLDH é importante para a manutenção do metabolismo energético das mitocôndrias em plantas (Alhag Dow et al., 2007). A GaLLDH está localizada próximo ao complexo I da CTEM e sua regulação tem relação com o transporte de elétrons (Bartoli et al., 2000). Pineau et al. (2008) verificaram que a quantidade do complexo I foi reduzida quando a GaLLDH estava silenciada.

Bartoli et al. (2006) observaram que na presença de GalL há maior acúmulo de AA em linhas transgênicas de *A. thaliana* com menor expressão da AOX. Rodríguez-Ruiz et al. (2017) caracterizaram a GaLLDH de frutos de pimenta e sugeriram que a enzima possui um domínio transmembranar (Tyr46-Pro65) que permitiria a interação com várias vias oxidases respiratórias. Tal fato foi observado aqui ao inibir a AOX, quando foi verificada a redução na atividade da GaLLDH (Figura 11) e na biossíntese de AA (Figura 10). Resultado semelhante foi observado por Silva (2016), que ao inibir a AOX em frutos de mamão 'Golden', observou a redução no acúmulo de AA e na atividade da GaLLDH. Aqui neste trabalho, foi demonstrado que a participação da AOX é fundamental para a manutenção da atividade da GaLLDH e a biossíntese de AA.

Imai et al. (2009) avaliaram a importância da GaLLDH na manipulação do conteúdo total de AA em plantas. Os autores introduziram um cDNA que codifica a GaLLDH de batata-doce em plantas de tabaco sob controle do promotor CaMV 35S, mediada por *Agrobacterium*. Foi observado aumento de 6 a 10 vezes na atividade da GaLLDH, no entanto o conteúdo de AA não aumentou. Os autores concluíram que a acumulação de AA não é diretamente dependente da atividade da GaLLDH. Outra função atribuída à GaLLDH está relacionada à montagem do complexo I (Schimmeyer et al., 2016). Estes autores sugeriram que a GaLLDH é um fator importante para a montagem do complexo I, independente da sua função de sintetizar o AA. Segundo Schimmeyer et al. (2016), a GaLLDH é uma enzima

de dupla função na célula, ou seja, além da sua função de sintetizar o AA (Wheeler et al., 1998) é também essencial para a montagem do complexo I na CTE_m.

A biossíntese de AA é catalisada pela GalLDH que é uma flavoenzima mitocondrial (Leferink et al., 2008). Assim sendo, foi adicionado o DPI, um inibidor de flavoenzimas (Riganti et al., 2004), ao meio de quantificação da respiração em mitocôndrias isoladas utilizando GalL como substrato respiratório para verificar a participação da GalLDH no consumo de O₂. Os resultados mostraram de forma surpreendente que o consumo de O₂ reduziu significativamente após a adição de DPI (Figura 7). Isto demonstra que durante a biossíntese de AA, a GalLDH além de contribuir para o fluxo de elétrons na CTE_m, também pode estar interagindo com o oxigênio molecular com possível formação de ERO pela redução parcial do O₂. Em sendo assim, tais resultados corroborariam com a sugestão de Schimmeyer et al. (2016) de que a GalLDH seria uma enzima de dupla função na célula e com Rodríguez-Ruiz et al. (2017), que sugeriram que a enzima interage com as vias oxidases respiratórias. Entretanto, há poucas informações na literatura relacionadas ao efeito da biossíntese de AA influenciando a respiração mitocondrial.

Alhag Dow et al. (2007) demonstraram que o silenciamento do gene que codifica a GalLDH em tomate (*Solanum lycopersicum*) não alterou o teor de AA, mas influenciou no crescimento das plantas e frutos. Os autores concluíram que a GalLDH além de sintetizar AA, teria papel importante na regulação de processos relacionados ao crescimento celular nas plantas.

O que diferencia a GalLDH de outras enzimas que compõem a última etapa da rota que sintetiza o AA em animais e fungos é a falta da atividade oxidase da GalLDH (Smirnoff, 2001). A GalLDH contém um grupo FAD ligado não covalentemente (Leferink et al., 2009a). Por outro lado, sabe-se que a maioria das aldolactonas que produzem H₂O₂ são oxidases e possuem um grupo FAD unido covalentemente (Leferink et al., 2008), o que poderia justificar a atividade oxidase da GalLDH. Acredita-se que a função oxidase da GalLDH evoluiu para evitar a oxidação excessiva da CTE_m (Millar et al., 2003), pois as mitocôndrias são organelas altamente susceptíveis a danos oxidativos (Pinto et al., 2003).

Leferink et al. (2008) revelaram que apesar da pouca afinidade da enzima com o oxigênio molecular é possível observar que, ainda que baixa, a GalLDH pode apresentar uma função oxidase.

É importante ressaltar que enquanto Leferink et al. (2008) utilizaram como objeto de estudo a GalLDH purificada, nesta pesquisa foi analisada a atividade da GalLDH integrada aos componentes mitocondriais da CTEM. Sendo assim, é possível que a GalLDH possa ter apresentado maior atividade oxidase, pois foi demonstrado que ao bloquear as vias AOX e COX, o consumo de O₂ na CTEM ocorreu devido à atividade da GalLDH (Figura 8).

Para compreender a relação entre a biossíntese de AA e a produção de ERO, foi analisada a produção de H₂O₂ via fluorescência. Ao analisar a produção de H₂O₂ nas amostras de extrato mitocondrial na presença de GalL, verificou-se de forma surpreendente que a GalLDH, ao oxidar o GalL produziu quantidades elevadas de H₂O₂ quando comparadas às amostras mitocôndrias em que não foram adicionadas GalL no meio de reação (Figura 12).

Leferink et al. (2009a) mostraram que a GalLDH pode ter atividade oxidase a partir da substituição de um único resíduo de alanina por glicina, correspondente ao resíduo Ala-113, o que, segundo estes autores, aumenta a afinidade da enzima com o oxigênio molecular. A reação oxidase das flavoproteínas com o oxigênio molecular ainda não está completamente compreendida, mas envolve a transferência de elétrons da flavina reduzida para o oxigênio, o que pode resultar na formação de H₂O₂ (Van-Berkel et al., 2006).

As plantas possuem mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos capazes de minimizar os efeitos das ERO (Mittler et al., 2004). Para verificar se a produção de H₂O₂ foi suficiente para desencadear danos oxidativos na célula, foram realizados ensaios para quantificar o nível de peroxidação lipídica e a atividade da enzima POD no extrato de polpa de mamão 'Golden'.

A extensão do estresse oxidativo na célula pode ser determinada pelo aumento na atividade da POD (Barbosa et al., 2014). As peroxidases têm papel importante na desintoxicação celular, pois têm o H₂O₂ como molécula aceitadora de elétrons, reduzindo-o a O₂ e H₂O (Freitas et al., 2008).

De acordo com os resultados demonstrados neste trabalho, a atividade da POD foi maior (P<0,05) no extrato de polpa de mamão 'Golden' incubado com GalL 5 mM (Figura 13), confirmando que a atividade da GalLDH foi responsável

pelo aumento na produção de H_2O_2 , que aumentou a atividade antioxidante. Este resultado demonstra novamente a relação da biossíntese de AA com o aumento na produção de H_2O_2 (Figura 12).

O aumento da atividade enzimática da POD é uma resposta antioxidante, um mecanismo de defesa, para proteger a célula contra os efeitos tóxicos do H_2O_2 , uma vez que este pode dar origem a ERO ainda mais reativas (Ronsein et al., 2006). Checín et al. (2010) estudaram o efeito do estresse hídrico na atividade da POD em folhas de girassol (*Helianthus annuus* L.) cultivadas em casa de vegetação. Os autores observaram que em folhas mais velhas a atividade POD foi importante para manter a integridade da membrana.

Rutschow et al. (2011) sugerem que, baixos níveis de H_2O_2 atuam sinalizando um estado de estresse que desencadeia uma série de mecanismos antioxidantes, os quais podem minimizar o estresse mais intenso, enquanto que níveis mais elevados de H_2O_2 são responsáveis pelos danos oxidativos.

Verificou-se maior peroxidação lipídica no tratamento em que foi incubado H_2O_2 de forma isolada bem como H_2O_2 combinado com GalL (Figura 14). A aplicação exógena de H_2O_2 agiu aumentando a peroxidação lipídica no extrato de polpa de mamão. Sweetlove et al. (2002) utilizaram o H_2O_2 para induzir o estresse oxidativo em células de *Arabidopsis* e revelaram que esse tratamento foi responsável pelo aumento da peroxidação lipídica.

Ao relacionar a atividade da POD com a concentração de MDA, pode-se inferir que o aumento na peroxidação lipídica demonstrado neste trabalho, comprometeu a atividade enzimática da POD devido à elevada concentração de H_2O_2 exógeno, uma vez que em altas concentrações o H_2O_2 pode alterar o potencial da membrana (Dlasková et al., 2010) e diminuir a função mitocondrial associada a danos em proteínas e lipídios (Møller e Kristensen, 2004).

Segundo Checín et al. (2010), a redução na atividade na POD não indica que não houve o estresse oxidativo. Os autores basearam essa afirmação ao quantificar a peroxidação lipídica em folhas de girassol sob estresse hídrico, quando não observaram alteração na atividade da POD, porém verificaram-se níveis elevados de MDA, que indica a ocorrência de danos na membrana (Checín et al., 2010). Os resultados de Checín et al. (2010) podem ser comparados ao observado neste trabalho, em que a indução do estresse provocado pela adição de H_2O_2 pode ter provocado danos na atividade enzimática pelo aumento nos

níveis de MDA. O aumento nos níveis de MDA indica que há a peroxidação lipídica, que leva à perda de fluidez dos lipídios, comprometendo o funcionamento da membrana e da célula (Lima e Abdalla, 2001).

Foram realizados ensaios para determinar a oxidação de proteínas mitocondriais induzidas pela atividade GalLDH. Segundo Møller et al. (2007), as proteínas estão sujeitas à oxidação mesmo em condições ideais. As ERO oxidam as proteínas resultando em modificações destas que, até certo ponto, podem ser usadas na regulação metabólica. Aqui neste trabalho foi quantificado um aumento na oxidação de proteínas no extrato mitocondrial incubado com GalL. Uma hipótese para explicar o aumento no total de proteínas oxidadas por GalL seria devido à atividade da GalLDH.

Os mecanismos de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos mantêm as ERO em um nível baixo, não tóxico para a célula (Mittler 2017). De acordo com Zsigmond et al. (2011), o aumento na biossíntese de AA pela atividade da GalLDH, auxilia na proteção da integridade das membranas mitocondriais e na manutenção do processo respiratório. No entanto, foi demonstrado aqui a ação negativa da atividade da GalLDH. Ao incubar as amostras com GalL, verificou-se através do incremento na produção de H_2O_2 (Figura 12), que a atividade GalLDH, possivelmente, contribuiu para o desequilíbrio entre a produção de ERO e sua eliminação, levando à limitação dos mecanismos de proteção antioxidantes, que desencadeou a oxidação de proteínas mitocondriais (Figura 15).

Aqui não foi verificada diferença nos níveis de proteínas oxidadas pela combinação de GalL com H_2O_2 ou com o inibidor de flavoenzima (DPI). De acordo com Leferink et al. (2009b), a GalLDH pode ser inativada pelo H_2O_2 para proteger contra danos oxidativos *in vitro*. Dessa forma, o resultado aqui verificado sugere que a menor quantidade de proteínas oxidadas nos tratamentos com H_2O_2 e DPI, pode ter sido devido à inativação da GalLDH. Assim sendo, haveria um menor fluxo de elétrons, o que levaria ao citocromo c receber menos elétrons provenientes da oxidação do GalL, se mantendo (o citocromo c) na sua forma oxidada, o que evitaria a super redução da CTE_m (Bartoli et al., 2000).

Sweetlove et al. (2002) observaram que a indução do estresse pela adição de H_2O_2 resultou em redução do consumo de O_2 em mitocôndrias e afetou duas subunidades do complexo I e a ATP sintase, o que impôs restrição ao

transporte de elétrons. Foi demonstrado por Wagner (1995) que a presença de H_2O_2 em células de *Petunia hybrida* induz a expressão da AOX. Aqui neste trabalho, verificou-se que sempre que a via AOX foi inibida houve redução significativa na atividade GalLDH, o que também foi verificado em outros experimentos realizados pelo nosso grupo. Essa redução da atividade da GalLDH que foi induzida pelo bloqueio da AOX, indica que há uma associação metabólica entre a biossíntese de AA e a atividade da GalLDH. Szarka et al. (2013) demonstraram que a atividade da GalLDH é regulada pelo transporte de elétrons a partir do complexo I, que precisa do citocromo c na forma oxidada comoceptor de elétrons. A AOX ao reduzir o sobrefluxo de energia, impede a super redução do citocromo c (Vanlerberghe et al., 2009). Neste trabalho, verificou-se que ao bloquear a via AOX, a atividade da GalLDH foi reduzida. Este resultado pode estar relacionado à sobre redução do citocromo c, que influenciou negativamente no transporte de elétrons. Bartoli et al. (2000) demonstraram que ao utilizar cianeto para bloquear a oxidação do citocromo c pela COX, a biossíntese de AA foi reduzida, enquanto que ao inibir o complexo III, o citocromo c se manteve na forma oxidada, o que aumentou a atividade da GalLDH.

Diante disso, pode-se inferir que a redução mais acentuada das proteínas oxidadas quando aplicado o inibidor da AOX (SHAM) foi devido à redução na atividade da GalLDH, o que resultou em menor produção de H_2O_2 . Sugerindo, com isso, que a atividade da GalLDH e da AOX são fundamentais para a manutenção do metabolismo mitocondrial, tanto no que se refere à biossíntese de AA, quanto na atividade respiratória.

Estudos recentes sobre a localização da GalLDH sugerem que esta enzima está anexada à membrana mitocondrial (Rodríguez-Ruiz et al., 2017) e que sua porção ativa está voltada para o espaço intermembranar da membrana interna da mitocôndria (Yabuta et al., 2000). Assim, sugere-se que a atividade da GalLDH pode ser responsável pela oxidação de proteínas no espaço intermembranar. É importante destacar que, a quantificação de proteínas mitocondriais que foi realizada nesse trabalho, representou apenas o total de proteínas mitocondriais solúveis modificadas por carbonilação em frutos de mamão 'Golden', por meio da reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNP) obtendo seu correspondente 2,4-dinitrofenilhidrazona (Levine et al., 2000; Hawkins et al., 2009). Diante disso, propõem-se estudos mais detalhados para identificar e

caracterizar funcionalmente as proteínas oxidadas, por exemplo, por meio da análise proteômica.

O ponto-chave neste estudo da atividade GaILDH está no fato de ser esta enzima uma desidrogenase que até então apresenta como principal função a síntese de um antioxidante (AA), estar possivelmente apresentando uma função oxidase e contribuindo para o desbalanço no estado redox, isto é, promovendo a produção de radicais livres no meio celular, que de acordo com os dados aqui registrados, resultaram em danos oxidativos.

7. CONCLUSÕES

Neste trabalho observou-se que tanto a atividade da GalLDH, quanto da AOX são fundamentais para a biossíntese de AA.

A produção de H_2O_2 durante a atividade da GalLDH afetou o equilíbrio entre a formação e a remoção de ERO provocando danos oxidativos à célula.

Será preciso estudos complementares, para caracterização funcional das proteínas oxidadas a fim de verificar o efeito dessa oxidação no metabolismo mitocondrial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOObUCKER, S. I., LORENCE, A. (2016). Recent progress on the characterization of aldonolactone oxidoreductases. *Plant Physiology and Biochemistry*, 98:171-185.
- AGIUS, F., GONZÁLEZ-LAMOTHE, R., CABALLERO, J. L., MUÑOZ-BLANCO, J., BOTELLA, M. A., VALPUESTA, V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, 21:177-181.
- ALHAGDOW, M., MOUNET, F., GILBERT, L., NUNES-NESEI, A., GARCIA, V., JUST, D., PETIT J., BEAVOIT, B., FERNIE, A. R., ROTHAN C., BALDET, P. (2007). Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology*, 145:1408-1422.
- APEL, K., HIRT, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55:373-399.
- BARATA-SOARES, A. D. GOMEZ, M. L. P. A. MESQUITA, C. H. LAJOLO, F. M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16:147-154.
- BARBOSA, M. R., SILVA, M. M. D. A., WILLADINO, L., ULISSES, C., CAMARA, T. R. (2014). Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, 44:453-460.
- BARTOLI, C. G., GOMEZ, F., GERGOFF, G., GUIAMÉT, J. J., PUNTARULO, S. (2005). Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56:1269-1276.

- BARTOLI, C. G., PASTORI, G. M., FOYER, C. H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology*, 123:335–344.
- BARTOLI, C. G., YU, J., GOMEZ, F., FERNÁNDEZ, L., MCINTOSH, L., FOYER, C. H. (2006). Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57:1621-1631.
- BLOKHIA, O., FAGERSTEDT, K. V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum* 138:447-462.
- BOLISETTY, S., JAIMES, E. A. (2013). Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14:6306-6344.
- BORSOOK, H., DAVENPORT, H. W., JEFFREYS, C. E., WARNER, R. C. (1937). The oxidation of ascorbic acid and its reduction in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 117:237-279.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- CAKMAK, I., HORST, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83:463-468.
- CAMEJO, D., JIMÉNEZ, A., PALMA, J. M., & SEVILLA, F. (2015). Proteomic identification of mitochondrial carbonylated proteins in two maturation stages of pepper fruits. *Proteomics*, 15:2634-2642.
- CECHIN, I., CORNIANI, N., FUMIS, T. D. F., CATANEO, A. C. (2010). Differential responses between mature and young leaves of sunflower plants to oxidative stress caused by water deficit. *Ciência Rural*, 40:1290-1294.
- CHOUDHURY, S., PANDA, P., SAHOO, L., PANDA, S. K. (2013). Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 8:e23681-1.
- CIRCU, M. L., AW, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 48:749-762.
- CLARKE, K. J., PORTER, R. K. (2013). Uncoupling protein 1 dependent reactive oxygen species production by thymus mitochondria. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45:81-89.

- CONA, A., REA, G., ANGELINI, R., FEDERICO, R., TAVLADORAKI, P. (2006). Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science*, 11:80-88.
- COUTO, M. A. L., CANNIATTI-BRAZACA, S. G. (2010). Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30:15-19.
- DANTAS, J. I. A., PONTES, C. A., LEITE, G. A., DE OLIVEIRA FERNANDES, P. L., DE SOUZA FREITAS, W. E., DE CARVALHO, C. A. C. (2012). Biossíntese de vitaminas em frutos e hortaliças. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 8:22-37.
- DLASKOVÁ, A., CLARKE, K. J., PORTER, R. K. (2010). The role of Ucp 1 in production of reactive oxygen species by mitochondria isolated from brown adipose tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1797:1470-1476.
- DUQUE, P., ARRABAÇA, J. D. (1999). Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. II. Alternative oxidase is induced at the climacteric. *Physiologia Plantarum*, 107:24-31.
- ECHTAY, K. S., BRAND, M. D. (2007) 4-Hydroxy-2-nonenal and uncoupling proteins: an approach for regulation of mitochondrial ROS production, *Redox Report*, 12:26-29.
- ECHTAY, K. S., ROUSSEL, D., ST-PIERRE, J., JEKABSONS, M. B., CADENAS, S., STUART, J. HARPER J. A, ROEBUCK S. J, MORRISON A, PICKERING S, CLAPHAM J. C, BRAND M. D. A. (2002). Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*, 415:96-99.
- ESPINOSA-DIEZ, C., MIGUEL, V., MENNERICH, D., KIETZMANN, T., SÁNCHEZ-PÉREZ, P., CADENAS, S., LAMAS, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, 6:183-197.
- FERREIRA, M. AGUIAR, T. VILARIANO, L. (2008). Aspectos Clínicos, Bioquímicos, Enzimáticos e Moleculares Associados ao Déficit do complexo I. *Arquivos de Medicina*, 22:49-56.
- FIORUCCI, A. R. (2003). A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. *Química Nova na Escola*, São Paulo,17:3-7.
- FOYER, C. H., NOCTOR, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119:355-364.
- FRAAIJE, M. W., SJOLLEMA, K. A., VEENHUIS, M., VAN BERKEL, W. J. (1998). Subcellular localization of vanillyl-alcohol oxidase in *Penicillium simplicissimum*. *FEBS letters*, 22:65-68.

- FREITAS, A. A. D., FRANCELIN, M. F., HIRATA, G. F., CLEMENTE, E., SCHMIDT, F. L. (2008). Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28:172-177.
- GHEZZI, P., BONETTO, V. (2003). Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics*, 3:1145-1153.
- GODOY, A. E. D., JACOMINO, A. P., CERQUEIRA-PEREIRA, E. C., GUTIERREZ, A. D. S. D., VIEIRA, C. E. M., FORATO, L. A. (2010). Injúrias mecânicas e seus efeitos na qualidade de mamões Golden. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32:682-691.
- GONZALEZ-AGUILAR, G. A., BUTA, J. G., WANG, C. Y. (2003). Methyl jasmonate and modified atmosphere packaging (MAP) reduce decay and maintain postharvest quality of papaya 'Sunrise'. *Postharvest Biology and Technology*, 28:361-370.
- HAWKINS, C. L. MORGAN, P. E., DAVIES, M. J. (2009). Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 46:965-988.
- HEYNO, E., MARY, V., SCHOPFER, P., KRIEGER-LISZKAY, A. (2011). Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta*, 234:35-45.
- HUANG, W., LI, D., LIU, Y. (2014). Mitochondrial electron transport chain is involved in microcystin-RR induced tobacco BY-2 cells apoptosis. *Journal of Environmental Sciences*, 26:1930-1935.
- IMAI, T., KARITA, S., SHIRATORI, G. I., HATTORI, M., NUNOME, T., ÔBA, K., HIRAI, M. (1998). L-galactono- γ -lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant and Cell Physiology*, 39:1350-1358.
- IMAI, T., NIWA, M., BAN, Y., HIRAI, M., ÔBA, K., MORIGUCHI, T. (2009). Importance of the l-galactonolactone pool for enhancing the ascorbate content revealed by l-galactonolactone dehydrogenase-overexpressing tobacco plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96:105-112.
- JOSEPH-HORNE, T. I. M., HOLLOMON, D. W., WOOD, P. M. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1504:179-195.
- KAR, M., MISHRA, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57:315-319.
- KOLOSSOV, V. L., BEAUDOIN, J. N., PONNURAJ, N., DILIBERTO, S. J., HANAFIN, W. P., KENIS, P. J., GASKINS, H. R. (2015). Thiol-based antioxidants elicit mitochondrial oxidation via respiratory complex III. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309:C81-C91.

- LEFERINK, N. G. H., VAN DEN BERG, W. A. M., VAN BERKEL, W. J. H. (2008). l-Galactono- γ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS Journal*, 275:713-726.
- LEFERINK, N. G., FRAAIJE, M. W., JOOSTEN, H. J., SCHAAP, P. J., MATTEVI, A., & VAN BERKEL, W. J. (2009a). Identification of a gate keeper residue that prevents dehydrogenases from acting as oxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 284:4392-4397
- LEFERINK, N. G., VAN DUIJN, E., BARENDREGT, A., HECK, A. J., VAN BERKEL, W. J. (2009b). Galactono lactone dehydrogenase requires a redox-sensitive thiol for optimal production of vitamin C. *Plant Physiology*, 150:596-605.
- LEVINE, R. L., WEHR, N., WILLIAMS, J. A., STADTMAN, E. R., SHACTER, E. (2000). Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Stress Response: Methods and Protocols*, 99:15-24.
- LIMA, E. S., ABDALLA, D. S. P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37:293-303.
- LINK, A. J., LABAER, J (2011). Trichloroacetic Acid (TCA) Precipitation of Proteins. *Cold Spring Harbor Protocols*, 6:993-994.
- LIU, Y., FISKUM, G., SCHUBERT, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80:780-787.
- LORENCE, A., CHEVONE, B. I., MENDES, P. NESSLER, C. L. (2004). Myo-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. *Plant Physiology*, 134:1200-1205.
- MARIANO, A. B., VALENTE, C., MAURER, J. B. B., CADENA, S. M. S. C., ROCHA, M. E.M., DE OLIVEIRA, M. B. M., E CARNIERI, E. G. S. (2008). Functional characterization of mitochondria isolated from the ancient gymnosperm *Araucaria angustifolia*. *Plant Science*, 175:701-705.
- MAXWELL, D. P., WANG, Y., MCINTOSH, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:8271-8276.
- MCGUIRE, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27:1254-1255.
- MILLAR, A. H. WHELAN, J. SOOLE, K. L. DAY, D. A. (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62:79-104.
- MILLAR, A. H., MITTOVA, V., KIDDLE, G., HEAZLEWOOD, J. L., BARTOLI, C. G., THEODOULOU, F. L., FOYER, C. H. (2003). Control of ascorbate synthesis by

- respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, 133:443-447.
- MITTLER, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7:405-410.
- MITTLER, R. (2017). ROS are good. *Trends in Plant Science*, 22:11-19.
- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN BREUSEGEM, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9:490-498.
- MOLINARO, E. M. CAPUTO, L. F. G. AMENDOEIRA, M. R. A. (2009). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: *Instituto Oswaldo Cruz*, 4:290p.
- MØLLER, I. M., JENSEN, P. E., HANSSON, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58:459-481.
- MØLLER, I. M., KRISTENSEN, B. K. (2004). Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3:730-735.
- ÔBA, K., ISHIKAWA, S., NISHIKAWA, M., MIZUNO, H., E YAMAMOTO, T. (1995). Purification and properties of l-galactono-g-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *Journal of Biochemistry*, 117:120-124.
- OLIVEIRA, J. G., MORALES, L. M. M., SILVA, G. M. C., SARAIVA, K. D. C., SANTANA, D. B., SANTOS, C. P., OLIVEIRA, M. G., COSTA, J. H. (2017). Procedures of mitochondria purification and gene expression to study alternative respiratory and uncoupling pathways in fruits. In: *Plant Respiration and Internal Oxygen*, 1670:143-165.
- OLIVEIRA, M. G., MAZORRA, L. M., SOUZA, A. F., SILVA, G. M. C., CORREA, S. F., SANTOS, W. C., SARAIVA, K. D. C., TEIXEIRA, A. Jr., MELO, D. F., SILVA M. G., SILVA, M. A. P., ARRABAÇA, J. D. C., COSTA, J.H., OLIVEIRA, J. G. (2015). Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, 189:42-50.
- ORRENIUS, S., GOGVADZE, V., ZHIVOTOVSKY, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47:143-183.
- ØSTERGAARD, J., PERSIAU, G., DAVEY, M. W., BAUW, G., VAN MONTAGU, M. (1997). Isolation of a cDNA coding for l-galactono-γ-gactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants purification characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 272:30009-30016.

- PASTORE, D., TRONO D., LAUS, N. M., FONZO, N. D., FLAGELLA, Z. (2007). Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress: A case study: durum wheat mitochondria. *Journal of Experimental Botany*, 58: 195-210.
- PAULY, N., PUCCIARIELLO, C., MANDON, K., INNOCENTI, G., JAMET, A., BAUDOUIN, E., HÉROUART, D., FRENDON, P., PUPPO, A. (2006). Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume–Rhizobium symbiosis. *Journal of Experimental Botany*, 57:1769-1776.
- PINEAU, B., LAYOUNE, O., DANON, A., DE PAEPE, R. (2008). L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*, 283:32500-32505.
- PINHEIRO, H. A., BORGES, R., E CENTENO, D. C. (2004). Activity of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein in potato tubers stored at low temperature or submitted to artificial aging. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16:69-76.
- PINTO, E., SIGAUD-KUTNER, T., LEITAO, M. A., OKAMOTO, O. K., MORSE, D., COLEPICOLO, P. (2003). Heavy metal–induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, 39:1008-1018.
- POTOCKÝ, M., JONES, M. A., BEZVODA, R., SMIRNOFF, N., ŽÁRSKÝ, V. (2007). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytologist*, 174:742-751.
- PRATES, R.S. (2005). Aspectos operacionais do programa de exportação do mamão brasileiro para os Estados Unidos: sete anos de sucesso. In.: Martins, D.S. *Papaya Brasil. Mercado e Inovações Tecnológicas para o Mamão*. Vitória, ES: Incaper, 57-78.
- QUINLAN, C. L., ORR, A. L., PEREVOSHCHIKOVA, I. V., TREBERG, J. R., ACKRELL, B. A., BRAND, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 287:27255-27264.
- RIBAS, V., GARCÍA-RUIZ, C., FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5:1-19.
- RIGANTI, C., GAZZANO, E., POLIMENI, M., COSTAMAGNA, C., BOSIA, A., GHIGO, D. (2004). Diphenyliodonium inhibits the cell redox metabolism and induces oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279:47726-47731.
- RITZINGER, C. H. S. P., SOUZA, J. S. (ORG.) (2000). Mamão: Fitossanidade. *Embrapa Mandioca e Fruticultura*, Cruz das Almas, BA: 91p.

- RODRÍGUEZ-RUIZ, M., MATEOS, R. M., CODESIDO, V., CORPAS, F. J., PALMA, J. M. (2017). Characterization of the galactono-1, 4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox Biology*, 12:171-181.
- RONSEIN, G. E., MIYAMOTO, S., BECHARA, E., DI MASCIO, P., MARTINEZ, G. R. (2006). Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29:563-568.
- ROSSI, C., LIMA, G. P. P., HAKVOORT, D. M. R. (1997). Atividade de peroxidases (EC 1.11. 1.7) e teor de prolina em feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. *Scientia agricola*, 54:123-127.
- RUTSCHOW, H. L., BASKIN, T. I., KRAMER, E. M. (2011). Regulation of solute flux through plasmodesmata in the root meristem. *Plant Physiology*, 155:1817-1826.
- SZARKA, A., BÁNHEGYI, G., ASARD, H. (2013). The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19:1036-1044.
- SCHERTL, P., SUNDERHAUS, S., KLODMANN, J., GROZEFF, G. E. G., BARTOLI, C. G., BRAUN, H. P. (2012). L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of three subcomplexes of mitochondrial complex I in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 287:14412-14419.
- SCHIMMEYER, J., BOCK, R., MEYER, E. H. (2016). L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 90:117-126.
- SHARMA, P. JHA, A. B. DUBEY, R. S. PESSARAKLI, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012:1-26.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. (2016). The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. *African Journal of Agricultural Research*, 39:3733-3740.
- SILVA, G. M. C. (2016). O Papel dos Complexos Respiratórios da Cadeia Transportadora de Elétrons na Síntese e Acúmulo do Ácido Ascórbico em Mitocôndrias de Frutos. Tese (Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 185p.
- SILVA, L. R. A., SILVA, G. M. C., SILVA, W. B., CLÁUDIO, L. M. D. S., DE OLIVEIRA, J. G. (2015). Atividade Respiratória em Mitocôndrias Isoladas da Polpa do Mamão Uenf/Caliman 01 e Tainung 01 na Conservação do Fruto em Pós-Colheita. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 37:296-307.

- SINHA, K., DAS, J., PAL, P. B., SIL, P. C. (2013). Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology*, 87:1157-1180.
- SMIRNOFF, N. (2001). L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitamins & Hormones*, 61:241-266.
- SOARES, A. M. DOS S., MACHADO, O. L. T. (2007). Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, 1:1-10.
- SOUZA, A. F., SILVA, W. B., GONÇALVES, Y. S., SILVA, M. G., OLIVEIRA, J. G. (2014). Fisiologia do amadurecimento de mamões de variedades comercializadas no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36:34-44.
- SPÍNOLA, V., MENDES, B., CÂMARA, J. S., CASTILHO, P. C. (2013). Effect of time and temperature on vitamin C stability in horticultural extracts. UHPLC-PDA vs iodometric titration as analytical methods. *LWT-Food Science and Technology*, 50:489-495.
- SWEETLOVE, L. J., HEAZLEWOOD, J. L., HERALD, V., HOLTZAPFFEL, R., DAY, D. A., LEAVER, C. J., MILLAR, A. H. (2002). The impact of oxidative stress on Arabidopsis mitochondria. *The Plant Journal*, 32:891-904.
- TABATA, K. TAKAOKA, T. ESAKA, M. (2002). Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry*, 6:631-635.
- TAIZ, L., ZEIGER, E., (2013). Fisiologia Vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 918p.
- TAULAVUORI, E., HELLSTRÖM, E. K., TAULAVUORI, K., LAINE, K. (2001). Comparison of two methods used to analyse lipid peroxidation from *Vaccinium myrtillus* (L.) during snow removal, reacclimation and cold acclimation. *Journal of Experimental Botany*, 52:2375-2380.
- TURRENS, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552:335-344.
- UPADHYAYA, C. P., YOUNG, K. E., AKULA, N., SOON KIM, H., HEUNG, J. J., OH, O. M., ASWATH, C. R., CHUN, S. C.; KIM, D. H., CPARK, S. W. (2009). Over-expression of strawberry D-galacturonic acid reductase in potato leads to accumulation of vitamin C with enhanced abiotic stress tolerance. *Plant Science*, 177:659-667.
- VAN BERKEL, W. J. H., KAMERBEEK, N. M., FRAAIJE, M. W. (2006). Flavoprotein monooxygenases, a diverse class of oxidative biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 124:670-689.
- VAN-AKEN, O., GIRAUD, E., CLIFTON, R., WHELAN, J. (2009). Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiologia plantarum*, 137:54-361.

- VANLERBERGHE, G. C. (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 6805-6847.
- VANLERBERGHE, G. C., CVETKOVSKA, M., WANG, J. (2009). Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase. *Physiologia Plantarum*, 137:392-406.
- VENKATESH, J., PARK, S. W. (2014). Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies*, 55:1-19.
- WAGNER, A. M. (1995). A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *Febs Letters*, 368:339-342.
- WHEELER, G. L. JONES, M. A. J. SMIRNOFF, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393:365-369.
- WOLUCKA, B. A., VAN MONTAGU, M. (2003). GDP-mannose 3', 5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 278:47483-47490.
- YABUTA, Y., YOSHIMURA, K., TAKEDA, T., SHIGEOKA, S. (2000). Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono- γ -lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant and Cell Physiology*, 41:666-675.
- ZEEVALK, G. D., MANZINO, L., SONSALLA, P. K., BERNARD, L. P. (2007). Characterization of intracellular elevation of glutathione (GSH) with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures: relevance to Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 203:512-520.
- ZHANG, J., LI, B., YANG, Y., MU, P., QIAN, W., DONG, L., ZHANG K., LIU, X., QIN, H., LING, H., WANG, D. (2016). A novel allele of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase is associated with enhanced drought tolerance through affecting stomatal aperture in common wheat. *Scientific Reports*, 6:30162-30177.
- ZSIGMOND, L., TOMASSKOVICS, B., DEÁK, V., RIGÓ, G., SZABADOS, L., BÁNHEGYI, G., SZARKA, A. (2011). Enhanced activity of galactono-1, 4-lactone dehydrogenase and ascorbate–glutathione cycle in mitochondria from Complex III deficient Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49:809-815.
- ZWACKA, R. M., DUDUS, L., EPPERLY, M. W., GREENBERGER, J. S., ENGELHARDT, J. F. (1998). Redox gene therapy protects human IB-3 lung epithelial cells against ionizing radiation-induced apoptosis. *Human Gene Therapy*, 9:1381-1386.