



Detecção de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias de mamão por ressonância paramagnética eletrônica

Francine Aparecida Fernandes Menezes, Jurandi Gonçalves de Oliveira, André Oliveira Guimarães

Durante a última década, o estudo de espécies reativas de oxigênio (ERO) em sistemas vegetais tem ganhado destaque. Nas plantas, a redução parcial do oxigênio molecular (O_2) leva à produção de ERO em diversas organelas. As mitocôndrias são uma importante fonte de ERO, principalmente devido ao compartilhamento de elétrons na cadeia de transporte de elétrons (CTE), reduzindo o O_2 a radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O $O_2^{\cdot-}$ interage com outras moléculas dando origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO^{\cdot}$). Quando há um acúmulo de ERO e os mecanismos de defesa antioxidantes ficam sobrecarregados ocorre, então, o estresse oxidativo, resultando em dano celular. Estudos recentes sugerem que as ERO também podem atuar como moléculas sinalizadoras, desempenhando um importante papel no desenvolvimento, amadurecimento e senescência dos frutos. Muitos estudos investigam a geração de ERO em plantas, mas a análise da localização *in situ* em organelas é incomum, sendo essencial para o avanço da pesquisa. A principal dificuldade na detecção de ERO é seu tempo de vida extremamente curto. Neste contexto, a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma ferramenta importante para a detecção de ERO quando aplicado o método *spin trapping*, no qual compostos específicos (*spin traps*) são usados para reagir com as ERO, formando radicais estáveis (*spin adducts*). A RPE detecta diretamente elétrons desemparelhados por meio de absorção de micro-ondas devida à aplicação de campo magnético. O objetivo deste trabalho é explorar a técnica de RPE e o método *spin trapping* para investigar a geração de ERO em mitocôndrias de mamão durante o amadurecimento do fruto, e os resultados iniciais serão apresentados. As ERO foram geradas, primeiramente, de forma controlada no laboratório. Este primeiro ensaio foi projetado para otimizar as condições experimentais e assim estabelecer protocolos para a detecção das ERO. Na produção controlada de ERO, utilizamos os *spin traps* DMPO (5,5'-dimetil-pirrolina-N-óxido), PBN (α -fenil N-terc-butilnitrona) e 4-POBN (α -(4-piridil-1-óxido)-N-terc-butilnitrona) para detectar e monitorar radicais hidroxila e superóxido, gerados a partir da reação Fenton e do superóxido de potássio (KO_2) em solvente aprótico (pH 7,4), respectivamente. Além disso, serão apresentadas as simulações computacionais dos espectros e os aspectos teóricos envolvendo as interações hiperfinas que permitem a identificação das ERO. Este trabalho contribuirá para aprimorar e ampliar o uso da RPE em estudos com tecidos vegetais, além de fornecer informações sobre a geração de ERO em mitocôndrias vegetais, contribuindo para o avanço desse campo de pesquisa.

Palavras-chave: Radicais livres, Hidroxila, Superóxido, Spin trapping, Desenvolvimento do fruto.

Instituição do Programa: UENF, PPGCN.

Instituições de fomento: CAPES, CNPq, FAPERJ, UENF.



Detection of reactive oxygen species in papaya mitochondria by electron paramagnetic resonance

Francine Aparecida Fernandes Menezes, Jurandi Gonçalves de Oliveira, André Oliveira Guimarães

During the last decade, there has been growing interest in the study of reactive oxygen species (ROS) in plant systems. In plant, the partial reduction of molecular oxygen (O_2) leads to the production of ROS in several organelles. Mitochondria are an important source of ROS, mainly due to the leakage of electrons in the electron transport chain (ETC), reducing the O_2 to the superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$). $O_2^{\cdot-}$ interacts with other molecules giving rise to hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$). When there is excess of ROS and the antioxidant defenses are overwhelmed, oxidative stress occurs, resulting in cell damage. Nevertheless, the idea of ROS as merely damaging molecules has changed. Recent studies suggest that ROS act as signaling metabolites and can play important role in the development, ripening and senescence of fruit. Many studies are dedicated to investigate the generation of ROS in plants, but the analysis of in situ location in organelles is uncommon, being essential for the advancement in research. The main difficulty in detecting ROS is their extremely short lifetime. On the other hand, the electron paramagnetic resonance (EPR) technique is a very important tool for the detection of ROS when applying the spin trapping method, in which specific compounds (spin traps) are used to react with ROS forming stable radicals (spin adducts). EPR directly detects unpaired electrons by means of microwave absorption due to magnetic field application. The aim of this work is to explore the EPR with spin trapping to investigate the ROS generation in papaya mitochondria during fruit ripening, and the initial results will be presented. The ROS were generated, first, in a controlled way in the laboratory. This first assay was designed to optimize the experimental conditions and thus to establish protocols for the ROS detection. In controlled production of ROS, we use the DMPO (5,5'-dimethyl-pyrroline-N-oxide), PBN (α -phenyl N-tert-butyl nitron) and 4-POBN (α -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron) spin traps in order to detect and monitor hydroxyl and superoxide radicals, generated from Fenton reaction and potassium superoxide (KO_2) in aprotic solvent (pH 7.4), respectively. Furthermore, the computational simulations of the spectra will be presented, as well as the theoretical aspects involving hyperfine interactions that allow the identification of different ROS. This work will contribute to improve and expand the use of EPR in studies with plant tissues, in addition to provide information on the generation of ROS in plant mitochondria, contributing to the advancement in this field of research.

Keywords: Free radicals, Hydroxyl, Superoxide, Spin trapping, Fruit development.

Program Institution: UENF, PPGCN.

Fomentation institutions: CAPES, CNPq, FAPERJ, UENF.