

**O PAPEL DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA  
TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS NA SÍNTESE E ACÚMULO  
DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM MITOCÔNDRIAS DE FRUTOS**

**GLÁUCIA MICHELLE COSME SILVA**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MAIO – 2016**

**O PAPEL DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA  
TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS NA SÍNTESE E ACÚMULO  
DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM MITOCÔNDRIAS DE FRUTOS**

**GLÁUCIA MICHELLE COSME SILVA**

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal”.

ORIENTADOR: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
MAIO – 2016

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

147/2016

Silva, Gláucia Michelle Cosme

O papel dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na síntese e acúmulo do ácido ascórbico em mitocôndrias de frutos / Gláucia Michelle Cosme Silva. – Campos dos Goytacazes, 2016.

ix. 184 f.:il.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) -- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento Vegetal. Campos dos Goytacazes, 2016.

Orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Coorientador: Luís Miguel Mazorra Morales

Área de concentração: Produção vegetal.

Bibliografia: f. 149-170

1. ÁCIDO ÁSCORBICO 2. L-GALACTONA 1,4 LACTONA DESIDROGENASE 3. MITOCÔNDRIA 4. FRUTOS I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Laboratório de Melhoramento Vegetal II.  
Título

CDD

631.52

**O PAPEL DOS COMPLEXOS RESPIRATÓRIOS DA CADEIA  
TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS NA SÍNTESE E ACÚMULO  
DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM MITOCÔNDRIAS DE FRUTOS**

**GLÁUCIA MICHELLE COSME SILVA**

“Tese 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 Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 20 de maio de 2016

Comissão Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Claudete Santa Catarina (D<sup>a</sup>.Sc., Biotecnologia) – UENF

---

Prof. Eldo campos (D.Sc., Biotecnologia e Biociências) – UFRJ

---

Luis Miguel Mazorra Morales (D.Sc. Ciências Biológicas)

---

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

## **DEDICO E OFEREÇO**

Aos meus pais Jair e Zelita, com todo meu amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida. Desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por se fazer presente em todos os momentos certos ou incertos da minha vida, pois ao longo do caminho dessa jornada pude sentir a tua mão na minha, transmitindo-me segurança necessária para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, Renata e Hugo; continuem assim, sendo sensacionais amigos, companheiros, aos quais sinto um conforto e confiança para confiar minha vida.

Ao professor Jurandi Gonçalves de Oliveira, por toda orientação, ensinamentos, compreensão, amizade e confiança demonstrados ao longo desses anos de trabalho e convivência.

Ao Luís Miguel Mazorra Morales, por todo aprendizado, amizade, apoio e incentivo nas minhas atividades acadêmicas durante todo o tempo da minha formação.

Ao meu grande amigo William Batista Silva, pelo incentivo e amizade, que mesmo de longe sempre se fez presente em minha vida.

A Lúgia Renata, pela amizade e companheirismo, só nós duas sabemos as horas que passamos juntas tentando ajustar protocolos.

Ao Diederson Bortolini Santana, pela amizade por ter feito parte da minha formação e ajuda durante todo o trabalho.

Ao André Vicente, pela amizade e ajuda durante todo o trabalho.

Ao Marcos Góes de Oliveira, que mesmo de longe sempre me ajudou quando precisei da sua ajuda.

E a todos os meus colegas e amigos de laboratório que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse sonho, em especial ao Fábio, Ygor e o Anderson.

Ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal, por ter concedido a oportunidade para a realização desse projeto.

A Caliman pelo fornecimento dos frutos de mamão durante a execução do trabalho.

Ao pesquisador Pierre Baldet do Institut National de La Recherche Agronomique, Université Bordeaux, França, por gentilmente ter cedido as sementes de tomate.

A FAPERJ pela concessão da bolsa.

A UENF pela oportunidade da realização desse sonho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Importância e função do ácido ascórbico .....	4
2.2. Radicais livres e antioxidantes .....	6
2.3. Cofator enzimático .....	9
2.4. Crescimento e desenvolvimento das plantas .....	9
2.5. Processos de biossíntese, transporte, reciclagem e degradação do ácido ascórbico AA em plantas .....	12
2.5.1 Biossíntese.....	12
2.5.2 Transporte.....	16
2.5.3. Transporte intracelular .....	16
2.5.4 Transporte intercelular .....	17
2.5.5. Reciclagem .....	18
2.5.6. Degradação.....	20
2.6. Interação entre a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e a síntese de AA.....	22
2.6.1 Oxidação da L-galactona-1,4 lactona em mitocôndrias .....	22
2.6.2 Transporte de elétrons e fosforilação oxidativa em mitocôndrias.....	23
2.7. L-gactona 1,4- lactona desidrogenase .....	28

2.8. Processos de amadurecimento e metabolismo de AA em frutos .....	31
2.9. Etileno .....	33
2.10. Padrões respiratórios climatérico e não climatérico.....	34
2.11. Respiração.....	36
2.12. Teores de AA em frutos .....	37
3. OBJETIVOS .....	39
3.1. Objetivos específicos .....	39
4. TRABALHOS .....	40
4.1. Influência da L-galactona-1,4- lactona desidrogenase na cadeia transportadora de elétrons .....	40
RESUMO .....	40
ABSTRACT .....	42
INTRODUÇÃO .....	43
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Frutos.....	45
Mamão .....	45
Morango.....	46
Tomate.....	46
Padronização dos estádios de amadurecimento.....	47
Isolamento de Mitocôndrias .....	48
Mamão .....	48
Morango.....	48
Tomate.....	49
Determinação da integridade de membrana .....	49
Determinação da concentração de proteínas .....	50
Atividade respiratória em mitocôndrias isoladas de frutos .....	50
Efeito do GalL na capacidade das vias respiratórias .....	51
Efeito do AA na capacidade das vias respiratórias .....	52
Análises estatísticas.....	52
RESULTADOS.....	53
Padronização dos estádios de amadurecimento.....	53
Atividade Respiratória em Mitocôndrias Isoladas.....	57
Mamão .....	57
Morango.....	59

Efeito do GalL e AA na capacidade das vias respiratórias.....	60
Efeito do GalL nas vias respiratórias em frutos de tomate com linhas transgênicas com a GalLDH silenciada e tipo selvagem.....	77
DISCUSSÃO.....	88
CONCLUSÃO.....	96
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
4.2. Influência do transporte de elétrons na capacidade de síntese e acumulação de AA em mitocôndrias de frutos.....	102
RESUMO.....	102
ABSTRACT.....	104
INTRODUÇÃO.....	105
MATERIAL E MÉTODOS.....	107
Frutos.....	107
Mamão.....	107
Morango.....	108
Tomate.....	108
Padronização dos estádios de amadurecimento.....	109
Isolamento de Mitocôndrias.....	110
Mamão.....	110
Morango.....	110
Tomate.....	111
Determinação da integridade de membrana.....	112
Determinação da concentração de proteínas.....	112
Efeito dos inibidores do complexo I, III e AOX na atividade da GalLDH.....	113
Efeito dos substratos e bloqueadores respiratórios na acumulação do AA em mitocôndrias isoladas.....	113
Efeito dos substratos respiratórios na acumulação do AA em mitocôndrias isoladas.....	113
Efeito dos bloqueadores do complexo II e AOX na acumulação do AA nas mitocôndrias.....	114
Análises Estatísticas.....	115
RESULTADOS.....	116
Padronização dos estádios de amadurecimento.....	116

Efeito dos bloqueadores dos complexos I, III e AOX na atividade da enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase .....	120
Efeito dos substratos e bloqueadores respiratórios na acumulação do AA em mitocôndrias isoladas.....	124
DISCUSSÃO .....	134
CONCLUSÃO .....	140
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	140
5. RESUMO E CONCLUSÕES .....	146
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	149

## RESUMO

SILVA, Gláucia Michelle Cosme. D. Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio de 2016. O papel dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na síntese e acúmulo do ácido ascórbico em mitocôndrias de frutos. Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira. Co-orientador: Luis Miguel Mazorra Morales.

A enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) tem participação fundamental na síntese do AA em plantas, ao catalisar o passo final da síntese do AA. O presente trabalho tem como objetivo verificar a atividade da enzima GalLDH e sua relação com a atividade respiratória no metabolismo mitocondrial, principalmente no que se refere à síntese e acumulação de AA, em função da participação dos complexos respiratórios e a capacidade da via respiratória alternativa (dado pela atividade da oxidase alternativa - AOX) em mitocôndrias de frutos. A evolução do amadurecimento dos frutos foi acompanhada pelas análises dos parâmetros de cor, luminosidade da casca ( $L^*$ ) e ângulo de cor *hue*, firmeza do fruto e teor de sólidos solúveis (SS), juntamente com a avaliação da atividade respiratória e atividade da GalLDH, associada ao acúmulo de AA em mitocôndrias isoladas da polpa dos frutos. Os resultados mostraram um aumento na participação da AOX e diminuição da COX em mitocôndrias isoladas dos frutos de mamão, com diminuição da atividade respiratória durante a evolução no amadurecimento dos frutos. Em frutos de morangueiro os resultados mostraram

que não houve atividade da AOX, sendo a taxa respiratória total resultante da atividade da COX. Na respiração mediada pela oxidação do precursor do AA, o L-galactono-1,4-lactona (GalL), foi possível observar que em mitocôndrias pré-tratadas com o GalL a taxa respiratória manteve-se constante não sendo verificado bloqueio das vias COX e AOX, na presença dos seus respectivos bloqueadores, em frutos de mamoeiro e morangueiro. Por outro lado, nas mitocôndrias isoladas de polpa de mamão sem o pré-tratamento com o GalL, apresentaram bloqueio da atividade respiratória na presença dos respectivos bloqueadores das vias AOX e COX, independentemente do substrato respiratório utilizado. Diferentemente do observado em mamão, em morango verificou-se queda na taxa respiratória, mas não o bloqueio total da COX, sendo verificado consumo de O<sub>2</sub>. Nas linhas transgênicas com a GalLDH silenciada, verifica-se o bloqueio das vias COX e AOX, apresentando inibição da taxa respiratória em mitocôndrias pré-tratadas ou sem o pré-tratamento com o GalL. Nesse material observou-se o acúmulo de AA semelhante ao registrado para o tipo selvagem. Os resultados mostraram que a atividade GalLDH é influenciada pela AOX, uma vez que o bloqueio da AOX inibe a atividade da enzima, sendo isso verificado mesmo nas linhas transgênicas com a GalLDH silenciada. Foi verificado o aumento da síntese e acumulação de AA com a adição dos substratos respiratórios (NADH 8 mM, piruvato 20 mM, glutamato 20mM, succinato 15 mM e malato 10 mM) em frutos de mamoeiro e morangueiro, sendo demonstrado maior acúmulo com a utilização do piruvato em todos os tempos de incubação avaliados, seguido pelo glutamato. Também foi verificado que o bloqueio da AOX resultou na redução do acúmulo total de AA e atividade da GalLDH. De modo geral, este trabalho apresenta resultados surpreendentes com a atividade GalLDH influenciando na atividade respiratória. Outros estudos mais detalhados serão necessários a fim de esclarecer quais os mecanismos que impedem o bloqueio das oxidases terminais, ou a possível existência de um mecanismo ainda desconhecido capaz de consumir O<sub>2</sub>, mesmo na presença dos bloqueadores da COX e AOX.

## ABSTRACT

SILVA, Gláucia Michelle Cosme. D.Sc., State University of Norte Fluminense. May 2016. The role of respiratory chain complex electron carrier in synthesis and acid ascorbic accumulation in fruit mitochondria. Advisor: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira. Co-supervisor: Luis Miguel Mazorra Morales.

The enzyme L-galactono 1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) has a fundamental role in the AA synthesis in plants, by catalyzing the final step of AA synthesis. This study aims at determining the GalLDH enzyme activity and its relationship with the respiratory activity in mitochondrial metabolism, especially with regard to the AA synthesis and accumulation and the participation of the respiratory complexes and alternative respiration pathway (given by the alternative oxidase activity - AOX) in fruit mitochondria. Progress of fruit ripening was accompanied by analyzes of color parameters, skin brightness, ( $L^*$ ) hue color angle, fruit firmness, soluble solids (SS), together with the assessment of respiratory and GalLDH activities associated with the AA accumulation in mitochondria isolated from fruit pulp. The results showed an increase in the participation of AOX and decreased COX in mitochondria isolated from papaya fruit, with decreased respiratory activity during fruit ripening. In strawberry fruit results showed AOX activity absent and the total respiratory rate resulted from COX activity. For the respiration mediated by L-galactono 1,4-lactone (GalL), AA precursor oxidation, it was observed that respiratory rate remained constant in mitochondria pre-treated with GalL, not being

verifying the blocking of the COX and AOX pathways in the presence of the respective blockers, in papaya and strawberry fruits. On the other hand, mitochondria isolated from papaya pulp without pre-treatment with gall showed blockage of respiratory activity in the presence of the respective blocking of AOX and COX pathways, regardless of the respiratory substrate used. Unlike what was observed in papaya, a decrease in respiratory rate found in strawberry, but not a full blockage of COX, showing respiratory rate. In transgenic lines with GalLDH silenced results showed blockage of COX and AOX pathways, showing inhibition of respiratory rate in mitochondria pre-treated or without pretreatment with Gall. It was observed in transgenic lines AA accumulation similar to wild type. The results showed that the GalLDH activity is influenced by AOX, demonstrating that blockade of AOX inhibits enzyme activity. This occurs even in the transgenic lines with GalLDH silenced. It was found increased AA synthesis and accumulation with the addition of respiratory substrates (NADH 8 mM pyruvate, 20 mM glutamate 20 mM succinate 15 mM malate 10mM) in papaya and strawberry fruits. , and demonstrated greater accumulation using pyruvate at all incubation times evaluated, followed by glutamate. It was also found that blocking the AOX resulted in reduced total AA accumulation and GalLDH activity. Overall, this work presents surprising results with GalLDH activity influencing the respiratory activity. More detailed studies are needed to clarify better the mechanisms that prevent the blocking of terminal oxidases reducing  $O_2$  to  $H_2O$ , or the possible existence of an unknown mechanism still able to carry out this process. Blocking AOX affects the activity and the total AA accumulation. Other work must be performed in order to evaluate the responses and identify the types of mechanisms.

## 1. INTRODUÇÃO

O ascorbato ou ácido ascórbico (AA) desempenha funções importantes no metabolismo vegetal com atividade antioxidante e como cofator enzimático e no crescimento e desenvolvimento das plantas (Conklin et al., 1996; Szarka et al., 2012).

Dentre as funções atribuídas ao AA inclui a participação em quase todos os aspectos da biologia vegetal como, mitose e expansão celular (Tabata et al., 2001), morte celular programada (De Pinto et al., 2006), proteção contra estresses ambientais, incluindo o ozônio, radiação UV (Conklin et al., 1996), altas temperaturas (Larkindale et al., 2005), alta intensidade de luz (Muller-Moule et al., 2002). O AA tem participação no crescimento vegetal (Pignocchi e Foyer, 2003), em respostas hormonais, na floração e senescência (Barth et al., 2006), estresse oxidativo e exposição a poluentes (Lee e Kader, 2000) e defesa contra agentes patogênicos (Pavet et al., 2005).

A síntese de AA é influenciada pelo metabolismo do carbono, através do processo fotossintético e tempo de exposição ao sol. Embora a síntese do AA não seja dependente diretamente da luz, o processo fotossintético e o tempo de exposição, assim como a intensidade de luz, influenciam na capacidade de síntese do AA durante o estágio de crescimento podendo sofrer alterações no acúmulo do AA produzido (Lee e Kader, 2000). O AA é sintetizado a partir de açúcares fornecidos através da fotossíntese em plantas. As frutas produzidas na região externa da copa que estão expostas à luz solar máxima contêm maior

quantidade de AA do que aquelas produzidas no interior da copa e as que estão sombreadas na mesma planta. Em geral, quanto menor for à intensidade da luz durante o crescimento, menor o teor de AA nos tecidos vegetais (Harris, 1975).

As variações no teor de AA de acordo com a umidade relativa estão relacionadas à temperatura, altas temperaturas e umidade relativa baixa podem resultar em perdas diretas devido à perda de água, tais como sabor e qualidade nutricional (Lee e Kader, 2000). Kader e Morris, (1978) constatou que tomates armazenados em temperaturas de 30 e 40 ° C e umidade relativa de 60 e 50% resultaram em uma perda de cerca de 5 e 12% no teor de AA, respectivamente.

O AA é o principal soluto dos frutos capaz de promover a solubilização não enzimática da pectina na parede celular *in vitro*. Assim, o AA pode contribuir juntamente com mecanismos mediados por proteínas que envolvem hidrolases, transglicolases e expansinas, que influenciam no abrandamento da polpa dos frutos (Dumville e Fry, 2003). Em frutos, o teor de AA é muito variável, dependendo de vários fatores, como espécie, variedade e condições de cultivo e colheita (Bartoli et al., 2005; Ishikawa et al., 2006).

Esta variação é diferente entre frutos durante a fase de amadurecimento ou armazenamento dos mesmos. Durante o amadurecimento, o teor de AA pode aumentar como no caso do kiwi e mamão, diminuir como no caso da acerola ou permanecer inalterado como ocorre no morango (Lee e Kader, 2000; Cordenunsi et al., 2002; Oliveira et al., 2009). Sendo que o teor de AA em certas frutas é resultante da combinação de vários processos como a biossíntese, reciclagem e transporte do AA, sendo que a contribuição de cada um destes processos no acúmulo de AA durante o amadurecimento ainda precisa ser melhor esclarecida.

Millar et al. (2003) mostraram pela primeira vez que a respiração pode ser controlada pela síntese do AA em plantas. A evidência para este controle da respiração é fornecida pela localização da GalLDH, a enzima terminal da biossíntese de AA, localizada na membrana interna da mitocôndria próximo ao complexo I (Siendones et al., 1999; Bartoli et al., 2000).

O silenciamento do gene que codifica a GalLDH em tomate não afeta a concentração do AA, indicando que a atividade da GalLDH não é limitante para o acúmulo do AA no fruto (Alhagdow et al., 2007). No entanto, as plantas que tiveram o gene da GalLDH silenciadas possuem um crescimento claramente retardado e produzem frutos menores, além de apresentarem alterações

significativas no transporte de elétrons nas mitocôndrias dessas plantas. Concluiu-se que outros processos, além da formação do AA, são regulados pela atividade da GalLDH (Alhagdow et al., 2007).

Também já foi verificado que a GalLDH é regulada pelo transporte de elétrons a partir do complexo I (Szarka et al., 2013), em virtude da disponibilidade do citocromo C na forma oxidada como aceitador de elétrons (Szarka et al., 2013) e pela via alternativa da respiração, a partir da atividade da AOX (Bartoli et al., 2006). A via AOX também regula o estado de alta energia da membrana, consumindo elétrons e impedindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) na mitocôndria. A proximidade entre a síntese de AA e a atividade da AOX sugere uma interação no âmbito da cadeia transportadora de elétrons (CTE) na mitocôndria, possivelmente para proteger as células contra a oxidação não controlada (Foyer e Noctor, 2005).

Em trabalho realizado com várias intensidades de luz e plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com linhas antisense da AOX, assim como usando linhas com aumento da expressão da AOX, Bartoli et al. (2006) mostraram que tanto em folhas inteiras como em mitocôndrias isoladas o acúmulo e a síntese de AA foi mais elevado em plantas onde a capacidade da AOX era mais elevada, independente da intensidade luminosa.

Em frutas, a regulação do AA é muito complexa, devido a vários mecanismos, como a biossíntese, regulação e sua interação com a atividade respiratória. Isso estimula uma linha de investigação que busca entender a influência da síntese de AA na respiração e seus efeitos sobre as variações nos níveis de AA acumulados em frutos.

Dentro dessa linha de investigação algumas hipóteses são propostas como: i) a síntese de AA é mantida por uma rota alternativa em mitocôndrias de frutas? ii) a atividade da enzima GalLDH influencia no fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial? Essas duas hipóteses são testadas e os dados apresentados na forma de um artigo científico apresentado como capítulo I. Outra hipótese a ser testada é iii) qual(is) o(s) efeito(s) das alterações no transporte de elétrons na CTE mitocondrial na capacidade de síntese e acumulação de AA em mitocôndrias de frutas? Essa última hipótese é testada e seus dados são apresentados na forma de outro artigo científico apresentado como capítulo II.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

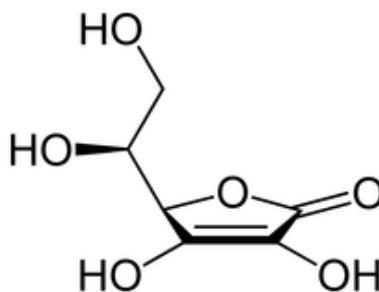
### 2.1. Importância e função do ácido ascórbico

O AA inicialmente era considerado um antioxidante simples ou apenas um cofator para reações de hidroxilação. No entanto, este ponto de vista foi radicalmente alterado por várias outras funções atribuídas ao AA que foram descobertas nas últimas duas décadas (Szarka et al., 2013).

As primeiras evidências da ação do AA mostravam que compostos fisiologicamente ativos, isolados a partir de vegetais e que foram chamados de “cristais de ácido hexurônico” (Svent-Gyorgyi, 1930), foram posteriormente atribuídos ao AA, encontrado em isolados de suco de limão (Waugh e King, 1932).

A estrutura do AA foi determinada pela primeira vez em 1932 e a síntese química alguns meses depois (Reichstein et al., 1933). No entanto, apenas nos últimos 25 anos que as diversas funções biológicas do AA em animais e plantas têm sido demonstradas.

O AA, de fórmula química,  $C_6H_8O_6$ , cuja estrutura pode ser observada na Figura 1 é um dos compostos químicos mais simples, sendo denominado como 2-oxi-L-treohexônio-1,4-lactona-2,3-enediol formado a partir de um açúcar hexose, tendo o grupo enediol nos átomos de carbono 2 e 3, o que o torna responsável por suas propriedades ácidas e redutoras, pois pode se ionizar e doar elétrons (Herbert et al., 1933).



**Figura 1.** Estrutura química do ácido ascórbico

De modo geral, o AA desempenha funções importantes, sendo abundante em plantas, onde tem um papel como um tampão redox e cofator enzimático. Seu papel na fotoproteção é bem estabelecido (Muller-Moule et al., 2002; Muller-Moule et al., 2004), enquanto novas funções em processos redox estão relacionadas com o crescimento celular, respostas hormonais (Pignocchi e Foyer, 2003), respostas programadas de morte celular, de senescência e de ataque de patógeno (Pastori et al., 2003; Barth et al., 2004; Chen e Gallie, 2004; Vacca et al., 2004) estão se tornando evidentes.

O AA também é fortemente associado com a fotossíntese e a respiração. A razão é que uma compreensão do metabolismo do AA na planta poderia ser útil para melhorar os métodos de produção baseada em transformações microbianas (Hancock e Viola, 2002, Running et al., 2004).

As plantas e a maioria dos animais podem sintetizar o AA, no entanto, algumas espécies de mamíferos, incluindo seres humanos e primatas, perderam esta capacidade (Nishikimi et al., 1994, Cui et al., 2011), por falta da L-gulono-1,4-lactona oxidase, uma enzima essencial para a sua síntese. A consequência disso para os seres humanos é que a deficiência de AA pode resultar em doenças, como o escorbuto que é letal se não tratada (Diplock et al., 1998). Estudos anteriores também demonstraram que o AA está envolvido na prevenção de várias outras doenças, desencadeadas por estresse oxidativo, tais como câncer, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce (Davey et al., 2000). Assim, a fim de melhorar a qualidade de vida os seres humanos devem ingerir vitamina C, principalmente de frutas frescas, legumes dentre outros (Li e Schellhorn, 2007).

## 2.2. Radicais livres e antioxidantes

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente visando à sobrevivência, o crescimento e a reprodução. O oxigênio obtido da atmosfera é vital para organismos aeróbicos, contudo, durante o metabolismo aeróbico, espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas no meio intracelular o que pode ameaçar a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, comprometendo processos biológicos importantes (Cerqueira et al., 2007).

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou átomos capazes de possuir existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados em seu orbital. São altamente instáveis, com vida curta e quimicamente muito reativos, podendo causar danos por reagir com praticamente qualquer molécula que entra em contato (Halliwell e Gutteridge, 1998).

O termo coletivo espécie reativa de oxigênio (ERO) é usado para identificar radicais e alguns não radicais que se apresentam como agentes oxidantes e, ou, são facilmente convertidos em radicais (Halliwell, 1996).

Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio são produtos do metabolismo celular liberado durante o processo de redução do oxigênio (Valko et al., 2007). Deve-se enfatizar que tanto as ERO quanto as espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidos para ajudar na manutenção da homeostase celular ou regulação de reações de redução e oxidação (redox) em tecidos saudáveis (Devasagayam et al., 2004). Estes radicais, em baixas concentrações, podem atuar de maneira benéfica em defesa contra agentes infecciosos, formação de ATP através de ADP na mitocôndria, regulação do crescimento celular e produção de oxigenases (Devasagayam et al., 2004).

Um antioxidante é uma substância sintética ou natural que tem como função prevenir ou retardar a deterioração das células pela ação do oxigênio presente no ar. Os antioxidantes são enzimas ou outras substâncias orgânicas, como o AA, vitamina E ou o  $\beta$ -caroteno, capazes de agir contra danos da oxidação em tecidos celulares (Huang et al., 2005).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1998), os mecanismos de ação antioxidante incluem: a) suprimir a formação de espécies reativas tanto pela inibição enzimática ou por quelar elementos-traço envolvidos na produção de

radicais livres, b) eliminar espécies reativas de oxigênio e c) manter o mecanismo antioxidante de defesa regulado e protegido.

Nas plantas, o AA é o antioxidante mais abundante e também serve como um doador de elétrons para muitas reações importantes (Smirnoff, 2000; Jaspers e Kangasjärvi, 2010; Foyer e Noctor, 2011). Sua forma de ação pode ser por interação química direta com as ERO, ou a partir da reação catalisada pela enzima ascorbato peroxidase (APX) durante a fotossíntese, ou em reação ao estresse oxidativo induzido, por exemplo, por exposição ao ozônio (Chen e Gallie, 2005), alta luminosidade e processos oxidativos induzidos por patógenos (Pavet et al., 2005; Foyer e Noctor, 2009; Li et al., 2009). O AA geralmente atinge uma concentração de mais de 20 mM nos cloroplastos, podendo estar presente em todos os compartimentos das células, incluindo a parede celular (Szarka et al., 2012).

O AA desempenha um papel significativo nos processos de atividades celulares eliminando as ERO que são provocadas por estresses oxidativos nas células. O nível de AA no tecido vegetal é bastante variável diferenciando em função da resposta a diferentes condições de estresse ambiental, dependendo do grau do estresse causado e da sensibilidade da espécie (Venkatesh et al., 2014).

Sob condições ótimas de crescimento, ERO são produzidas em organelas, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, porém, em baixo nível. No entanto, durante um estresse, a sua taxa de produção é elevada drasticamente (Mittler, 2002; Gill e Tujeta, 2010; Ahmad et al., 2010).

As ERO são formas parcialmente reduzidas de oxigênio que apresentam alto poder oxidante. O aumento no potencial de membrana na mitocôndria é considerado um forte contribuinte para a formação das ERO. Segundo Kadenbach et al. (2010) quando o potencial de membrana se eleva acima de 140 mV aumenta exponencialmente a produção do radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pelos complexos I, II e III da CTE mitocondrial.

A presença de ERO nos tecidos vegetais pode ser benéfica ou não, dependendo de sua concentração. Portanto, se faz necessário manter uma rigorosa homeostase, controlando a síntese e degradação destes compostos (Gill e Tuteja, 2010).

Fatores ambientais adversos, tais como, frio, calor, seca e estresse salino, causam respostas celulares complexas no metabolismo da planta,

resultando na produção excessiva de ERO, tais como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),  $\text{O}_2^-$  e radicais do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (Venkatesh et al., 2014).

Excesso de ERO produzido nas células vegetais tende a interagir com diferentes macromoléculas resultando da oxidação de proteínas, membranas lipídicas e ácidos nucleicos causando danos celulares, em última análise afetando o crescimento e produtividade das plantas (Wang et al., 2003).

Para se proteger de condições adversas, as plantas desenvolveram uma série de mecanismos de defesa celular, incluindo processos não enzimáticos a partir da ação de antioxidantes, como o AA, glutatona e tocoferóis, bem como a desintoxicação de ERO por enzimas como a superóxido dismutase, peroxidases e catalases (Szarka et al., 2012).

A detoxificação de ERO de forma não enzimática ocorre por reação de oxidação do AA à dehidroascorbato (DHA) reduzindo o  $\text{O}_2$  à  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Outra forma de detoxificação se dá pela reação da glutatona reduzida (GSH) que pode ser oxidada (GSSG) pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  liberando água, ou ainda, a mesma GSH pode ser oxidada e seus elétrons doados para o DHA regenerando o AA (Foyer e Noctor, 2011).

Geralmente, plantas com baixa capacidade de síntese de AA são bastante sensíveis a várias condições de estresse ambiental que afetam seu crescimento e desenvolvimento (Müller-Moule et al., 2004; Huang et al., 2005; Alhagdow et al., 2007; Gao e Zhang, 2008).

Em alguns trabalhos foi relatado que o AA desempenha um papel crucial na proteção contra vários estresses ambientais, tais como, seca (Fotopoulos et al., 2008; Upadhyaya et al., 2011), salinidade (Kwon et al., 2003; Huang et al., 2005; Wang et al., 2005; Sun et al., 2010; Zhang et al., 2011; Venkatesh et al., 2012), ozônio (Zheng et al., 2000; Sanmartin et al., 2003; Feng et al., 2010), temperaturas extremas (Kwon et al., 2003; Larkindale et al., 2005) e alta intensidade luminosa (Müller-Moule et al., 2004; Wang et al., 2006; Talla et al., 2011). Estes estudos sobre plantas mutantes e, ou transgênicas com os níveis endógenos de AA alterados, provaram que o AA desempenha um papel significativo no crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como na tolerância ao estresse abiótico.

### **2.3. Cofator enzimático**

Uma das funções já bem estabelecidas para o AA é como modulador para várias reações enzimáticas, importantes tanto para o metabolismo vegetal quanto animal. Estas enzimas moduladas pelo AA são mono ou dioxigenases, que contêm ferro ou cobre no seu sítio ativo, necessitando de AA para sua atividade máxima (Padh, 1990). A função do AA, neste caso, é manter os centros de íons de metal de transição destas enzimas em uma forma reduzida, potencializando a atividade da enzima (Davey et al., 2000).

Em plantas, podem ser citadas como enzimas que são dependentes do AA como cofator: violaxantina de-epoxidase (VDE, participante do ciclo das xantofilas), 1-aminociclopropano 1-carboxílico oxidase (ACO) (participante da via de biossíntese de etileno) e as enzimas que requerem o AA como um co-substrato na sua biossíntese (biossíntese de ácido abscísico e ácido giberélico) (Eskling et al., 1997; Davey et al., 2000; Smirnov, 2000).

### **2.4. Crescimento e desenvolvimento das plantas**

O AA atua como um modulador de sinalização celular em numerosos processos celulares incluindo a divisão celular, expansão celular e formação da parede celular, nas fases de desenvolvimento principalmente no crescimento (Liso et al., 1984; Conklin e Barth, 2004; Wolucka et al., 2005; Zhang et al., 2007).

O crescimento em plantas superiores é o resultado de dois processos que se complementam, a proliferação celular e o alongamento das células. Embora altas concentrações de AA sejam características de tecidos em crescimento rápido, é intrigante que tais tecidos também tendem a possuir elevadas atividades da enzima ascorbato oxidase (AO) (Lin e Varner, 1991). A atividade da AO foi relatada pela primeira vez em células de sementes germinadas de milho (Suzuki e Ogiso, 1973), sendo verificada também em frutos e folhas jovens de abobrinhas (Lin e Varner, 1991). Esta enzima tem como função biológica a modulação da expansão celular e, ou, divisão celular, por meio do controle redox da razão entre AA e DHA (Arrigoni, 1994; Gonzalez-Reyes et al., 1995), sendo induzida por auxina (Esaka et al., 1992). De acordo com os fatores descritos acima, pode-se afirmar que o DHA e o monodeidroascorbato (MDHA) são também importantes na

expansão celular, além da já conhecida participação na síntese e acúmulo de AA (Parsons e Fry, 2012).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o papel do AA na expansão celular (Smirnoff, 1996). O apoplasto consiste dos espaços aéreos e paredes celulares existentes entre células adjacentes. Nesse espaço, o deslocamento da solução aquosa de nutrientes não passa por nenhuma membrana, ou seja, ocorre de forma contínua e não há gasto de energia, já que ocorre por difusão simples. Assim sendo, o AA e suas formas oxidadas MDHA e DHA o principal tampão redox do apoplasto, incluindo também a presença da enzima a AO (Pignocchi et al., 2006; Parsons e Fry, 2010).

Segundo Smirnoff (1996) por causa da participação da enzima AO, qualquer teoria para explicar o papel do AA na expansão da parede celular deve incluir o MDHA e o DHA. As enzimas monodeidroascorbato redutase (MDHAR) e deidroascorbato redutase (DHAR) não estão normalmente presentes na parede celular, por isso deve haver outro método para manter a redução total do AA. Uma característica adicional é um elevado potencial do citocromo b ligado à membrana plasmática que transporta os elétrons a partir do citoplasma para a parede celular. O citocromo b ligado à membrana plasmática atua como um doador de elétrons para o MDHA reduzindo-o a AA. O AA é transportado através de um transportador para o apoplasto.

O DHA formado pela reação de redução ao MDHA que não é reduzido pelo citocromo b pode ser transportado por um transportador de alta afinidade para o citosol, onde será reduzido pela enzima DHAR dependente da glutathiona reduzida (GSH). O resultado é o transporte de elétrons através da membrana plasmática com NAD (P)H como o redutor e o oxigênio extracelular como o receptor de elétrons final (Rautenkranz et al., 1994).

Pode ser feita uma ligação entre o crescimento e o motivo pelo qual o transporte de elétrons transmembranar tem sido implicado na estimulação do crescimento e como o MDHA também estimula o crescimento. Tem sido sugerido que o transporte de elétrons estimula a  $H^+$ ATPase da membrana plasmática (Carrasco-Luna et al., 1995), de acordo com a teoria do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992), em seguida, conduz a expansão celular pelo aumento e ganho de solutos.

A possibilidade de que o MDHA pode atuar como um receptor de elétrons e assim estimular o crescimento, é suportado pelos resultados de experimentos com raízes de cebola (*Allium cepa*). O tratamento com MDHA causou um aumento na taxa de crescimento por estimular a expansão de células, vacuolização e a absorção de solutos (Hidalgo et al., 1989; Gonzalez-Reyes et al., 1994; Gonzalez-Reyes et al., 1995). O tratamento com o MDHA também provoca a hiperpolarização da membrana o que sugere que o tratamento aumenta a atividade de  $H^+ \text{ ATPase}$  (Gonzalez-Reyes et al., 1995). Enquanto o controle mostrou que as raízes não responderam a esta forma oxidada do AA.

Outra teoria para explicar a expansão celular foi descrita por Lin e Varner (1991). Segundo esses autores o DHA formado por reações de redução do MDHA poderia reagir com as cadeias laterais de lisina e resíduos de arginina, impedindo assim ligações com proteínas estruturais, hemicelulose e poligalacturonato, o que resultaria em uma parede celular mais flexível.

Outras informações são adicionadas a esta teoria como a possível formação do oxalato a partir de DHA na parede celular. Sabe-se que o AA é um precursor do oxalato (Loewus, 1988), mas não é claro se o precursor real é o AA ou DHA. Lin e Varner (1991) sugerem que o DHA da parede celular é convertido em oxalato. O oxalato pode regular o nível de cálcio ionizado na parede pela formação de cristais de oxalato de cálcio. Segundo Lin e Varner (1991) a diminuição no teor de íons cálcio devido ao aprisionamento na parede celular e a formação de cristais de oxalato de cálcio seria o responsável pelo afrouxamento da parede celular, atuando nas ligações das cadeias de poligalacturonato. Segundo essa teoria, o oxalato regula o teor de íons de cálcio, sendo responsável pela degradação total do AA.

Para Takahama (1993) e Otter e Polle (1994), o AA regula a expansão celular, influenciando no afrouxamento da parede celular. Por essa teoria, o AA pode capturar radicais envolvidos na síntese de lignina e peroxidase e inibir a atividade responsável pela formação destes radicais, diminuindo assim a lignificação da parede celular.

Todas essas hipóteses que relacionam o AA à expansão celular são de grande importância, principalmente por apresentarem dados que ajudam a explicar os processos que regulam a plasticidade da célula vegetal.

## 2.5. Processos de biossíntese, transporte, reciclagem e degradação do ácido ascórbico AA em plantas

### 2.5.1 Biossíntese

A biossíntese do AA ocorre em quase todas as células e tecidos de plantas. No entanto, o seu nível é geralmente elevado em tecidos fotossintetizantes e em concentrações menores em tecidos meristemáticos, flores, frutos jovens, raiz, ápices ou tubérculos (Gest et al., 2013).

A via de biossíntese do AA em plantas é diferente da via que ocorre em animais e ainda não é completamente compreendida. A maior dificuldade na compreensão do processo se deve às várias vias alternativas da síntese do AA em plantas, tornando a compreensão da via ainda mais complexa. Em 1998 foi proposta uma via em que o AA é formado a partir da D-glicose, com fosforilação, nucleotídeos e açúcares como intermediários (Weeler e Smirnof, 1998). Segundo essa via, a etapa final na síntese do AA ocorre na membrana interna das mitocôndrias (Bartoli et al., 2000).

Têm sido propostas várias vias biossintéticas para o AA, sendo a via L-galactose a que melhor explica a biossíntese do AA (Figura 2) (Wheeler e Smirnof, 1998). A enzima GDP-L-galactose fosforilase é a principal enzima responsável pela via L-galactose. Essa enzima e sua participação na via L-galactose foram descritos por Dowdle et al. (2007). Outras rotas também são sugeridas para a biossíntese do AA, como pode ser descrito a via a partir do ácido galacturônico (Loewus, 1999; Agius, 2003), ou a partir da L-gulose (Wolucka e Van Montagu, 2003 e Wolucka et al., 2007), ou ainda sendo iniciada a partir do mio-inositol (Lorence et al., 2004).

Trabalhos com *Arabidopsis thaliana* utilizando mutantes dos genes *VTC1* e *VTC2* relacionados à via L-galactose sugerem que essa via tem pouca expressão na síntese do AA, sendo responsável por uma proporção relativamente pequena na acumulação do AA (Conklin et al., 1999; Linster e Clarke, 2007). Também utilizando *A. thaliana* a partir de mutantes duplos dos genes *VTC2* e *VTC5* da GDP-L-galactose fosforilase, verificou-se que o silenciamento desses genes foi letal para as mudas, sendo sugerido que a via da L-galactose é a única via significativa de AA em *Arabidopsis*.

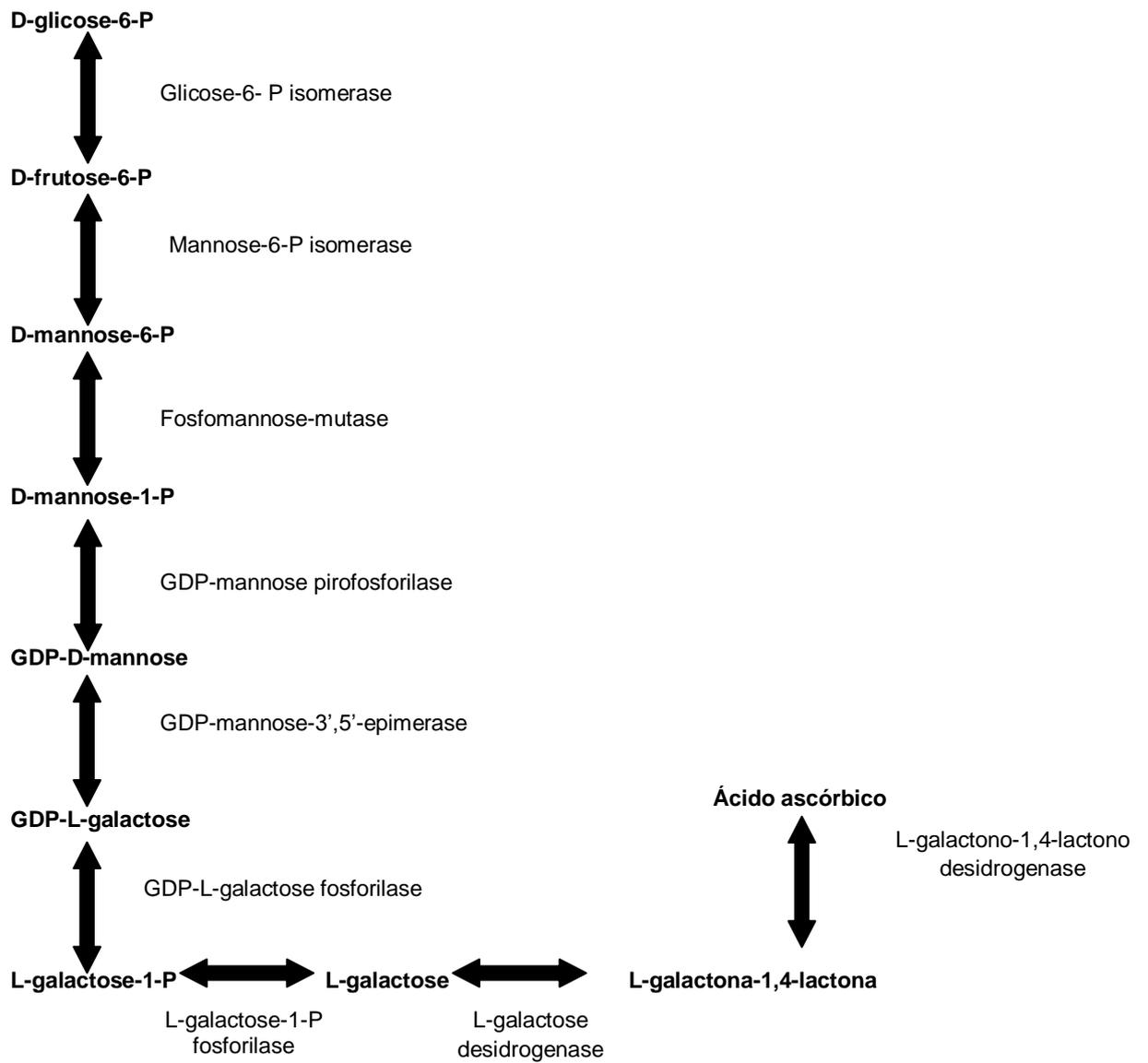
A caracterização da baixa produção de AA em mutantes de *A. thaliana* o gene *VTC* ajudou a compreender melhor o papel essencial das enzimas envolvidas na biossíntese do AA (Conklin et al., 1996; Conklin et al., 2000; Huang et al., 2005; Conklin et al., 2006; Müller-Moule, 2008). Agora é bem conhecido, que em plantas superiores a biossíntese do AA ocorre bem caracterizada através da via D-manose-L-galactose (via Wheeler-Smirnoff), onde a D-manose é convertido em L-galactose por via dos açúcares intermediários do GDP (Wheeler e Smirnoff, 1998). A L-galactose é ainda oxidada para se obter GalL, que é convertido a AA pela enzima GalLDH que está localizada na membrana mitocondrial interna (Siendones et al., 1999; Smirnoff, 2001), dependente do citocromo C (Smirnoff et al., 2004). Nesta via, a conversão de alguns precursores intermediários para a formação do AA foi verificada em mamão, goiaba e morango (Barata-Soares et al., 2004).

Todos os genes que estão envolvidos nesta via têm sido bem caracterizados; estes incluem genes que codificam a GDP-D-manose-pirofosforilase (Conklin et al., 1999), GDP-D-manose-3',5'-epimerase (Wolucka e Van Montagu, 2003; Watanabe et al., 2006), GDP-L-galactose fosforilase (Dowdle et al., 2007; Linster e Clarke, 2008), L-galactose-1-fosfato fosfatase (Laing et al., 2004), L-galactose desidrogenase (Gatzek et al., 2002; Laing et al., 2004) e GalLDH (Imai et al., 1998; Siendones et al., 1999; Do Nascimento et al., 2005; Tokunaga et al., 2005; Alhagdow et al., 2007).

O passo limitante na velocidade na via da biossíntese de AA em plantas foi proposto entre os precursores, D-manose-1-P e L-galactose (Wheeler e Smirnoff, 1998; Davey et al., 1999). O fornecimento exógeno do D-manose-1-P não resultou em aumento na acumulação de AA (Wheeler e Smirnoff, 1998; Davey et al., 1999). No entanto, quando foi fornecido exogenamente L-galactose e GalL, verificava-se uma rápida resposta na taxa de biossíntese de AA, sendo verificado aumento em cerca de 30 a 70 vezes (Davey et al., 1999), levando a conclusão que o passo limitante na velocidade da biossíntese deve estar na via L-galactose.

Em trabalhos realizados com folhas de *A. thaliana* verificou-se acumulação de AA após aclimatação a alta intensidade de luz. A atividade da enzima GDP-L galactose fosforilase e a expressão do gene *VTC2* aumentaram rapidamente em transferência para um ambiente bem iluminado, mas a atividade

de outras enzimas da via foi pouco afetada. Estas observações sugerem que a GDP-L-galactose fosforilase pode desempenhar um papel importante no controle da biossíntese do AA (Dowdle et al., 2007). Uma vez que a GDP-D-manose e a GDP-L-galactose não são apenas utilizadas para a formação de AA, mas também na síntese de polissacarídeos da parede celular e, ou a glicosilação de proteínas (Smirnov, 2000 e Reuhs et al., 2004), a reação fosforilase é o primeiro passo comprometido na via da L-galactose. Portanto, os genes *VTC2* e *VTC5* são bons alvos potenciais para a regulação da síntese de AA. Tanto o AA, como o GalL e a L-galactose, não tiveram nenhum efeito sobre a atividade do gene *VTC2*, indicando que não há realimentação na regulação da enzima por estes metabolitos (Dowdle et al., 2007). No entanto, a suplementação de AA diminuiu a expressão do *VTC2*.



**Figura 2.** Biossíntese do ácido ascórbico em plantas (Wheeler e Smirnoff, 1998).

## 2.5.2 Transporte

Uma vez que o AA é sintetizado na membrana mitocondrial interna, este é transportado para diferentes compartimentos celulares. Sendo bastante móvel em plantas, podendo ser transportado intra e intercelularmente, o transporte do AA pode impactar na acumulação total do AA. Portanto, é importante uma consideração sobre os mecanismos de transporte nas plantas a fim de verificar sua influência na acumulação total do AA (Ishikawa et al., 2006).

Foi proposto que o transporte de AA e DHA em plantas ocorrem por transportadores específicos (Horemans et al., 2000b). No entanto, tanto a proteína ou o gene associado com este tipo de transporte e a natureza dos mecanismos de condução destas proteínas transportadoras, não são conclusivos. Vários outros transportadores do AA estão associados com a membrana plasmática da planta (Horemans et al., 2000a).

## 2.5.3. Transporte intracelular

O AA é transportado intracelularmente ao longo de toda a planta, as alterações no seu acúmulo dependem de como uma célula ou tecido podem alterar os seus níveis em outros compartimentos celulares ou tecidos. Apesar do fato do último passo da via biossintética do AA ocorrer na membrana interna das mitocôndrias (Askerlund et al., 1991; Bartoli et al., 2000), o AA é encontrada em todo o ambiente celular, incluindo o apoplasto. Consequentemente, o AA deve ser transportado para todos os outros compartimentos da célula em que ele está presente (Horemans et al., 2000a; Horemans et al., 2000b).

Considerando que o AA existe carregado negativamente em pH fisiológico (valores de  $pK_{a1}= 4,17$  e  $pK_{a2}= 11,57$ ) é improvável que seja permeável à bicamadas lipídicas. Embora seja uma molécula neutra o DHA a forma oxidada do AA é mais hidrofóbica, mas não o suficiente para que possa difundir através das membranas celulares (Gallie, 2013).

As evidências indicam que o transporte intracelular do AA e do DHA em células vegetais ocorre através da absorção energizada à custa da força motriz transmembranar de prótons, sendo que o transporte energizado de AA foi calculado como sendo de aproximadamente  $650 \text{ nmol m}^{-2}$  de área foliar  $\text{s}^{-1}$  (Heber et al., 2003).

No citosol localiza-se a enzima DHAR, enzima essa que catalisa a redução de DHA a AA, essa reação ocorre predominantemente no citosol. No entanto, a ausência de DHAR no apoplasto significa que o AA é transportado para fora da célula, sendo oxidado à DHA. Por isso, o DHA é a forma predominante no apoplasto a partir do qual é eficientemente transportado de volta para o citosol onde o mesmo é reduzido à AA (Gallie, 2013).

Embora os transportadores do AA ainda tenham que ser definitivamente identificados, em análise do genoma de *A. thaliana* foram identificados doze genes que partilham semelhança com conhecidos transportadores de outras espécies (Maurino, 2006), sugerindo a possibilidade de que esses genes codificam transportadores de AA.

Nos cloroplastos, o transporte ocorre por um transportador específico (Beck et al., 1983; Foyer e Lelandais, 1996). Análises feitas em mitocôndrias de tabaco indicaram que a absorção de DHA e glicose ocorrem por difusão facilitada e é mediada pelo mesmo transportador. Por outro lado, a absorção de AA ocorre nas mitocôndrias com uma baixa eficiência, portanto, é provável que atravesse a membrana mitocondrial na sua forma oxidada (Szarka et al., 2004).

#### **2.5.4 Transporte intercelular**

O transporte intercelular do AA a longa distância, ocorre em quase todos os tecidos vegetais. Ele tende a ser mais concentrado em tecidos fotossintetizantes, frutas e meristemas do que em tecidos não fotossintetizantes, tais como raízes (Davey et al., 2000).

A primeira demonstração do transporte intercelular a longa distância do AA foi mediada pelo floema de *Medicago sativa* e *A. thaliana*, através do uso de AA radiomarcado. Essa observação mostrou que o AA radiomarcado aplicado às folhas é acumulado e transportado pelo floema, onde foi transportado para ápices das raízes, parte aérea e órgãos florais, mas não foram transportados para folhas maduras. Além disso, foi verificado que o aumento do teor de AA era proporcional à quantidade do precursor aplicado exogenamente, resultando em um aumento de até 8 vezes no acúmulo de AA na folha tratada e um aumento de até 3 vezes de AA em tecidos fontes (Franceschi e Tarlyn, 2002).

O mesmo também foi observado no floema de folhas-fonte de batata, onde o AA foi transportado para os tubérculos. Em batata, aplicando exogenamente o GalL ou L-galactose nas folhas-fontes, verificou-se um aumento substancial no AA exsudato do floema, bem como em órgãos, tais como flores e tubérculos em desenvolvimento. O acúmulo foliar de AA foi 2 vezes maior durante o dia do que à noite, o que se refletiu no aumento do exsudato do floema, sugerindo que o acúmulo de AA no floema é altamente sensível às mudanças na biossíntese do mesmo nas folhas-fontes (Tedone et al., 2004).

O ácido D-galacturônico derivado da degradação da pectina durante a maturação dos frutos, também pode ser um substrato para a síntese de AA. Foi verificado que o gene que codifica para a enzima ácido D-galacturônico redutase em morango é expresso apenas durante a maturação dos frutos (Agius et al., 2003).

### **2.5.5. Reciclagem**

A função da reciclagem do AA, ou seja, a redução das suas formas oxidadas (MDHA e DHA) é de grande importância na manutenção de um nível suficiente de AA nas células (Szarka et al., 2013).

O DHA é gerado a partir da reação do MDHA, sendo esse gerado a partir da oxidação do AA, enquanto a enzima DHAR catalisa a redução do DHA a AA utilizando glutatona (GSH) como redutor. Se o DHA não é reciclado para AA, sofre hidrólise irreversível formando o ácido 2,3-dicetogulonato (DKG). A reciclagem do AA pela DHAR, portanto, serve como um meio de utilização do DHA para a geração de AA antes que o DHA seja perdido e ocorra a diminuição do acúmulo total de AA (Gallie, 2013).

O AA oxidado pode ser reciclado, à custa da glutatona ou NADPH pelas enzimas do ciclo do ascorbato-glutatona: ascorbato peroxidase (APX), MDHAR, DHAR, e a glutatona redutase (GR) dependente da GSH. Os elementos desse ciclo foram descritos pela primeira vez no cloroplasto (Zsigmond et al., 2011). O ciclo elimina  $H_2O_2$  pela transferência de elétrons cíclica sem consumir o AA ou GSH (Figura 3) (Noctor e Foyer, 1998). Os componentes desta via estão presentes em animais e no citosol de células de plantas, mitocôndrias, peroxissomos e cloroplasto (Foyer e Noctor, 2011). O envolvimento do complexo



No entanto, a inserção do gene que expressa a enzima DHAR obtida por meio do citosol de trigo que foi inserido em tabaco e milho, apresentou o aumento tanto no acúmulo total quanto nos processos redox do AA (Chen et al., 2003). A acumulação de AA em folhas de tabaco aumentou de 2 a 4 vezes, e os processos redox aumentaram quase 3 vezes, quando comparados com o controle. Nas folhas e grãos de milho em desenvolvimento ocorreu o aumento do acúmulo de AA 2 vezes superior ao controle, com um aumento de 40% nos processos redox. Esse aumento nos processos redox foi devido ao aumento de AA e uma diminuição em DHA, o que consiste com a função da DHAR. Foi verificado que o processo redox do AA aumentou no apoplasto (que não possui atividade de DHAR), bem como no simplasto, indicando que o DHAR citosólico regula ambos. O efeito de aumentar a expressão DHAR que parecia ser específico para a reciclagem do AA, não levou ao aumento na biossíntese do AA, embora houvesse um aumento no processo redox em GSH (Chen et al., 2003).

Estes resultados sugerem que aumentando o teor do AA nas plantas através da reciclagem do AA poderia limitar os efeitos deletérios das ERO. A regulação do MDHAR e do DHAR envolvidos na reciclagem do AA também foi investigada em acerola. Sob condições de ausência de luz, houve um declínio acentuado e significativo nos teores totais de AA, acompanhada por uma diminuição no nível de transcrições e atividades enzimáticas dos dois genes em folhas de aceroleira. A transcrição para a MDHAR e para a DHAR, assim como a atividade dessas enzimas foram significativamente reguladas nas folhas de aceroleira sob condições de estresse de frio e salino, indicando que a expressão de ambos os genes é regulada sob essas tensões (Eltelib et al., 2011).

### **2.5.6. Degradação**

Embora a via de síntese do AA seja distribuída entre o citosol e as mitocôndrias (Foyer e Noctor, 2003; Smirnoff et al., 2004), a via de degradação do AA parece localizada no apoplasto (Green e Fry, 2005).

Na maioria das espécies vegetais, a degradação do AA pode ocorrer através do DHA, obtendo-se treonato e oxalato, sendo este último envolvido na osmorregulação e no controle da concentração de cálcio. Nestes trabalhos, Misteli, (2001) e Lamond e Sleeman, (2003) demonstraram que a rota que controla a

concentração do cálcio atuou extracelularmente em células cultivadas de folhas de rosas, através de vários novos intermediários e envolveu pelo menos uma nova atividade enzimática. A rota também pode funcionar não enzimaticamente, potencialmente pode representar as perdas do AA durante altas temperaturas. Vários passos na rota podem gerar  $H_2O_2$ ; isto pode contribuir para o papel do AA como um pró-oxidante (Misteli, 2001; Lamond e Sleeman, 2003) que é potencialmente capaz de afrouxar a parede celular da planta e ou provocar estresse oxidativo.

No entanto, em algumas plantas o AA também pode ser degradado a tartarato a partir do treonato, sendo esse (tartarato) o mais importante ácido orgânico acumulado em uvas (Green e Fry, 2005). Além disso, o oxalato pode ser oxidado pelo oxalato oxidase gerando  $H_2O_2$ , o que pode resultar em aumento do estresse oxidativo celular levando ao aumento da produção de AA. Portanto, possivelmente, a clivagem do AA em oxalato, deve ter outra função específica, não relacionada (Davey et al., 2000).

A via de degradação do AA envolve a oxidação do DHA por via enzimática, assim como não enzimática. O DHA que não for reciclado é hidrolisado de forma espontânea e irreversível formando o DKG, causando uma diminuição no acúmulo total de AA, numa reação altamente dependente do pH. No entanto, muitas das enzimas envolvidas nessa via de degradação do AA não estão bem caracterizadas em plantas. Tanto o DHA, como o DKG estão propensos a novos processos de oxidação sob as mesmas condições fisiológicas no apoplasto (Parsons e Fry, 2012).

Já foram descritas também vias não oxidativas de degradação do AA (Simpson e Ortwerth, 2000), no entanto, a via predominante in vivo é a oxidação, gerando o DHA. O DHA do protoplasma pode ser reduzido de volta ao AA no ciclo do ascorbato-glutationa (Foyer e Noctor, 2011). No entanto, o DHA pode também ser irreversivelmente degradado in vivo (Deutsch et al., 2000) quando o AA já não pode ser mais restaurado. Esta degradação pode ser iniciada por hidrólise ou por oxidação.

## 2.6. Interação entre a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial e a síntese de AA

### 2.6.1 Oxidação da L-galactona-1,4 lactona em mitocôndrias

A respiração é o processo de conservação de energia fundamental a todos os organismos vivos, gerando o ATP que é fundamental e necessário para a manutenção e crescimento das células. Na respiração aeróbica, as etapas finais do processo ocorrem dentro das mitocôndrias e gera a maior parte do ATP através da fosforilação oxidativa, resultante da oxidação de ácidos orgânicos, com a liberação de CO<sub>2</sub> e a redução do O<sub>2</sub> à água (Millar et al., 2011).

Trabalhos anteriores demonstraram que a respiração em plantas pode ser controlada pela síntese do AA (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003; Bartoli et al., 2006). As evidências para isto podem ser descritas como: a) localização da GalLDH, a enzima que catalisa a última etapa da biossíntese de AA, na mitocôndria próximo ao complexo I; b) regulação da atividade da GalLDH pelo transporte de elétrons através do complexo I; c) exigência absoluta do citocromo C oxidado para a atividade da GalLDH; d) expressão da AOX na dissipação de elétrons e e) influência do complexo II na acumulação de AA (Nunes-Nesi et al., 2005; Szarka et al., 2013).

Segundo Bartoli et al. (2000) a taxa de síntese de AA foi completamente inibida na presença de cianeto de potássio (CN<sup>-</sup>), um bloqueador da citocromo C oxidase (COX). A inibição da COX, mantém o citocromo C na forma reduzida, inibindo a atividade da GalLDH. Por outro lado, outro inibidor da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, a antimicina A, aumentou a produção de AA. A inibição do complexo III pela antimicina A impede a redução do citocromo C, disponibilizando maior quantidade de citocromo C na forma oxidada, favorecendo a atividade da GalLDH e por consequência a síntese de AA.

Os resultados apresentados por Bartoli et al. (2000) demonstram uma relação entre a taxa respiratória no estágio 4 e a síntese de AA em folhas de *A. thaliana*, contudo ainda não há informações mais detalhadas a cerca dos mecanismos envolvidos neste processo em frutos.

A síntese de AA também é influenciada pela atividade da AOX, que regula o estado de alta energia da membrana, consumindo elétrons e impedindo a produção de ERO.

Bartoli et al. (2006) conduziram um trabalho com várias intensidades de luz e plantas transgênicas de *A. thaliana* com linhas antisense da AOX, assim como usando linhas com aumento da expressão da AOX para verificar a capacidade de síntese de AA. Os autores mostraram que tanto em folhas inteiras como em mitocôndrias isoladas, o acúmulo e a síntese de AA foram mais elevados em plantas onde a capacidade da AOX era mais elevada, independente da intensidade luminosa, sugerindo uma relação muito próxima entre a síntese de AA e atividade da AOX, possivelmente com a função de proteger as células contra a oxidação não controlada (Foyer e Noctor, 2005).

### **2.6.2 Transporte de elétrons e fosforilação oxidativa em mitocôndrias**

As mitocôndrias são organelas multifuncionais envolvidas na conversão de energia, metabolismo lipídico, produção de calor, sinalização por  $Ca^{2+}$ , produção de ERO e apoptose. São responsáveis não só pela respiração celular, mas também pela síntese do AA pela GalLDH e a regeneração do AA para suas formas oxidadas (Jimenez et al., 1997; Bartoli et al., 2000; Yabuta et al., 2000; Chew et al., 2003).

Todas estas funções dependem da capacidade das mitocôndrias em mover prótons através da membrana interna durante a fosforilação oxidativa, processo pelo qual acopla a oxidação de substratos energéticos à síntese de ATP (Santo-Domingo e Demareux, 2012).

No entanto, as mitocôndrias são envolvidas também em outros processos celulares importantes sendo, por exemplo, uma importante fonte de carbono e nitrogênio no metabolismo das plantas (Westermann et al., 2002). As mitocôndrias desempenham papéis importantes ligados à fotossíntese e a forma como as plantas respondem ao estresse oxidativo, possuindo propriedades específicas que refletem essa complexidade (Millar et al., 2011).

A mitocôndria possui uma CTE composta por quatro grandes complexos proteicos (I, II, III, IV), que interagem uns com os outros através da ubiquinona (UQ) e a proteína citocromo C (Millar et al., 2011).

Classicamente, o transporte de elétrons através da CTE na membrana interna é visto somente através de interações aleatórias entre os complexos de proteínas individuais, a UQ e o citocromo C. Porém, estudos recentes sobre a

disposição física e a organização da CTE em plantas, fungos e animais têm desafiado este ponto de vista. Tem sido verificada a composição dos complexos proteicos muito próximos uns dos outros, o que se denominou de supercomplexos, sendo estes estáveis em detergentes não iônicos e propícios à eletroforese em gel (Eubel et al., 2003; Eubel et al., 2004). Estruturas ainda maiores compostas pelos complexos I, III, IV, além da ATP sintase têm sido observados ou reconstituídos com base em imagens estruturais (Bultema et al., 2009), aumentando ainda mais a complexidade estrutural da CTE.

No âmbito metabólico estes supercomplexos podem funcionar canalizando os substratos e melhorando o transporte de elétrons que conseqüentemente aumentará a eficiência do processo respiratório (Heinemeyer et al., 2007). Porém, ainda é preciso mais estudos para provar o quão importante são os supercomplexos e sua influência na atividade respiratória celular.

No âmbito macroestrutural, a estrutura icônica da membrana interna das mitocôndrias é resultado da organização de dímeros da ATP sintase em cadeias espirais (Stuart et al., 2008; Vonck et al., 2009), indicando que estas associações proteína-proteína têm efeitos significativos sobre a estrutura física mitocondrial. O próximo desafio é determinar se os supercomplexos da CTE são dinâmicos e podem mudar de acordo com a célula ou se são características estruturais estáticas (Millar et al., 2011).

O complexo I (CI) é composto por 44 cadeias polipeptídicas distintas, sendo destacada uma flavoproteína (com FMN como cofator) e 8 centros de ferro-enxofre. Destas 44 proteínas, 7 são codificadas pelo DNA mitocondrial, estando as restantes codificadas pelo DNA nuclear. Mitocôndrias vegetais possuem 49 subunidades que podem ser separadas por eletroforese nativa e desnaturação a partir de combinações do CI (Rasmusson et al., 1998; Heazlewood et al., 2003; Klodmann et al., 2010).

Do ponto de vista funcional, o CI recebe os elétrons provenientes do NADH transferindo-os para a UQ e encontra-se associado reversivelmente às desidrogenases. O NADH formado no interior da mitocôndria pode difundir-se até chegar ao CI, onde é oxidado doando os 2 elétrons para o CI. Os elétrons doados pelo NADH são transferidos para uma proteína que possui FMN como cofator, passando a FMNH<sub>2</sub>. Seguidamente os elétrons vão passando por várias proteínas

ferro-enxofre (Fe-S) que compõem o CI, até serem doados à UQ, que recebe os dois elétrons oriundos da oxidação do NADH, porém, um de cada vez, convertendo-se em ubiquinol (UQH<sub>2</sub>) (Dutilleul et al., 2003; Meyer et al., 2009; Mailloux e Harper, 2011).

Durante o transporte de elétrons ao longo do CI, são liberadas pequenas quantidades de energia, que individualmente não poderiam ser utilizadas para produzir ATP. Sendo assim, o organismo conserva parte dessa energia através da criação de um gradiente de H<sup>+</sup>. Ou seja, a energia que é liberada é utilizada para transportar ativamente H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Resumidamente para cada 2 elétrons que são transportados pelo CI, são bombeados 4 prótons para o espaço intermembranar (Dutilleul, 2003; Meyer, 2009; Mailloux e Harper, 2011). A rotenona é um potente inibidor do CI, impedindo a transferência de elétrons para a UQ ao bloquear o sítio de ligação à UQ.

O complexo II (CII), succinato desidrogenase (SDH), em todos os organismos, é composto de quatro subunidades principais: flavoproteína (SDHI), uma subunidade composta da proteína ferro-enxofre (SDH2) e duas subunidades inseridas na membrana (SDH3 e SDH4) (Eube et al., 2003; Millar et al., 2004).

Na realidade, a SDH é uma das enzimas que compõem o ciclo dos ácidos tricarboxílico (CAT, ou Ciclo de Krebs), responsável pela oxidação do succinato à fumarato. Todas as enzimas do CAT, com exceção da SDH, estão localizadas na matriz mitocondrial. A ação da SDH resulta na formação de FADH<sub>2</sub>, sendo este um cofator que se associa irreversivelmente às desidrogenases. No CII os 2 elétrons do FADH<sub>2</sub> são transferidos diretamente para a UQ, porém, sem passarem por outros componentes do complexo (Eube et al., 2003). Os compostos, 2-tenoiltrofluoroacetona (TTFA), carboxina e malonato são bloqueadores do CII.

O complexo III (CIII) da cadeia respiratória mitocondrial é chamado de complexo bc1, ou ubiquinona: citocromo c oxidorreductase. O mesmo é composto por 10 subunidades, que são codificadas pelo genoma mitocondrial (citocromo b) e nuclear (todas as outras subunidades, com exceção do citocromo b). O CIII transporta os elétrons vindos da UQ para o citocromo C. No total o CIII transporta 4 elétrons provenientes de 2 moléculas de UQH<sub>2</sub>. No entanto, parte dos elétrons recirculam dentro do CIII, concomitantemente ao transporte de H<sup>+</sup> para o espaço

intermembranar, antes de serem transferidos para o citocromo C, reforçando o gradiente de  $H^+$  através da membrana interna da mitocôndria. Este processo é muitas vezes designado de ciclo-Q (pois a ubiquinona é também chamada de coenzima Q). Este complexo também participa da formação do gradiente eletroquímico (Sweetlove et al., 2010). A antimicina A, um antibiótico produzido pelo fungo *Streptomyces griseus*, bloqueia o transporte de elétrons no CIII entre a subunidade  $b_H$  (outro componente do CIII) e a coenzima Q, enquanto o mixotiazol, outro bloqueador do CIII, atua no sítio  $Q_p$ .

O citocromo C é uma proteína de baixo peso molecular (cerca de 12 KDa), hidrossolúvel, presente no espaço intermembranar da mitocôndria. Sua principal função é transferir os elétrons do CIII para o complexo IV (CIV), ou seja, não faz parte de nenhum complexo da cadeia respiratória em particular (Sweetlove et al., 2010).

O CIV é um complexo transmembranar sendo o último complexo da CTE mitocondrial, também chamado de citocromo C oxidase (COX). A sua função é transferir os elétrons do citocromo C para o oxigênio molecular, reduzindo-o à água (Millar et al., 2004).

Estruturalmente, o CIV apresenta 14 subunidades (cerca de 204 kDa), dentre os quais destacam-se várias proteínas com cofatores metálicos, entre os quais 2 citocromos com grupos heme (citocromos a e a<sub>3</sub>) e dois centros contendo cobre (CuA e CuB). O citocromo a<sub>3</sub> e o centro CuB formam juntos o local de redução do oxigênio. Entre as 14 subunidades do CIV, apenas 3 são codificadas pelo DNA mitocondrial (Peiffer et al., 1990).

Tal como acontece no CI e o CIII, o CIV também é responsável pela transferência de prótons da matriz para o espaço intermembranar (Rodríguez-Roldán et al., 2006). O CIV é bloqueado por íons  $CN^-$ , azida e pelo monóxido de carbono, que ao se ligarem ao oxigênio com maior afinidade que o centro Fe-Cu da COX, impedem a oxidação do citocromo C e a redução do oxigênio.

Também é possível fazer associações entre a COX com o metabolismo do AA. A maioria das enzimas da síntese do AA está localizada no citosol, exceto a que catalisa a etapa final da sua síntese, a GalLDH. Esta se localiza na membrana interna das mitocôndrias, contribuindo para o transporte de elétrons na etapa de redução da COX. A GalLDH catalisa a oxidação do GalL com a redução do citocromo C, quando o GalL é convertido a AA e a COX é reduzida. Assim,

indiretamente, a atividade da COX contribui para o mecanismo antioxidante não enzimático do AA, ajudando a diminuir os níveis de ERO (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003; Szarka et al., 2007; Blokhina e Fagerstedt, 2010).

O complexo V (CV) ou ATP sintase, catalisa o passo final da fosforilação oxidativa, usando a energia do gradiente eletroquímica através da membrana interna para a síntese do ATP. A estrutura geral e as subunidades principais da ATP sintase são altamente conservadas tanto em organismos procarióticos, como em eucarióticos. A porção da enzima embebida na membrana é designada Fo, contém 4 subunidades e 9 componentes encontrados que são codificados no genoma mitocondrial da maioria das plantas, além do canal por onde passam os prótons no retorno para a matriz mitocondrial. A outra porção é designada F<sub>1</sub>, sendo o local da síntese do ATP (Unsel et al., 1997). A oligomicina inibe a ATP sintase ao bloquear o fluxo de prótons através da subunidade Fo.

A CTE mitocondrial em vegetais possui algumas peculiaridades como a presença de vias alternativas, tais como a AOX e as NAD(P)H desidrogenases insensíveis à rotenona. Há várias teorias para explicar a funcionalidade fisiológica destes componentes, entretanto alguns estudos sugerem que estejam envolvidos na adaptação destes indivíduos a ambientes instáveis, tais como estresse ao frio, estresse oxidativo, condições anaeróbias e variações de temperatura (Amor et al., 2000; Calegario et al., 2003).

A AOX é um dos componentes da fosforilação oxidativa bastante estudado em plantas, os primeiros relatos de sua atividade são datados de 1925 (Day et al., 1980; Moore e Siedow, 1991). Os componentes da AOX são codificados pelo genoma nuclear das células sendo posteriormente exportados e “montados” na mitocôndria. A AOX é resistente ao CN<sup>-</sup> e fornece uma via adicional, ramificando-se da rota central (dada pela COX), para o uso dos elétrons na CTE mitocondrial (Millar et al., 2011). A AOX recebe os elétrons diretamente da UQH<sub>2</sub> assim como ocorre com o CIII. Os elétrons transportados para a AOX são usados para a redução do oxigênio à água, assim como acontece com a COX e competindo com essa pelo destino dos elétrons vindos da UQH<sub>2</sub> (Millar et al., 2011).

A AOX é expressa a partir de uma família gênica. Experimentos com soja demonstram a expressão do gene *AOX1* em cotilédones, enquanto o gene *AOX3* está presente em folhas. Nenhum registro mostra a expressão do gene *AOX2* em

soja, apesar de sua expressão relevante em outras espécies, o significado desta família de genes ainda é desconhecido. Todos os genes da AOX sequenciados até o momento codificam uma proteína muito semelhante, possuindo uma região C-terminal e outra N-terminal, voltadas para a matriz, indicando uma superfície helicoidal no espaço intermembranar. A porção N-terminal conserva resíduos de cisteína que postulam uma ponte dissulfeto lábil na AOX (Fiorani et al., 2005; Umbach et al., 2005; Giraud et al., 2008).

O gene *AOX1*, assim como os demais genes, responsáveis por codificarem a AOX, são expressos pela influência de diversas situações estressantes para o vegetal, como também podem ser expressos por fatores que causam inibição do fluxo de elétrons na CTE (Vanlerberghe et al., 1997). A indução da AOX ocorre na presença de inibidores convencionais da CTE, inibidores estes que afetam a atividade do complexo III e IV, como a antimicina A ou o  $CN^-$  (Helmerhorst et al., 2002). É importante compreender que a AOX possui papel tanto metabólico quanto antioxidante (Papa e Skulachev, 1997; Vanlerberghe et al., 2002) e apesar de ter sua atividade resistente ao  $CN^-$  e à antimicina A, pode ser inibida especificamente por ácido salicilhidroxâmico (SHAM) (Schonbaum et al., 1971) e pelo n-propil galato (n-PG) (Guerrero e Sánchez, 2005).

## **2.7. L-galactona 1,4- lactona desidrogenase**

Desde 1954, quando a atividade da GalLDH foi relatada pela primeira vez em plantas (Isherwood et al., 1954; Mapson et al., 1954), muitos progressos aconteceram na compreensão das propriedades desta enzima mitocondrial.

A atividade da GalLDH e a produção de AA nas plantas foi avaliada em diferentes espécies, incluindo feijão e morango (Baig et al., 1970), espinafre (Hausladen e Kunert, 1990), aveia (De Gara et al., 1992), batata (Ôba et al., 1994), milho (De Gara et al., 1994), batata doce (Ôba et al., 1995) e couve-flor (Østergaard et al., 1997). Alguns trabalhos (Ôba et al., 1995; Østergaard et al., 1997) concluíram em suas análises que a GalLDH contém resíduos de cisteína que são importantes para a atividade da enzima. Enquanto os dados obtidos sobre a cinética da GalLDH em relação a afinidade ao substrato GalL, diferiu um pouco entre a enzima derivada da couve flor e a enzima derivada da batata doce.

Enquanto na GalLDH de couve-flor foi encontrado um  $K_m$  de 3,3 mM para o substrato GalL (Østergaard et al., 1997), em batata doce o  $K_m$  para o mesmo substrato foi de apenas 0,12 mM (Ôba et al., 1995). A razão para esta discrepância não é bastante clara. Sendo a GalLDH bastante específica para o GalL como seu substrato (Mapson e Breslow, 1958; Ôba et al., 1995; Østergaard et al., 1997).

A GalLDH (EC 1.3.2.3) é uma flavoenzima necessária para a atividade respiratória do complexo I das plantas (Pineau et al., 2008). Esta enzima é um aldonolactona oxidoreductase que pertence ao grupo vanilil-álcool oxidase (VAO), uma família de flavoproteínas (Fraaije et al., 1998).

Os membros desta família partilham de dois domínios conservados, um de ligação ao FAD e outro domínio que define a especificidade para o substrato (Mattevi et al., 1997). A maioria dos membros da família VAO possui um FAD covalentemente ligado e agem como oxidases que utilizam oxigênio molecular para reoxidar a flavina, resultando na produção de peróxido de hidrogênio (Leferink et al., 2008b).

A GalLDH reage fracamente com oxigênio molecular e contém o FAD ligado não covalentemente (Leferink et al., 2008b). Nenhuma estrutura cristalina está disponível para a subfamília aldonolactona oxidoreductase, pouco é conhecido sobre a natureza do sítio ativo e o mecanismo catalítico da GalLDH (Leferink et al., 2008a). Estudos sobre a GalLDH revelaram que a enzima possui apenas um polipeptídeo em torno de 56-57 kDa (Ôba et al., 1994, 1995; Imai et al., 1998).

A GalLDH de batata doce (Ôba et al., 1995; Imai et al., 1998) e de couve-flor (Østergaard et al., 1997) já foram purificadas. A sua localização foi definida especificamente na membrana mitocondrial interna em estudos com hipocótilos de feijão (Siendones et al., 1999).

A localização subcelular da GalLDH poderia fornecer uma razão pela qual a GalLDH é uma desidrogenase e não uma enzima oxidase. Esta última atividade poderia resultar em elevados níveis de peróxido de hidrogênio mitocondrial que promoveriam a inativação da GalLDH (Leferink et al., 2008a), levando à indução do envelhecimento, senescência e morte celular (Noctor et al., 2007; Navrot et al., 2007). Além disso, demonstrou-se que a interação entre a CTE e a GalLDH,

através do citocromo C, é essencial para o bom funcionamento das mitocôndrias de plantas (Alhagdow, 2007).

A atividade da GalLDH é inibida na presença de rotenona, um bloqueador do CI, complexo que utiliza como substrato respiratório o NADH, obtido a partir da oxidação do piruvato que gera acetil-CoA e CO<sub>2</sub>. Essa reação é catalisada por um complexo enzimático (formado por 3 enzimas) denominado piruvato desidrogenase, com a participação da CoA e de NAD<sup>+</sup>. O NADH também pode ser obtido pela oxidação do malato a oxalacetato pela enzima malato desidrogenase (Millar et al., 2003). Por conseguinte, foi especulado que subunidades do CI são importantes para a regulação da GalLDH, por controlarem a velocidade do fluxo de elétrons através do CI a partir da oxidação do NADH (Millar et al., 2003).

A GalLDH foi encontrada anexada a uma versão ligeiramente menor do CI, de abundância relativamente baixa (Millar et al., 2003; Heazlewood et al., 2003; Pineau et al., 2008). Este complexo tem uma massa molecular de cerca de 850 kDa, certamente precisa de algumas das subunidades presentes na forma principal do CI. A identificação destas subunidades ainda não foi possível (Schertl et al., 2012).

Alguns trabalhos ainda não definiram se a função da proteína GalLDH na produção do AA é necessária para o funcionamento do CI (Szarka et al., 2013). Especula-se que o AA pode ter um papel no equilíbrio dos fluxos de elétrons em diferentes circunstâncias ambientais (Szarka et al., 2013).

Nunes-Nesi et al. (2005) verificaram em folhas de tomateiros transgênicos (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker) um aumento entre 5 a 7 vezes nos níveis de AA nas folhas destes tomateiros, em relação ao tipo selvagem, quando o CII da CTE mitocondrial foi suprimido. Mas, surpreendentemente, não verificaram qualquer efeito sobre a atividade da GalLDH ou na concentração de ácido galacturônico e ácido glucurônico. Embora a razão para este fenômeno ainda não esteja totalmente compreendida, a partir dos resultados até aqui obtidos sugere-se que a atividade do CAT poderia influenciar o metabolismo do AA (Nunes-Nesi et al., 2005).

Szarka et al. (2013), demonstraram em tabaco que a adição dos inibidores do CII, o malonato e o TTFA, aumentou a produção de AA. Ainda, a adição de succinato, resultou em elevada e acentuada produção de AA mediante

adição de DHA. Com base nestes resultados, deve-se levar em consideração a importância do CII em comparação com mecanismos dependentes de GSH na reciclagem do AA mitocondrial, o que tem sido subestimado até agora.

O silenciamento do gene que codifica a GalLDH em tomate não afeta a concentração do AA, indicando que a atividade da GalLDH não é limitante para a formação do AA (Alhaghdow et al., 2007). No entanto, as plantas silenciadas possuem um crescimento claramente retardado e produzem frutos menores. Ao mesmo tempo, o metabolismo central da mitocôndria de plantas é significativamente alterado. Concluiu-se, portanto, que a GalLDH tem influência sobre outros processos respiratórios e metabólicos além da formação do AA.

## **2.8. Processos de amadurecimento e metabolismo de AA em frutos**

O amadurecimento é a fase mais estudada na pós-colheita de frutos, principalmente por ser nessa fase que as mudanças na composição ocorrem com maior intensidade. O amadurecimento é a etapa final da maturação, tornando difícil separar esta fase do início da senescência (Paul et al., 2012). Apesar de a senescência ser um processo natural, seu atraso é comercialmente desejável, pois proporciona maior vida útil aos frutos.

O AA está presente em tecidos de plantas com o crescimento e desenvolvimento ativo. A quantidade de AA nos tecidos varia entre as espécies e cultivares. Uma série de observações indicam que o acúmulo de AA durante o amadurecimento é totalmente variável (Agius et al., 2003), implicando que o estado antioxidante celular pode desempenhar um papel fundamental neste processo (Pateraki et al., 2004).

O AA se acumula frequentemente a concentrações extremamente elevadas em frutas, onde a molécula parece ter funções não necessariamente relacionadas com a atividade fotossintética. A natureza ambígua da molécula permitiu que ela se tornasse um precursor para outros compostos, mas é claro, ao agir como um precursor, a mesma não está mais disponível para cumprir outras funções (Ishikawa et al., 2006). O AA pode atuar como um precursor para moléculas tais como ácidos orgânicos encontrados em grandes quantidades em frutos, como os ácidos oxálico, treônico e tartárico (Rassam e Laing, 2005; DeBolt et al., 2007).

Durante a fase de amadurecimento dos frutos climatéricos ocorre o aumento na produção de ERO, contudo nesta etapa há grande atividade de enzimas antioxidantes e somente com a evolução do amadurecimento é que a atividade destas enzimas diminui prevalecendo à ação das ERO, causando a peroxidação de lipídios e levando os frutos à senescência (Kumar et al., 2011). As ERO também são responsáveis pela cisão não enzimática dos polissacarídeos ligados à parede celular (Schweikert et al., 2000; Dumville e Fry, 2003), contribuindo assim para o processo não enzimático de afrouxamento da parede celular durante o amaciamento da polpa dos frutos que ocorre durante o amadurecimento (Dumville e Fry, 2003) e o alongamento das células de ocorrência na fase de crescimento (Schopfer et al., 2002; Müller et al., 2009).

Singh et al. (2012) observaram em ameixa japonesa um declínio nas razões AA:DHA e GSH:GSSG evidenciando a participação do sistema antioxidante não enzimático durante o amadurecimento desses frutos. Esses autores verificaram que o efeito do sistema antioxidante não enzimático foi mais pronunciado na cultivar de ameixa com maior nível de emissão de etileno

Em espécies tais como uva, o tartarato é o ácido orgânico predominante, juntamente com ácido oxálico (Hale, 1962). Em consequência, as uvas acumulam muito pouco o AA, exceto no caso de espécies não formadoras de tartarato, onde os níveis de AA são 3 vezes maiores (DeBolt et al., 2006). A acumulação de ambos, AA e o tartarato, parecem ser regulados pelo desenvolvimento da uva, em contraste com a maioria dos frutos durante o desenvolvimento, as uvas acumulam o tartarato gradualmente (Melino et al., 2009), assim como a acumulação de oxalato em kiwi (Rassam e Laing, 2005).

Os resultados demonstraram que as bagas imaturas têm expressão dos genes da síntese de AA e uma rápida taxa de acumulação é regulada por esses genes. O baixo nível na acumulação de AA durante o desenvolvimento poderia ser devido à competição entre o metabolismo de AA e a síntese de tartarato, sendo o tartarato um metabolito, o mesmo acumula-se gradativamente. Os autores propõem que o fluxo de AA durante o desenvolvimento das bagas de uva é desviado para a síntese de tartarato e oxalato e depois retorna por processo redox (Melino et al., 2009).

## 2.9. Etileno

O amadurecimento dos frutos está sensivelmente ligado à produção de etileno (Fabi et al., 2007; Pech et al., 2008; Bapat et al., 2010). O etileno ( $C_2H_4$ ) é um hormônio gasoso vegetal que participa efetivamente da modulação dos processos que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos climatéricos, influenciando no tempo de armazenamento desses frutos (Paul et al., 2012; Imahori et al., 2013).

Estudos enfocando a ação do etileno apontam que não é somente a presença do mesmo que desencadeia as respostas nos vegetais, mas também a sensibilidade dos tecidos ao hormônio (Johnston et al., 2009), o que estaria diretamente ligado ao estágio de desenvolvimento do fruto (Corrêa et al., 2005).

A síntese do etileno tem como precursor inicial o aminoácido metionina que é convertido a S-adenosil metionina (SAM) pela ação da SAM sintetase. Nesta reação há a liberação de metil adenosina que, sob o custo de ATP, é reciclado à metionina mantendo a via autocatalítica. Esta via autocatalítica é conhecida como Ciclo de Yang (Yang, 1974). O SAM é convertido em 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) pela ação da ACC sintase (ACS) e por fim ocorre a conversão do ACC em etileno, sendo esta reação mediada pela ação da enzima ACC oxidase (ACO) que tem como cofatores, oxigênio, AA e o  $Fe^{+3}$  (Lin et al., 2009).

Nos frutos climatérico há um súbito aumento na produção de etileno durante a fase de amadurecimento. Este aumento é devido à produção autocatalítica denominada de sistema II na síntese de etileno. O sistema II pode também ser encontrado em tecidos vegetativos senescentes (Bouzayen et al., 2010). No período pré climatérico ou em frutos não climatéricos há apenas o sistema I de produção de etileno, ou seja, não se verifica a produção autocatalítica, pois o etileno nestes casos funciona como um inibidor de sua própria síntese (Bouzayen et al., 2010; Paul et al., 2012). Assim, a presença ou ausência deste sistema II pode ser um bom indicativo para distinguir o padrão de maturação dos frutos (Liu et al., 2012).

O AA é um cofator da enzima ACO que faz parte da biossíntese de etileno (Eskling et al., 1997; Davey et al., 2000; Smirnoff, 2000). Ma et al. (2010) avaliaram os efeitos do 1-metilciclopropeno (1-MCP), um inibidor da ação do

etileno, sobre o metabolismo do AA em duas cultivares de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*), 'Haitsu' e 'Ryokurei', onde foram estudados os possíveis mecanismos moleculares. Os resultados mostraram que o tratamento com 1-MCP atrasou o amarelecimento e reduziu a produção de etileno nos floretes. Por outro lado, o acúmulo de AA durante o armazenamento dos floretes foi maior no controle e a redução no acúmulo de AA foi significativo nos tratamentos com 1-MCP nas duas cultivares. A expressão gênica por análises de PCR em tempo real mostrou que o tratamento com 1-MCP diminuiu a expressão dos genes *BO-APX1*, *BO-APX2*, *BO-DHAR* e *BO-GaLLDH* comparados com o controle. A regulação da expressão destes genes podem ter contribuído para a redução do acúmulo de AA. Os resultados deste estudo podem fornecer novos possíveis mecanismos, através do qual o tratamento com 1-MCP atrasa a senescência e a produção de etileno a partir da influência do processo redox do AA.

Em trabalhos com espinafre (*Spinacia oleracea* L. cv *Bison*) o tratamento com etileno apresentou uma diminuição na síntese de AA e um aumento nas formas oxidadas durante a senescência (Gergoff et al., 2009). O etileno, também facilita o amolecimento das frutas iniciando a degradação da pectina e outros polissacarídeos da parede celular (Balibrea et al., 2000; Nishiyama et al., 2007). Durante este processo, a sacarose que está acumulada será mobilizada para fornecer energia para a respiração. Todos esses fatores podem influenciar no metabolismo do AA nos frutos de padrão climatérico.

## **2.10. Padrões respiratórios climatérico e não climatérico**

O processo de amadurecimento dos frutos é normalmente visto distinguindo frutos climatéricos e não climatéricos (Biale, 1964). O termo climatérico foi inicialmente proposto para indicar o aumento súbito na respiração dos frutos durante o amadurecimento. Frutos classificados como climatéricos apresentam aumento na taxa respiratória mesmo após serem desligados da planta, possibilitando que estes frutos sejam capazes de completar o processo de maturação após ser colhidos. Os frutos climatéricos também se destacam dos não climatéricos na capacidade de resposta à aplicação exógena do etileno (Paul et al., 2012).

Como climatéricos pode-se citar o mamão (Souza et al., 2014), a banana (Imahori et al., 2013), o tomate (Davey, 2000), o maracujá (Alves et al., 2010), a manga (Considine et al., 2001) e o melão cantaloupe (Gonçalves et al., 2013). Por outro lado, como exemplos de frutos não climatéricos podem ser citados, dentre outros, os citrus de modo geral, a uva e o morango (Paul et al., 2012).

Durante o climatério, além do pico na taxa respiratória, é comumente observado também um pico na produção de etileno. Estes dois eventos podem se coincidir como observado por Zhang et al. (2011) em abacate. Estes autores verificaram ainda que em condições onde a síntese de etileno foi inibida como na presença do 1-MCP, a atividade respiratória também foi influenciada, sugerindo que o aumento na taxa respiratória esteja intimamente ligado à produção do etileno. Na tabela 1 observam-se alguns frutos de padrão climatério e não climatério e seus níveis de AA.

**Tabela 1.** Frutos de padrão climatério e não climatério e níveis de AA em mg/kg (MF). Compilação de Davey et al. (2000) e Alves et al. (2002).

Frutos	Teor de AA mg/kg (MF)
Acerola madura (climatério)	1300
Abacate (climatério)	150-200
Cereja (não climatério)	50-80
Goiaba (padrão climatério)	2300-3000
Kiwi (climatério)	600
Laranja (não climatério)	500
Limão (não climatério)	500
Pera (climatério)	30-40
Morango (não climatério)	59-60

## 2.11. Respiração

O amadurecimento dos frutos é altamente dependente da respiração celular, pois além de depender de energia proveniente do ATP, vários intermediários do processo respiratório são demandados em rotas de síntese de outros compostos (Conde et al., 2008).

Além disto, Centeno et al. (2011) demonstraram que o malato, um intermediário do CAT, é um importante regulador do desenvolvimento e da maturação de frutos de tomate, uma vez que afeta os níveis de amido, sólidos solúveis, perda de massa e ainda a suscetibilidade à infecções. A correlação entre a respiração e a evolução do amadurecimento dos frutos é muito alta e pode ser explicitada pelas diferenças marcantes no processo de amadurecimento que ocorrem em frutos climatéricos e não climatéricos depois de colhidos (Paul et al., 2012).

Durante o amadurecimento, a participação da AOX no transporte de elétrons na CTE pode aumentar propiciando um incremento na taxa respiratória (Oliveira et al., 2015). De acordo com Perotti et al. (2014) a maior atividade da AOX nesta etapa permite manter o fluxo de elétrons da CTE gerando o ATP necessário para manter a síntese de etileno, além de prevenir contra a super redução dos complexos e conseqüentemente contra a produção de ERO. No entanto, um fato que deve ser levado em consideração é que o ATP potencialmente inibe a respiração (Ramzan et al., 2010) e neste contexto o aumento da atividade da AOX pode ser vista como uma alternativa para manutenção do fluxo da CTE sem a demasiada produção de ATP e conseqüente bloqueio de todo processo respiratório.

Xu et al. (2012) verificaram que frutos de tomateiro com baixa e alta expressão da AOX produziam, respectivamente, menos e mais etileno, sugerindo que a AOX desempenha algum papel na síntese do hormônio ou mesmo em sua síntese auto catalítica.

Vários trabalhos têm demonstrado diferentes níveis de participação da AOX e da COX durante o amadurecimento de frutos. Resultados comprovam a diminuição da capacidade máxima da AOX e da COX durante o amadurecimento de tomate (Almeida et al. 1999; Jarmuszkiewicz et al., 2000). Em contrapartida, Considini et al. (2001) detectaram relativo aumento da capacidade AOX durante o

amadurecimento da manga enquanto observou-se o declínio da contribuição da COX. Silva et al. (2015) verificaram durante o amadurecimento de dois híbridos de mamão (Tainung01 e UENF/Caliman01) que a participação da AOX foi crescente com uma participação decrescente da via COX. Tendência semelhante foi verificada na cultivar de mamão 'Golden' por Oliveira et al. (2015).

A AOX pode aumentar ou diminuir durante o amadurecimento e este fator pode estar implicado na regulação da síntese da GalLDH e é possível que essas alterações estejam afetando o teor de AA durante o amadurecimento de frutos, o que em parte incluem as mudanças da via AOX. Esta hipótese ainda não foi testada.

## 2.12. Teores de AA em frutos

Nas plantas, o AA acumula-se principalmente em órgãos fotossintéticos, mas também pode atingir altas concentrações em tecidos não fotossintéticos; estas concentrações dependem fortemente de fatores ambientais, genótipo, órgão e estágio de desenvolvimento (Davey et al., 2000; Dumas et al., 2003; Poiroux-Gonord et al., 2010). O teor de AA no tecido vegetal, também é dependente da capacidade de reciclagem do mesmo, além da capacidade de síntese do órgão.

Algumas culturas hortícolas acumulam níveis muito elevados de AA, por exemplo, o fruto de acerola (*Malpighia glabra* L.), que contém mais de 1% de AA do seu peso fresco (Loewus e Loewus, 1987). As frutas cítricas e as batatas são conhecidas por serem as mais importantes fontes de vitamina C na dieta ocidental por causa das grandes quantidades consumidas (Ball, 1998).

O teor de AA em manga mostrou uma grande diminuição desde a fase inicial de desenvolvimento do fruto até a sua maturação fisiológica (ponto de colheita). Após a colheita, o teor de AA na manga não se alterou significativamente, apesar da tendência à diminuição ligeira no final do amadurecimento. O teor do DHA mostrou um perfil similar, diminuindo a partir de 90 até 120 dias após a floração, seguindo inalterado. Este perfil foi intimamente associado com a atividade da GalLDH, responsável pela etapa da síntese de AA. Durante o amadurecimento, a atividade GalLDH diminuiu entre o 2º e o 4º dia após a colheita e em seguida retornou aos níveis iniciais (Gomez e Lajolo, 2008).

Em goiaba, o teor de AA mostrou um aumento contínuo durante a maturação, enquanto o DHA aumentou no 4º dia após a colheita, diminuindo depois lentamente. A atividade da GalLDH seguiu um perfil próximo quando comparado com a variação no nível de AA, exceto no ponto final da maturação, quando o nível de AA permaneceu inalterado, enquanto ocorreu a diminuição da atividade da enzima. A atividade da GalLDH aumentou cerca de três vezes a partir do 2º dia até o 6º dia após a colheita, retornando ao nível inicial no 9º dia após a colheita (Gomez e Lajolo, 2008).

Os níveis de AA em tomates foram determinados a partir do desenvolvimento da antese até a maturação. As flores exibiram um teor muito baixo de AA, em comparação com os frutos verdes, que apresentaram valores mais elevados, mas ainda muito menores comparados com os frutos maduros que apresentaram os maiores níveis de AA. Um aumento substancial no teor de AA foi observado na transição da cor verde para a coloração rosa e persistiu nas fases de coloração vermelha e mais madura, que é quando o fruto é tipicamente consumido (Ioannidi et al., 2009).

O acúmulo do AA em frutos de morango cv. Camarosa aumentou durante o desenvolvimento a partir da fase imatura (verde) até os frutos maduros (vermelhos), alcançando uma concentração final de 50 mg/100 g de peso fresco. Se levado em consideração o teor de AA com base no peso seco do fruto, o aumento nos níveis de AA durante o amadurecimento é muito mais alto do que na comparação com base no peso fresco. Nesse sentido, o acúmulo de AA passou de 23,9 mg/100 g de peso fresco em frutos verdes para 292,5 mg /100 g de peso seco em frutos maduros, um aumento superior a 12,2 vezes (Cruz-Rus et al., 2011). Até o momento ainda carece de explicações mais detalhadas o efeito da síntese e reciclagem do AA nas variações dos teores desse componente nos frutos.

### 3. OBJETIVOS

Contribuir para maior entendimento da função da respiração e da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase na acumulação de AA em mitocôndrias de frutos.

#### 3.1. Objetivos específicos

- a) Determinar o efeito da GalLDH na atividade da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.
- b) Determinar o efeito das alterações no transporte de elétrons na capacidade de síntese e acumulação de AA em mitocôndrias.
- c) Explorar a influência dos complexos respiratórios I, III e a via respiratória alternativa AOX na atividade da GalLDH em mitocôndrias de frutos.
- d) Determinar a influência do amadurecimento dos frutos na capacidade das mitocôndrias para sintetizar e acumular AA.

## **4. TRABALHOS**

### **4.1. Influência da L-galactona-1,4- lactona desidrogenase na cadeia transportadora de elétrons**

#### **RESUMO**

Este trabalho objetivou investigar a influência da atividade da L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) no funcionamento da cadeia de transporte de elétrons (CTE) mitocondrial. Para tanto foram analisados a atividade respiratória, a síntese de ascorbato (AA) e o transporte de elétrons dependentes da atividade da GalLDH em mitocôndrias de polpa de mamão, morango e de tomate cereja de duas linhagens de transgênicos com a GalLDH silenciada, confrontados com o tipo selvagem. Além do NADH e do L-galactona-1,4-lactona (GalL) também foram usados o piruvato, o glutamato, o succinato e o malato como substratos respiratórios para avaliar a atividade respiratória dependente da atividade GalLDH. Os frutos de mamoeiro foram avaliados em três estádios de maturação (verde, intermediário e maduro), enquanto o tomate foi testado nos estádios de maturação verde e maduro. O morango, um fruto não climatérico, foi testado apenas no estágio maduro. O estágio de amadurecimento dos frutos foi caracterizado pela coloração do fruto, firmeza da polpa, teor de sólidos solúveis e teor de vitamina C do extrato da polpa. Verificou-se no mamão um aumento na

capacidade da AOX e diminuição da participação da COX durante o amadurecimento dos frutos, enquanto no morango o consumo de oxigênio é dado exclusivamente pela atividade COX, não sendo verificada participação da AOX na respiração das mitocôndrias isoladas da polpa dos frutos. Mitocôndrias isoladas do mamão, do morango e do tomate selvagem pré-incubadas com GalL mostraram-se insensíveis aos inibidores da COX (azida) e da AOX (n-PG), independentemente do substrato respiratório utilizado, enquanto nas linhagens transgênicas de tomate a presença de azida e n-PG inibiu a atividade da COX e AOX, respectivamente. Na ausência do GalL, a atividade respiratória em mitocôndrias de mamão foi inibida pela presença de inibidores das vias AOX e COX em todos os substratos testados, enquanto nas mitocôndrias isoladas de morango verificou-se que a COX foi inibida sendo observado uma respiração residual. A insensibilidade aos inibidores das vias AOX e COX parece estar ligada a atividade da enzima GalLDH e não ao produto de sua atividade, uma vez que na presença do AA, foi verificada a inibição da respiração após a adição da azida e do n-PG. Os resultados aqui apresentados são inéditos e surpreendentes, o que confirma a complexidade da síntese de AA e sua ligação com a CTE mitocondrial, assim como a influência da atividade da GalLDH na atividade respiratória. Outros estudos mais específicos precisam ser feitos para verificar quais os mecanismos que impedem a inibição das oxidases terminais da CTE mitocondrial quando a GalLDH está ativa. Também será interessante para trabalhos futuros testar se essas respostas são exclusivas para o mamão, o morango e o tomate ou se trata de uma resposta comum para todos os frutos de padrão climatérico e não climatérico.

## **Influence of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase in the electron transport chain**

### **ABSTRACT**

This study aimed at investigating the influence of the L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity on the mitochondrial electron transport chain (ETC). Therefore, we analyzed the respiratory activity, the synthesis of ascorbate (AA) and the GalLDH activity -dependent electron transport in mitochondria from pulp of papaya, strawberry and cherry tomato. Two transgenic tomato lines with the silenced GalLDH enzyme and the corresponding wild type genotype were used. NADH, galactono-1,4-lactone (GalL) pyruvate, glutamate, succinate and malate were used as respiratory substrates to evaluate the GalLDH activity-dependent respiration. The papaya fruit were evaluated in three ripening stages (green, intermediate and ripe) where as the tomato lines were tested in the green and ripe ripening stages. Strawberry, a non-climacteric fruit, was tested only in the ripe stage. The fruit ripening stage was characterized by fruit color, flesh firmness, soluble solids and vitamin C content from the pulp extract. It was found in papaya an increase in AOX capacity and decreased COX participation during fruit ripening, where as the strawberry oxygen consumption was given exclusively by COX capacity, not being detected participation of AOX in the respiration of isolated mitochondria from fruit pulp. Mitochondria isolated from papaya, strawberry, wild type tomato and pre incubated with GalL shown to be insensitive to COX inhibitors (azide) and AOX (n-PG), regardless of the respiratory substrate used. In the

transgenic tomato lines, the presence of azide and n-PG inhibited COX and AOX capacity, respectively. In the absence of GalL, the mitochondrial respiratory activity of papaya was inhibited by inhibitors of AOX and COX pathways with all substrates tested. In isolated strawberry mitochondria, COX was inhibited observing a residual respiration. The insensitivity of AOX and COX pathways to inhibitors seems to be related to the activity of GalLDH enzyme but not the product of its activity, since in the presence of AA was observed inhibition of respiration after adding azide and n-PG. The results presented here are novel and confirm the complexity of AA synthesis and its connection with the CTE, as well as the influence of GalLDH activity on the respiratory activity. More specific studies need to be done to check the mechanisms that prevent the inhibition of terminal oxidases from mitochondrial CTE when GalLDH is active. It will also be interesting for future studies to test whether these responses are unique for papaya, strawberry, and tomato or it is a common response to climacteric and non-climacteric fruits.

## INTRODUÇÃO

A fosforilação oxidativa está acoplada ao transporte de elétrons na membrana interna da mitocôndria onde uma sequência de reações de oxido-redução transfere os elétrons de moléculas orgânicas reduzidas para o oxigênio. O transporte de elétrons na CTE mitocondrial permite a liberação parcial e controlada de energia, biologicamente aproveitável para a biossíntese de ATP. Em eucariontes, a CTE mitocondrial é composta por quatro complexos principais de proteínas que podem se associar formando supercomplexos constituídos por dois ou até três complexos (Millar et al., 2011).

A UQ, uma benzoquinona lipossolúvel que transporta prótons e elétrons, faz a ligação entre o CI e o CII com o CIII, permitindo a disponibilização de parte da energia da oxidação dos substratos na forma de gradiente de prótons através da membrana interna mitocondrial (Millar et al., 2011). Em mitocôndrias de vegetais, a UQ também pode transportar elétrons provenientes das vias

alternativas compostas pelas NAD(P)H desidrogenases e pela AOX para o CIII (Finnegan et al., 2004; Elhafez et al., 2006)

A transferência dos elétrons entre o CIII e o CIV é feita com a participação do citocromo C, uma pequena proteína fracamente ligada à superfície externa da membrana interna mitocondrial, sendo fundamental na regulação da velocidade do fluxo de elétrons na CTE (Rodríguez-Roldán et al., 2006). O citocromo C pode receber também elétrons vindos diretamente da GalLDH, a partir da oxidação do GalL na reação de síntese do AA (Bartoli et al., 2000).

Para que o fluxo de elétrons da CTE seja mantido é necessário que ocorra a transferência destes elétrons ao oxigênio, o qual será reduzido à água. Esta transferência de elétrons ocorre no CIV, denominado de via citocromo C oxidase (COX) ou pela via da oxidase alternativa (AOX), sendo esta via insensível ao cianeto (Gupta et al., 2009; Millar et al., 2011; Van Dongen et al., 2011).

A GalLDH, enzima localizada na membrana interna das mitocôndrias, catalisa a etapa final da biossíntese do AA, reduzindo o citocromo C, também sendo atribuída a ela um papel importante na estrutura do CI (Schertl et al., 2012; Szarka et al., 2013).

Em teoria, se o fluxo de elétrons para a via COX for maior que sua capacidade de reduzir o  $O_2$ , pode haver um aumento de  $UQH_2$ , saturando a CTE. Isto pode ocorrer devido a abundância de substrato oxidável ou quando a disponibilidade de energia celular está elevada. Nesse caso, a COX prevalece no estado reduzido, restringindo a redução do  $O_2$  e limitando o fluxo de elétrons na CTE e a fosforilação oxidativa. Essas condições são propícias para a estimulação da via AOX (Lambers, 1985; Vanlerberghe e McIntosh, 1997).

A atividade da GalLDH afeta o estado redox da COX, a localização da enzima na membrana interna das mitocôndrias, contribui para o transporte de elétrons na etapa de redução da COX. O processo de oxidação do GalL a AA libera elétrons, tendo como aceitador dos elétrons liberados nessa reação o citocromo C que é reduzido. A seguir, esses elétrons são transferidos para a COX que é reduzida, em consequência o fluxo de elétrons via COX é afetado (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003; Szarka et al., 2007; Blokhina e Fagerstedt, 2010). Segundo alguns autores (Bartoli et al., 2000; Bartoli et al., 2005), a atividade da GalLDH pode influenciar fortemente o fluxo de elétrons na CTE, o que levanta

várias hipóteses sobre a atividade da enzima e a síntese de AA e os transportadores de elétrons da CTE.

Para Alhag Dow et al. (2007), a atividade da GalLDH poderia estar influenciando na função mitocondrial, o que explicaria o atraso no alongamento celular em folhas de tomateiro. Também segundo Alhag Dow et al. (2007), o silenciamento da GalLDH causou alterações no CAT, diminuindo os níveis dos substratos orgânicos, o que alterou o transporte de elétrons e a taxa respiratória em mitocôndrias isoladas de folhas de tomateiro. Este resultado é interessante, porque demonstra uma forte ligação funcional entre a atividade respiratória e a atividade da GalLDH e a síntese de AA.

Para investigar a influência da GalLDH no funcionamento da CTE foram analisados o efeito da ativação da GalLDH no transporte de elétrons e de que maneira esta enzima interfere na atividade das vias respiratórias em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão, morango e tomate cereja transgênicos com a GalLDH silenciada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Frutos

#### Mamão

Foram utilizados frutos de mamão 'Golden', procedentes de pomar comercial da empresa Caliman Agrícola S/A, localizado em 19°15'S e 39°51'70"W, na cidade de Linhares – ES. Os frutos foram colhidos e após lavagem e seleção no *packing house* foram transportados para o Setor de Fisiologia Vegetal (SFV) do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ), a cerca de seis horas do local da colheita.

No laboratório os frutos foram sanitizados em solução de hipoclorito de sódio, 100 mL L<sup>-1</sup> por 5 min, seguido de lavagem em água deionizada. Após a

sanitização, os frutos foram depositados em bancadas para a secagem com auxílio de papel toalha.

Os frutos verdes (fruto desenvolvido com 100% da casca verde) foram armazenados em câmaras com controle de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $85\% \pm 5\%$ ) e amostrados em três estádios de desenvolvimento, sendo utilizadas cinco repetições. A padronização dos estádios de desenvolvimento, verde, intermediário e maduro, foi baseada principalmente pela coloração da casca dos frutos, conforme apresentado na figura 1, que apresenta também os dados da caracterização do amadurecimento dos frutos realizada pela análise dos atributos físico-químicos, conforme descrito a seguir.

### **Morango**

Os frutos de morango 'Oso Grande', foram adquiridos no comércio local, completamente maduros (fruto desenvolvido com 100% da casca vermelha), sendo transportados imediatamente para o SFV da UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ) onde foram avaliados no mesmo dia. No laboratório os frutos foram sanitizados conforme descrito anteriormente para o mamão e foram avaliados utilizando 5 repetições onde cada repetição era formada de 20 frutos, sendo caracterizados quanto ao estágio de amadurecimento a partir da análise dos atributos físico-químicos, conforme apresentado junto à figura 2.

### **Tomate**

Sementes de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106') gentilmente cedidas pelo pesquisador Pierre Baldet do Institut National de la Recherche Agronomique, Université Bordeaux, França foram plantadas em vasos com 50 cm de altura em solo com matéria orgânica (argila 49%, matéria orgânica 28% e areia 23%). Foram utilizadas plantas do tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (linhas 5-13 e 8-14) com a GalLDH silenciada. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, regadas 2 vezes ao dia, diariamente, sendo os vasos adubados de acordo com as necessidades da cultura.

Os frutos dos três genótipos foram colhidos na maturação fisiológica (frutos desenvolvidos com casca 100% verde) e após lavagem foram transportados para o SFV do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ). No laboratório, após sanitização como descrito anteriormente para os demais frutos, os mesmos foram armazenados em câmaras com controle de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $85\% \pm 5\%$ ) e amostrados em dois estádios de desenvolvimento, sendo utilizadas cinco repetições. A padronização dos estádios de desenvolvimento, verde e maduro, foi baseada principalmente pela coloração da casca dos frutos, conforme apresentado na figura 3, que apresenta também os dados da caracterização do amadurecimento dos frutos realizada pela análise dos atributos físico-químicos, conforme descrito a seguir.

### **Padronização dos estádios de amadurecimento**

*Coloração da casca* – As medições de coloração da casca dos frutos foram realizadas utilizando um colorímetro portátil (Croma meter, modelo CR-300, Minolta, Japão) sendo realizadas três medições por fruto, equidistantes, sempre na região equatorial. Foram mensuradas a luminosidade ( $L^*$ ) e o ângulo de cor *hue* (McGuire, 1992).

*Firmeza (F)* – Foi obtida por meio da resistência à penetração dos frutos utilizando um texturômetro digital (Texture analyser, modelo TA.XT Express, UK) com sonda de 2 milímetros de diâmetro. A velocidade de penetração da sonda nos frutos foi de  $1 \text{ mm s}^{-1}$  sendo o registrado os valores quando a sonda detectou resistência igual a 0,1 Newton. Foram efetuadas duas medições em cada fruto sempre na região equatorial e em lados opostos sendo os testes conduzidos até a profundidade de 1 cm com o registro da maior força durante a penetração e os resultados expressos em Newtons.

*Teor de sólidos solúveis (SS)* - O teor de sólidos solúveis foi quantificado utilizando um refratômetro digital (DRBS-300, França). Foram extraídas duas gotas do suco da polpa dos frutos usando prensa manual, sendo os resultados expressos em  $^{\circ}\text{Brix}$ .

## Isolamento de mitocôndrias

### Mamão

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 300g de polpa dos mesmos frutos utilizados para as análises físico-químicas. O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) em cerca de 1,0 L de tampão de isolamento [manitol 0,35 M, MOPS 50 mM, EDTA 3 mM, Cys 8 mM, BSA 0,1% (p/v), PVP-25 0,4% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.500 g, por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min, sendo o *pellet* ressuspendido em tampão de lavagem [manitol 0,35 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 8 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 9.000 g por 15 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

A purificação das mitocôndrias foi feita em gradiente de *percoll*. O precipitado coletado foi suspenso em 1 a 2 mL do tampão de lavagem e vertido sobre 30 mL de tampão de purificação [*percoll* 22,5 % (v/v), manitol 0,6 M, MOPS 10 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] sendo centrifugado a 12.000 g por 45 min. As mitocôndrias purificadas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na região basal dos tubos, sendo diluídas aproximadamente dez vezes com tampão de lavagem e centrifugadas a 10.000 g por 15 min. O procedimento seguiu o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015).

### Morango

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 600g da polpa dos mesmos frutos utilizados para as análises físico-químicas. O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) em cerca de 1,0 L de tampão de isolamento [sacarose 0,4 M, MOPS 50 mM, EDTA 3 mM, Cys 8 mM, BSA 0,1% (p/v), PVP-25 0,2% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.000 g, por 10 min. O sobrenadante foi

centrifugado a 10.000 *g*, por 15 min, sendo o *pellet* ressuspensionado em tampão de lavagem [sacarose 0,4 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 *g* por 10 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 10.000 *g*, por 20 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

A purificação das mitocôndrias seguiu o mesmo protocolo descrito para a purificação das mitocôndrias de polpa de mamão. Todo o procedimento seguiu o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015), com modificações descritas no texto.

### **Tomate**

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 40g da polpa dos mesmos frutos utilizados para as análises físico-químicas. O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) em cerca de 200 ml de tampão de isolamento [sacarose 0,4 M, MOPS 50 mM, EDTA 8 mM, Cys 4 mM, BSA 0,5 % (p/v), PVP-25 0,4% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.500 *g*, por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 *g*, por 15 min, sendo o *pellet* ressuspensionado em tampão de lavagem [manitol 0,4 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,5 % (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 *g* por 8 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 9.000 *g*, por 15 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

A purificação das mitocôndrias seguiu o mesmo protocolo descrito para a purificação das mitocôndrias de polpa de mamão. Todo o procedimento seguiu o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015), com modificações descritas no texto.

### **Determinação da integridade de membrana**

A integridade da membrana mitocondrial foi avaliada medindo a atividade da COX pela adição do citocromo C. A COX localiza-se na membrana interna da mitocôndria e requer o citocromo C na forma reduzida. O citocromo C é uma proteína grande, deste modo não consegue atravessar a membrana de uma mitocôndria intacta. Portanto, quando as mitocôndrias intactas são incubadas com

o citocromo C a atividade da COX deve permanecer inalterada. Assim, por meio da comparação da atividade da COX, na presença e na ausência de Triton X-100, detergente empregado para romper a membrana. Desta forma uma estimativa da integridade da membrana mitocondrial pode ser obtida (Sweetlove et al., 2007).

A COX é quantificada com o citocromo C, na presença ou ausência de Triton X-100, por meio do consumo de oxigênio registrado pelo método polarográfico, usando um eletrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK) (Sweetlove et al., 2007).

O ensaio foi conduzido em temperatura de 25°C. Em 1 mL do meio de reação adicionou 5-20 µL de mitocôndrias purificadas seguindo-se de: a) 20 µL de AA 500 mM sendo registrada a taxa respiratória; b) 10µL de citocromo C 5 mM após o qual também foi registrada a taxa respiratória e c) 5 µL Triton X-100 10% (v/v), sendo a seguir registrada a taxa respiratória. A atividade da COX foi dada pela diferença entre a taxa respiratória (c) e a taxa respiratória (a). A porcentagem de integridade da membrana foi dada pela expressão a seguir, segundo Sweetlove et al. (2007):

$$1 - \frac{\text{taxa respiratória (b)} - \text{taxa respiratória (a)}}{\text{taxa respiratória (c)} - \text{taxa respiratória (a)}} \times 100$$

### **Determinação da concentração de proteínas**

Determinado espectrofotometricamente, em 595 nm, como descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como proteína padrão.

### **Atividade respiratória em mitocôndrias isoladas de frutos**

Foi utilizado 1 mg de proteína para determinação da atividade respiratória das mitocôndrias isoladas, pelo método polarográfico, usando um eletrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK) em 1,0 mL de meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] à

temperatura de 25°C. Todo o ensaio foi realizado na presença de ATP 200 µM e NADH 8 mM como substrato oxidável. Após a adição de 100 nmoles de ADP ao meio de reação foram registrados os estados 3 e 4 da respiração, sendo determinados o controle respiratório, evidenciando a capacidade fosforilativa das mitocôndrias (Duque e Arrabaça, 1999; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008; Oliveira et al., 2015), usado como indicativo de boas preparações mitocondriais.

A capacidade da via AOX foi determinada a partir da taxa de consumo de O<sub>2</sub> na presença de azida 3 mM, em mitocôndrias no estado 4 (Oliveira et al., 2015). Utilizou-se o meio de reação já descrito anteriormente, porém, suplementado com 2,5 µg de oligomicina.mg de proteína<sup>-1</sup> e 300 µM de propranolol para inibir a ATP-sintase e o canal aniônico, respectivamente (Calegario et al., 2003; Martins et al., 1993; Beavis e Vercesi, 1992). Ao meio foram adicionados 1 mM de ditioneitol (DTT) e 0,15 mM de piruvato para ativar a AOX e BSA 0,5% (p/v) para inibir a atividade da proteína desacopladora (UcP). Enquanto a adição de 20 µM de n-PG tem como objetivo a inibição da AOX.

A partir dos registros do consumo de O<sub>2</sub> foram calculados a taxa respiratória total, a taxa respiratória da via COX e a taxa respiratória da via AOX para efeito de comparação entre as duas vias de consumo de O<sub>2</sub> seguindo o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015).

### **Efeito do GalL na capacidade das vias respiratórias**

A atividade respiratória em mitocôndrias isoladas foi mensurada na presença de GalL. As mitocôndrias (1mg de proteína) foram pré-tratadas com GalL 5 mM e o consumo de oxigênio foi avaliado em 1,0 mL de meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] à temperatura de 25°C, usando um eletrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK). Em seguida foi estimulada a respiração utilizando diferentes substratos respiratórios: NADH 8 mM, piruvato 20 mM, malato 10mM, glutamato 20 mM e succinato 15 mM. Para inibição das vias AOX e COX foram utilizados o n-PG 20 µM e a azida 3 mM, respectivamente.

Todo o procedimento descrito anteriormente foi repetido, porém a atividade respiratória foi determinada sem o pré-tratamento das mitocôndrias com GalL.

Todo o ensaio foi realizado na presença de Triton X-100 5% (v/v) para o rompimento das membranas externa e interna das mitocôndrias para facilitar o acesso do substrato GalL a enzima GalLDH.

### **Efeito do AA na capacidade das vias respiratórias**

A atividade respiratória em mitocôndrias isoladas foi mensurada na presença de AA. As mitocôndrias (1mg de proteína) foram pré-tratadas com AA nas seguintes concentrações: 0,05 mM; 0,5 mM e 5 mM. O consumo de oxigênio foi avaliado em 1,0 mL de meio de reação [manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] à temperatura de 25°C, usando um eletrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK). Em seguida foi estimulada a respiração utilizando o substrato respiratório NADH 8 mM. Para inibição das vias AOX e COX foram utilizados o n-PG 20 µM e a azida 3 mM, respectivamente.

Todo o ensaio foi realizado na presença de Triton X-100 5% (v/v) para o rompimento das membranas externa e interna das mitocôndrias para facilitar o acesso do substrato GalL a enzima GalLDH.

Para as mitocôndrias isoladas de frutos de morango e tomates não foram feitos ensaios com o pré-tratamento de AA.

### **Análises estatísticas**

Os ensaios com o mamão e morango foram conduzidos seguindo delineamento inteiramente casualizado (DIC).

O experimento com o tomate foi conduzido no DIC seguindo esquema fatorial (3x2) sendo um fator composto por três genótipos: o selvagem (WT) e duas linhagens transgênicas (GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14) e o outro fator por dois estádios de maturação, verde e maduro.

Após a coleta os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o programa R.

## RESULTADOS

### Padronização dos estádios de amadurecimento

A média dos valores de luminosidade dos frutos de mamão no estágio verde foi superior a 50, aumentando significativamente com o amadurecimento dos frutos (Figura 1). No que diz respeito ao ângulo de cor *hue*, este variou de 115,9 °h nos frutos verdes, para 88,1 °h nos frutos intermediários e 81,2 °h nos frutos maduros (Figura 1). Isto representa uma mudança na coloração da casca dos frutos que passa de um verde mais escuro para uma tonalidade mais clara ( $L^* \geq 50$ ), seguindo para a coloração verde-amarelada e finalizam em um tom amarelado (Figura 1).

A firmeza dos frutos apresentou uma diminuição significativa desde o fruto verde até o maduro, onde os frutos maduros apresentaram firmeza de 4,9 N (Figura 1).

O teor SS do fruto não variou ( $P \leq 0,05$ ) entre os diferentes estádios de maturação, passando de 9,4 °Brix no estágio verde para 10,0 °Brix nos frutos maduros (Figura 1).



$L^*$	55,0 c	72,9 b	94,9 a
Ângulo <i>hue</i>	115,8 a	88,1 b	81,2 c
Firmeza (N)	14,6 a	9,8 b	4,9 c
SS (°Brix)	9,3 a	9,6 a	10,0 a

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 1.** Fotos ilustrativas da padronização dos frutos de mamão ‘Golden’ em três estádios de maturação (verde, intermediário e maduro) e os respectivos parâmetros da caracterização física e química dos frutos.

Os frutos de morangueiro foram avaliados completamente maduros, como pode ser comprovado pelos parâmetros de cor como a luminosidade de 40,2, o ângulo de cor *hue* de 38,2 °h, enquanto a firmeza do fruto foi de 1,8 N e o teor de SS de 9,4 °Brix (Figura 2). O morango por ser um fruto não climatérico deve ser colhido no ponto de consumo apresentando as melhores características para o consumo.



$L^*$	40,2
Ângulo <i>hue</i>	38,6
Firmeza (N)	1,7
SS (°Brix)	9,3

**Figura 2.** Fotos ilustrativas da padronização dos frutos de morango ‘Oso Grande’ e os respectivos parâmetros da caracterização física e química dos frutos.

No tomate a alteração na coloração, firmeza e teor de SS mostram a evolução do amadurecimento dos frutos. A luminosidade da casca variou de cerca de 49 nos frutos verdes para próximo de 35 nos frutos maduros, considerando os três genótipos (Figura 3). O ângulo de cor *hue* dos frutos verdes foi de 120,0°h, 118,6°h e 119,4°h, enquanto nos frutos maduros foi de 41,8°h, 35,1°h e 35,7°, respectivamente, para os genótipos WT, 5-13 e 8-14 (Figura 3).

Não se observou diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) para nenhum parâmetro de cor entre os genótipos WT, 5-13 e 8-14, observado nos dois estádios avaliados (Figura 3).

Nos frutos verdes foi verificada diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) entre os genótipos quanto à firmeza. Os valores de firmeza apresentados foram de 11,5 N, 8,0 N, e 8,1 N, respectivamente para os genótipos WT, 5-13 e 8-14, onde o WT apresentou os maiores valores. A firmeza dos frutos maduros foi mais baixa com valores médios de 3,4 N, 3,5 N e 3,6 N para o WT, 5-13 e 8-14, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre os genótipos (Figura 3).

O teor de SS do fruto não apresentou diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) dentre o WT e as linhas transgênicas (Figura 3).

	<b>Verde</b>		
			
	<b>WT</b>	<b>5-13</b>	<b>8-14</b>
<i>L</i> *	47,4 a	51,1 a	48,9 a
Ângulo hue	120,0 a	118,6 a	119,4 a
Firmeza (N)	11,5 a	8,0 b	8,0 b
SS (°Brix)	3,5 a	3,3 a	3,8 a

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

	<b>Maduro</b>		
			
	<b>WT</b>	<b>5-13</b>	<b>8-14</b>
<i>L</i> *	35,6 a	35,1 a	35,7 a
Ângulo hue	41,8 a	51,7 a	46,6 a
Firmeza (N)	3,3 a	3,5 a	3,6 a
SS (°Brix)	4,2 a	4,5 a	4,6 a

As médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

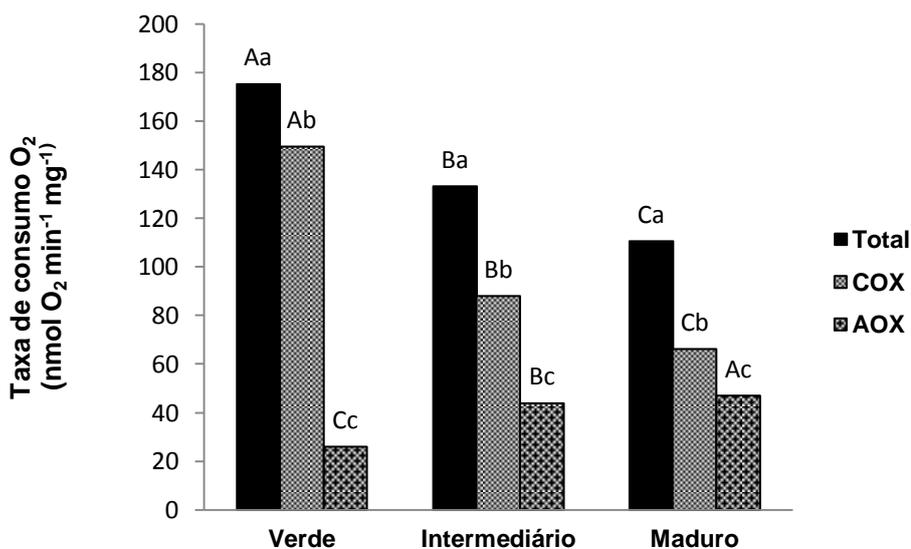
**Figura 3.** Fotos ilustrativas da padronização dos frutos de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106') do tipo selvagem (WT) e linhas transgênicas da GalLDH (5-13 e 8-14) em dois estádios de maturação (verde e maduro) e os respectivos parâmetros da caracterização física e química dos frutos.

## Atividade respiratória em mitocôndrias isoladas

### Mamão

O isolamento e a purificação das mitocôndrias, por meio do gradiente em *percoll*, possibilitaram a obtenção de mitocôndrias com integridade de membrana superior a 80% em todas as preparações. Em frutos verdes, intermediários e maduros foram registrados CR de 4,5; 3,2 e 2,5, respectivamente, indicando que as preparações estavam boas, com bom nível de acoplamento das mitocôndrias na oxidação do substrato (Duque e Arrabaça, 1999; Mariano et al., 2004; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008; Oliveira et al., 2015).

Os resultados mostraram diferença ( $P \leq 0,05$ ) na respiração total das mitocôndrias isoladas entre os estádios de maturação (Figura 4). A respiração total nas mitocôndrias isoladas da polpa do mamão diminuiu com o amadurecimento dos frutos. No fruto verde a taxa de consumo de  $O_2$  foi de  $175,5 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , enquanto no fruto maduro foi de  $111,3 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Figura 4).



<b>COX</b>	<b>85%</b>	<b>65%</b>	<b>49%</b>
<b>AOX</b>	<b>15%</b>	<b>35%</b>	<b>51%</b>

As médias seguidas pela mesma letra maiúsculas não diferem entre si na comparação entre os estádios de maturação (verde, intermediário e maduro), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúsculas não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo estágio de maturação pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 4.** Taxa de consumo de O<sub>2</sub> (nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) total e específica para as vias da citocromo C oxidase (COX) e oxidase alternativa (AOX) em mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de mamão em três estádios de maturação (verde, intermediário e maduro). Os valores apresentados abaixo da figura representam a participação percentual de cada uma das vias (COX e AOX) no consumo de O<sub>2</sub> em cada estágio de amadurecimento dos frutos. Foi utilizado como substrato respiratório NADH 8 mM no meio de reação.

Nos frutos de mamoeiro verdes, cerca de 85% do consumo total de O<sub>2</sub> das mitocôndrias é devido à participação da COX, enquanto o restante do consumo de O<sub>2</sub>, cerca de 15%, se deve à participação da AOX (Figura 4). Com o amadurecimento dos frutos a participação da COX diminuiu, chegando a 49% nos frutos maduros, enquanto a participação da AOX aumentou chegando a 51% (Figura 4).

## Morango

A Figura 5 mostra as taxas de consumo de  $O_2$  de frutos de morango completamente maduros, representando a respiração total e a respiração devido a participação da COX e da AOX. O CR apresentou valores médios de 1,8 indicando que as preparações estavam boas, com bom nível de acoplamento das mitocôndrias na oxidação do NADH, assim como foi verificado o nível de integridade da membrana das mitocôndrias que apresentaram valores superiores a 80%.

A taxa respiratória total foi de  $139,5 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  sendo praticamente toda ela dada pela atividade COX, enquanto a participação da AOX não foi verificada (Figura 5).



verificada diferença na taxa respiratória total e devido às participações da COX e AOX durante o amadurecimento dos frutos (Figura 4).

Os resultados revelaram, também, que na presença do Gall a adição dos inibidores n-PG e azida não inibiu, respectivamente, a AOX e COX, independente do estágio de amadurecimento dos frutos, sendo observado taxa de consumo de O<sub>2</sub> muito similar à taxa respiratória total (Figura 6A).

Para confirmar este efeito do Gall na respiração foram verificados outros substratos respiratórios como piruvato 20 mM, glutamato 20 mM, succinato 15 mM e malato 10 mM (Figura 6). Em todos os outros substratos testados o consumo de O<sub>2</sub> foi menor do que o verificado para NADH 8 mM como substrato (Figura 4), tanto no que diz respeito a respiração total, como na respiração específica para a COX e AOX (Figuras 6A-E). Também verifica-se, quando foram utilizados outros substratos diferentes do NADH, que a taxa respiratória variou durante o amadurecimento dos frutos, sendo maior ( $P \leq 0,05$ ) nos frutos verdes em relação aos estádios intermediário e maduro (Figuras 6B-E).

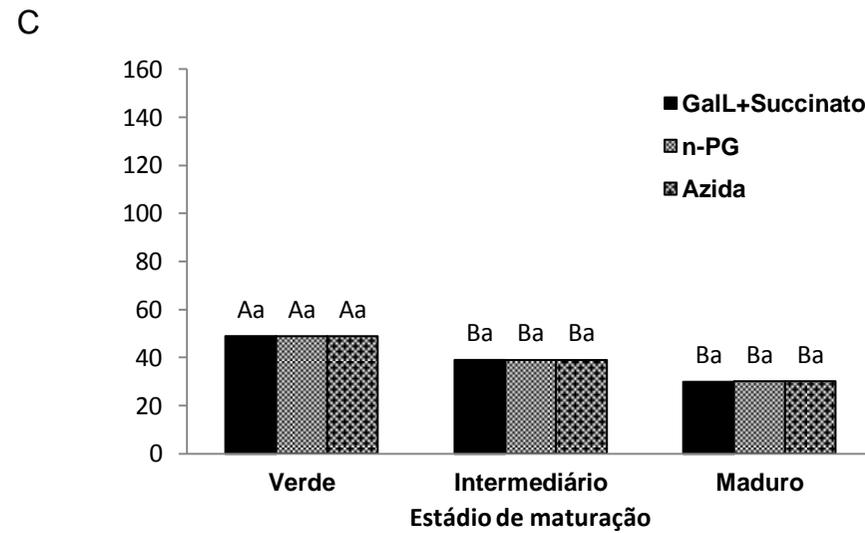
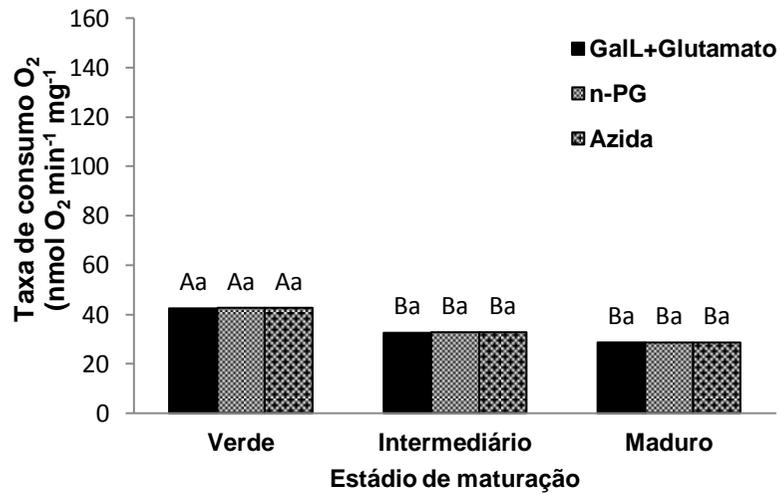
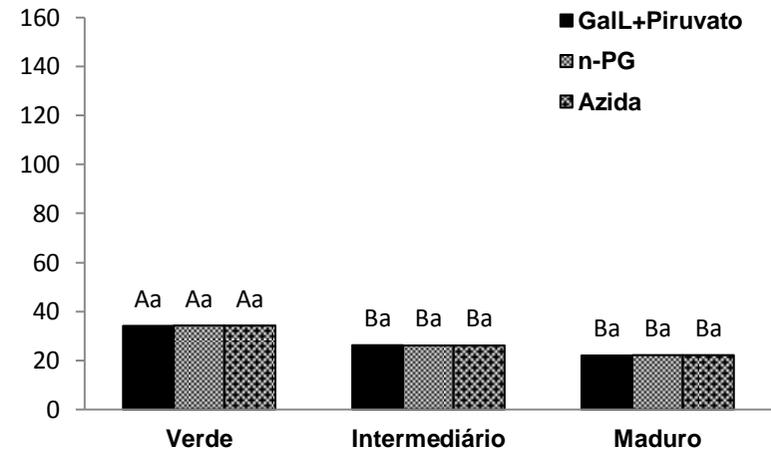
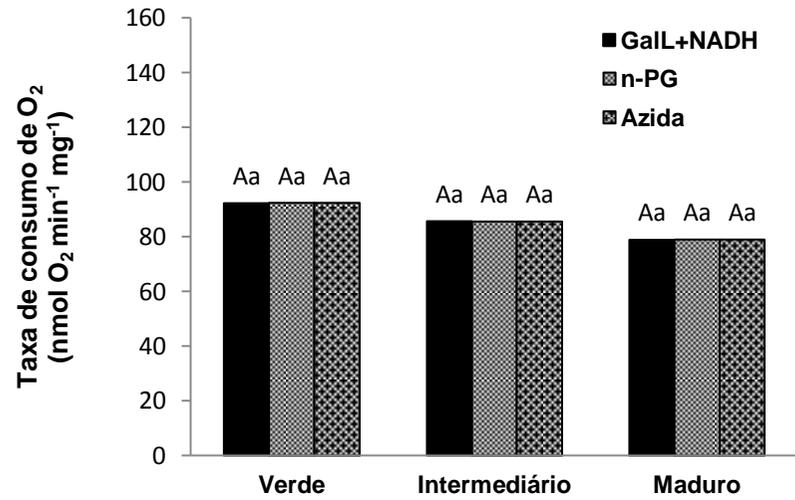
Mitocondrias pré-tratadas com Gall e usando piruvato 20 mM como substrato registrou taxa respiratória total nos frutos verdes com médias de cerca de 36,1 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>, enquanto nos frutos nos demais estádios de amadurecimento o valor médio foi em torno de 22,3 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> (Figura 6B).

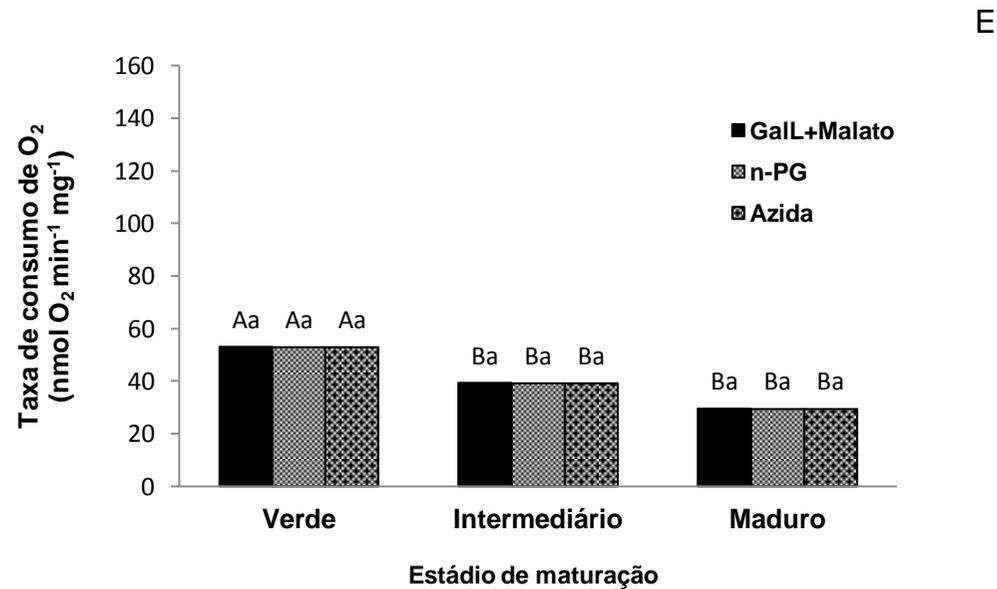
A taxa respiratória total em mitocôndrias pré-tratadas com Gall e usando o glutamato 20 mM como substrato apresentou valores de 43,6 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>, enquanto nos frutos intermediários e maduros registrou taxas de 32,2 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> e 21,8 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 6C).

O pré-tratamento com Gall em mitocôndrias empregando o succinato 15 mM registrou taxa respiratória total nos frutos verdes com média de 49,2 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, nos demais estádios avaliados o valor médio registrado foi em torno de 34,5 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> (Figura 6D). Quando utilizou-se o malato 10 mM foi observada taxa respiratória nos frutos verdes com média de 53,5 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, enquanto nos frutos intermediários e maduros registrou taxas de 39,3 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> e 26,7 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 6E).

A utilização dos substratos piruvato, glutamato, succinato e malato, também revelaram, que na presença do Gall a adição dos inibidores n-PG e azida não houve inibição, respectivamente, da AOX e COX, independente do

estádio de amadurecimento dos frutos, sendo observado taxa de consumo de  $O_2$  muito similar à taxa respiratória total (Figura 6B-E).





As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os estádios de maturação (verde, intermediário e maduro), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo estágio de maturação pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

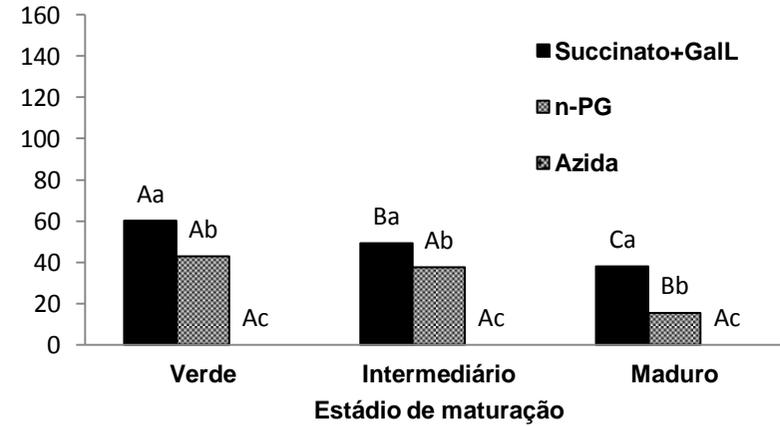
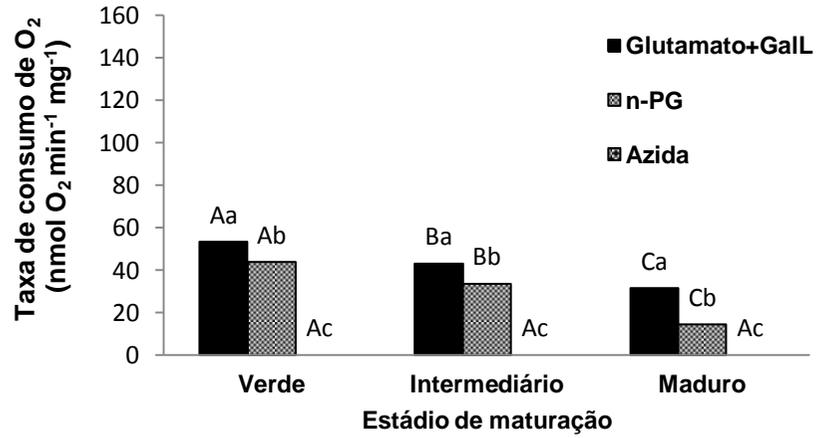
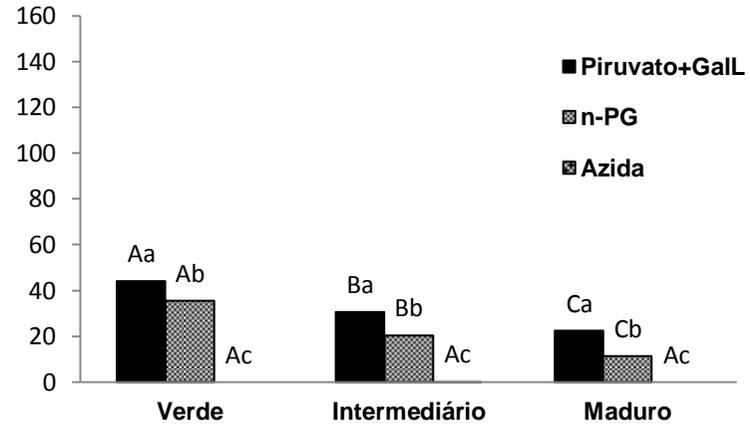
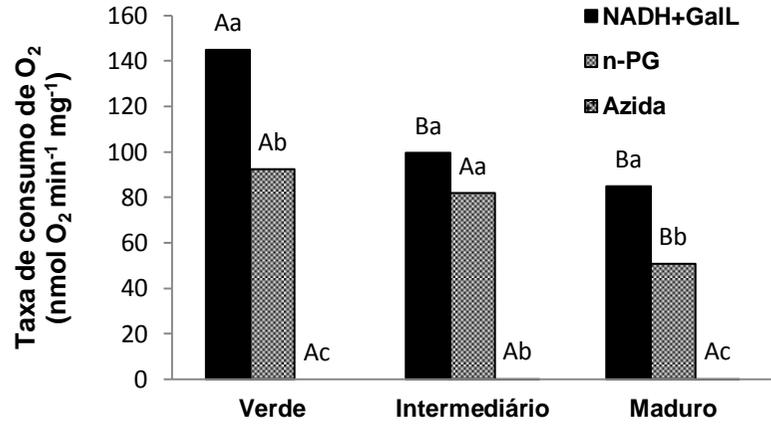
**Figura 6.** Taxa de consumo de  $O_2$  ( $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de mamão em três estádios de maturação (verde, intermediário e maduro). As mitocôndrias foram pré-incubadas em GalL 5 mM antes de serem adicionados os substratos NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).

A adição de GalL ao meio de reação durante a avaliação da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas mudou significativamente o padrão de resposta, em comparação ao pré-tratamento com GalL. Nesse caso, verifica-se efeito inibitório dos bloqueadores das vias COX e AOX, assim como diferença significativa na atividade respiratória durante o amadurecimento dos frutos, independentemente do substrato utilizado (Figura 7). Os resultados mostram que a inibição sequencial da COX e da AOX reduziu ( $P \leq 0,05$ ) o consumo de  $O_2$  independentemente do substrato utilizado, indicando a participação de cada uma dessas vias na respiração total das mitocôndrias isoladas (Figura 7).

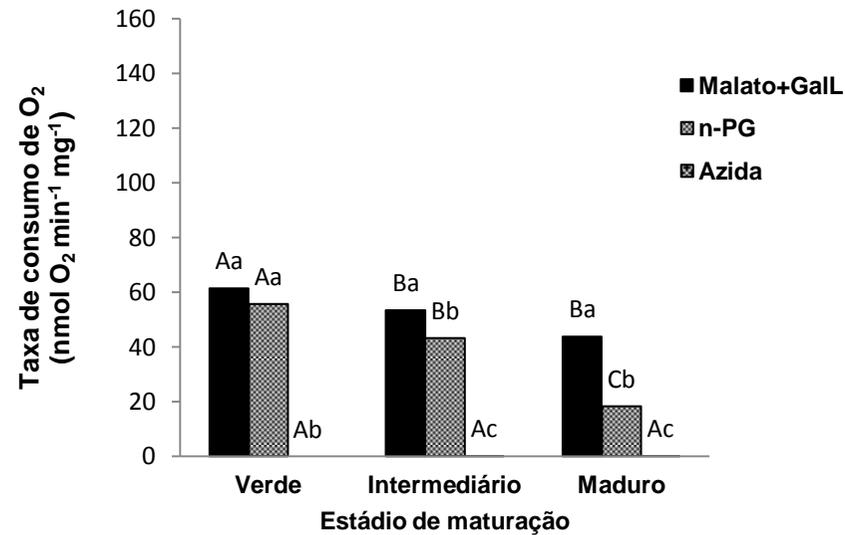
O uso de NADH 8mM como substrato respiratório na presença de GalL mostrou uma taxa respiratória nos frutos verdes em torno de  $144,9 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , superior ( $P \leq 0,05$ ) ao registrado para os frutos nos estádios intermediário ( $95,3 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) e maduro ( $84,9 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), os quais não diferiram entre si (Figura 7A).

Os substratos respiratórios piruvato 20 mM, glutamato 20 mM, e succinato 15 mM na presença de GalL, registraram taxa respiratória nos frutos verdes de  $44,9 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ;  $53,2 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e  $60,5 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectivamente, sendo essas taxas respiratórias superiores ( $P \leq 0,05$ ) aos outros estádios avaliados. As taxas registradas para os frutos no estágio intermediário ( $31,0 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ;  $43,1 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e  $49,2 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) e maduro ( $22,2 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ;  $31,3 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e  $38,02 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), para o piruvato, glutamato e succinato, respectivamente, apresentaram diferença significativa, sendo as taxas mais elevadas verificadas nos frutos intermediários.

O malato como sustrato respiratório na presença de GalL apresentou taxa respiratória total nos frutos verdes de  $61,9 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , média superior ( $P \leq 0,05$ ) à apresentada para os frutos nos estádios intermediário ( $50,9 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) e maduro ( $46,8 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), os quais não diferiram entre si.



E



As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os estádios de maturação (verde, intermediário e maduro), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo estágio de maturação pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

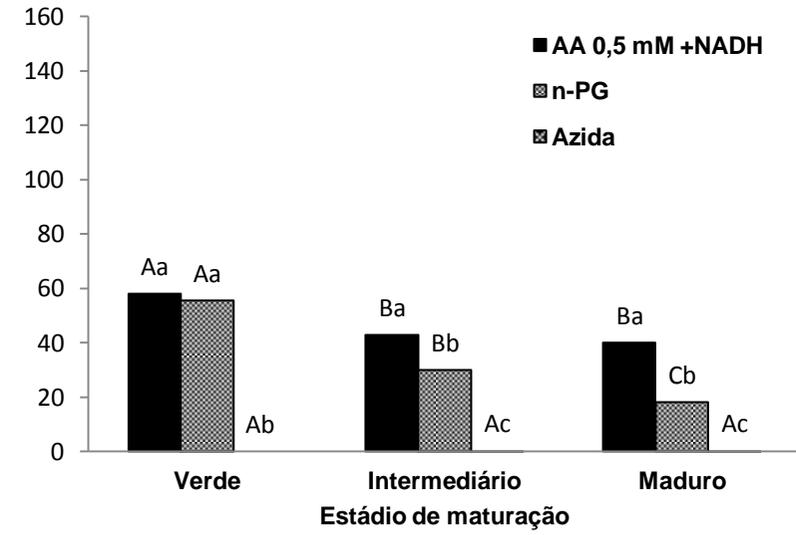
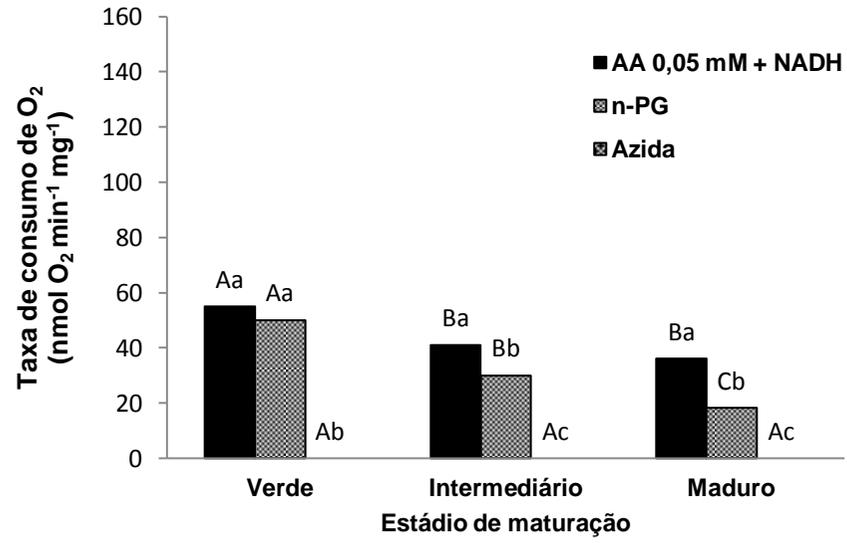
**Figura 7.** Taxa de consumo de  $O_2$  ( $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de mamão em três estádios de maturação (verde, intermediário e maduro). As taxas de consumo de  $O_2$  foram registradas apenas na presença de GalL 5 Mm com os seguintes substratos respiratórios NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).

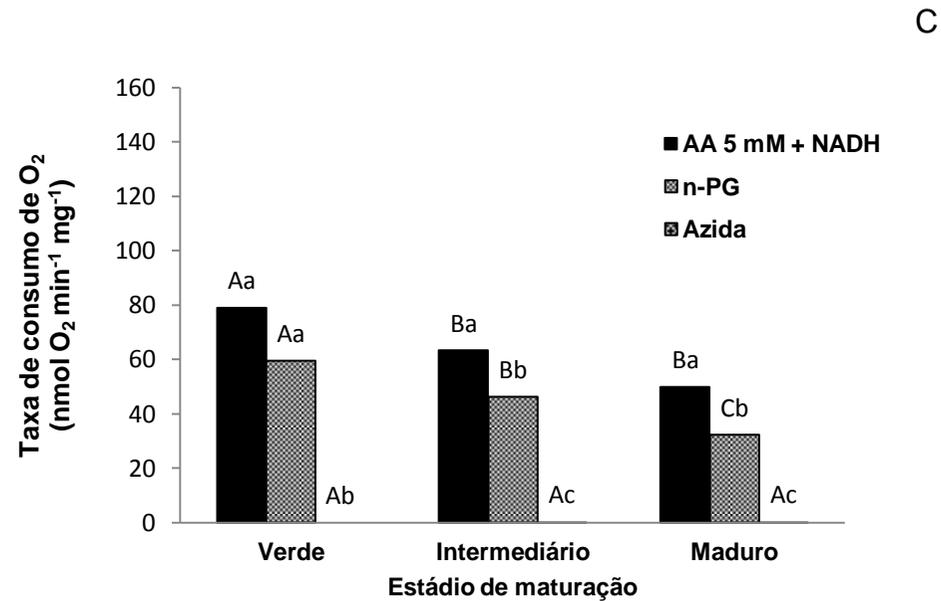
É possível que o efeito do pré-tratamento das mitocôndrias com o GalL na respiração das mitocôndrias isoladas da polpa do mamão seja devido ao AA produzido pela atividade GalLDH. Para testar esta hipótese foi avaliada a taxa respiratória em mitocôndrias pré-tratadas com AA.

As mitocôndrias foram pré-tratadas em três concentrações de AA na presença de NADH. Na figura 8A estão os resultados dos testes onde as mitocôndrias foram pré-tratadas com a concentração de AA 0,05 mM, apresentando taxa respiratória total nos frutos verdes de  $55,14 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , superior ( $P \leq 0,05$ ) à verificada nos frutos intermediários ( $41,4 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) e maduros ( $36,2 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). Entre frutos nos estádios intermediários e maduros não foi verificada diferença significativa.

Quando foi testada a concentração de AA 0,5 mM observa-se diferença significativa entre os diferentes estádios de amadurecimento. Os frutos verdes apresentaram média superior ( $P \leq 0,05$ ) registrando taxa respiratória total de  $58,02 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , enquanto nos frutos intermediários e maduros a taxa respiratória foi de  $43,2 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e  $40,9 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectivamente, não diferindo entre si (Figura 8B).

Na figura 8C a concentração de AA 5 mM apresentou diferença significativa entre os estádios de amadurecimento, a média superior ( $P \leq 0,05$ ) registrada foi para os frutos verdes com taxa respiratória total de  $78,15 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , enquanto os frutos intermediários e maduros registrou médias de  $63,5 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e  $49,1 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectivamente.





As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os estádios de maturação (verde, intermediário e maduro), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo estágio de maturação pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

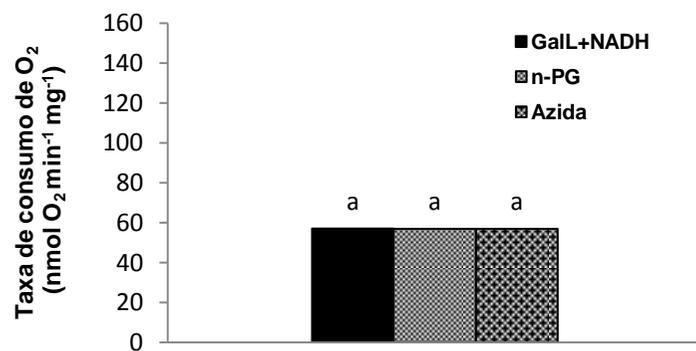
**Figura 8.** Taxa de consumo de  $O_2$  ( $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de mamão em três estádios de maturação (verde, intermediário e maduro). As mitocôndrias foram pré-incubadas em AA com as seguintes concentrações 0,05 mM (8A); 0,5 mM (8B) e 5 mM (8C) antes da adição do substrato NADH 8 mM.

O efeito do GalL na atividade respiratória em mitocôndrias isoladas também foi avaliado em frutos maduros de morango, em função de diferentes substratos respiratórios.

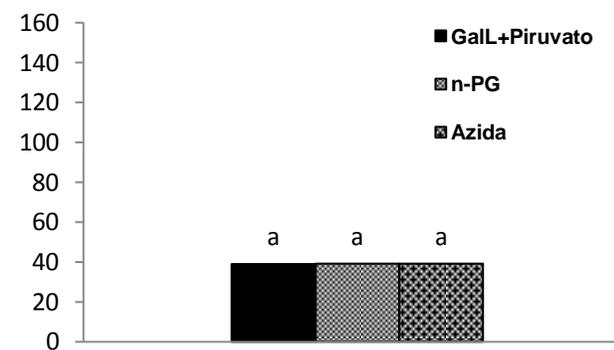
O consumo de  $O_2$  em mitocôndrias pré-tratadas com GalL não foi influenciado ( $P \leq 0,05$ ) pela adição dos bloqueadores das vias COX (azida) e AOX (n-PG), independente do substrato respiratório utilizado (Figura 9). Mitocôndrias pré-tratadas com GalL e usando NADH 8mM como substrato registrou taxa respiratória total de cerca de  $56,9 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Figura 9A).

Utilizando os substratos respiratórios piruvato 20 mM, glutamato 20 mM, succinato 15 mM e malato 10 mM em mitocôndrias pré-tratadas com GalL 5 mM, observa-se taxas respiratórias totais de  $39,1 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ;  $42,5 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ,  $55,2 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  e  $47,3 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectivamente (Figuras 9B-E).

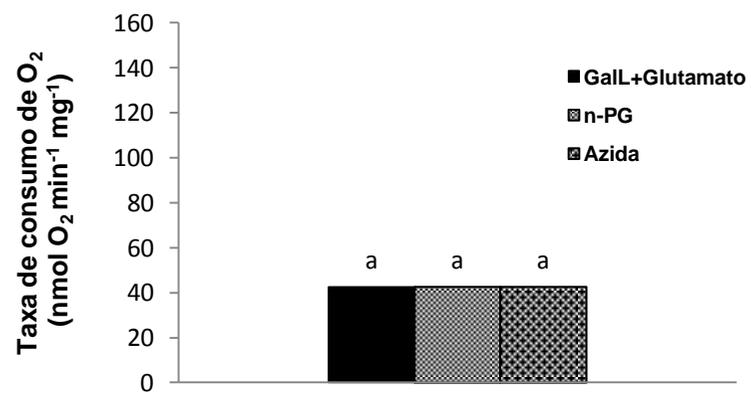
A



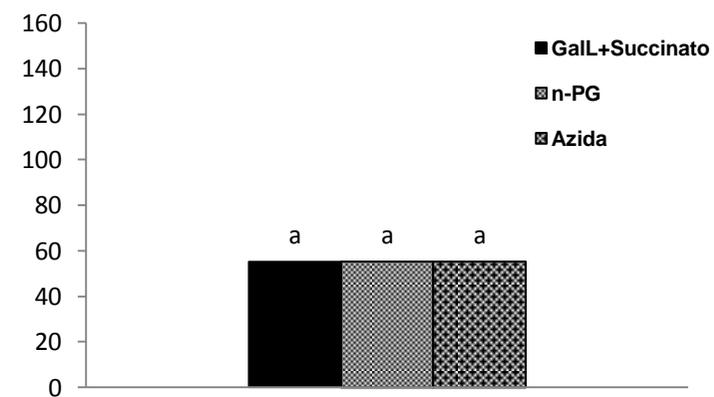
B

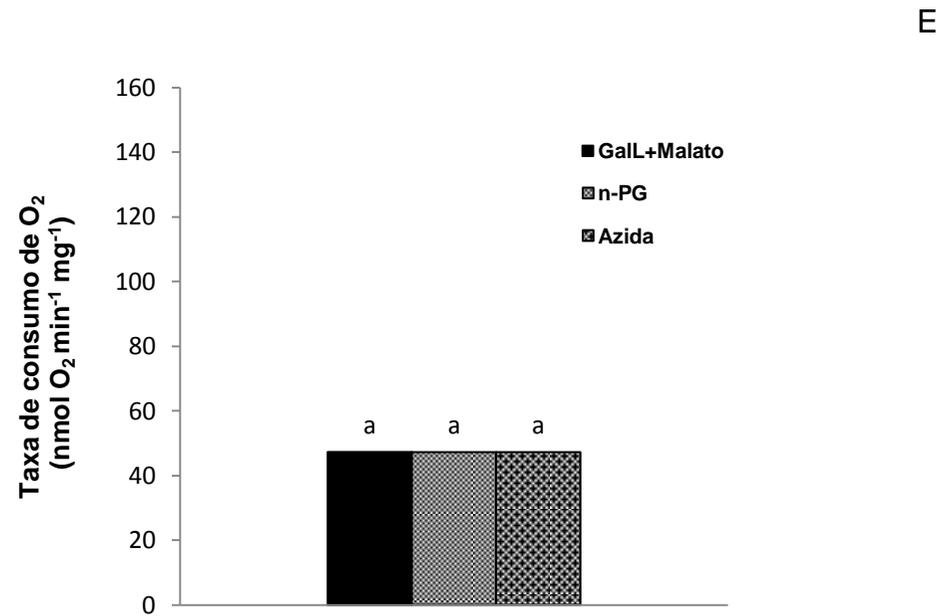


C



D



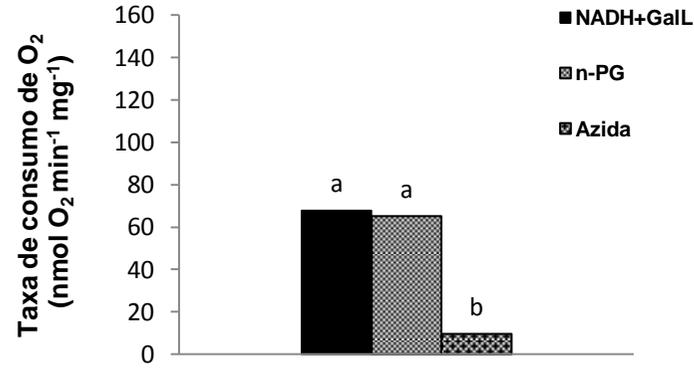


As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

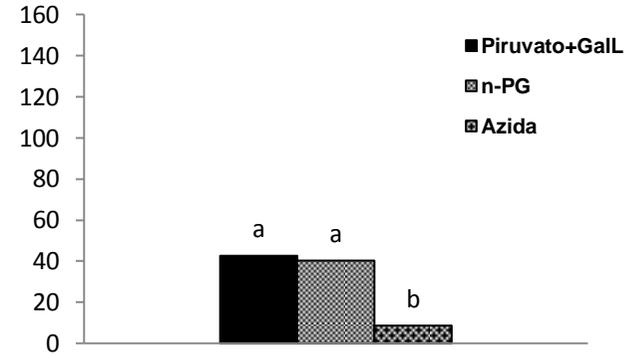
**Figura 9.** Taxa de consumo de O<sub>2</sub> (nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de morango. As mitocôndrias foram pré-incubadas em GalL 5 mM antes de serem adicionados os substratos NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).

Foi também avaliado o efeito da adição de GalL ao meio de reação durante as medidas da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas e sua consequência sobre as vias COX e AOX (Figura 10). Diferentemente do que havia sido verificado com o pré-tratamento com GalL (Figura 9), verifica-se efeito ( $P \leq 0,05$ ) inibitório do bloqueador da COX, mas não do bloqueador da AOX, independente do substrato utilizado (Figuras 10A-E). Esses resultados diferem daquele verificado no mamão maduro (Figuras 7A-E), devido à insensibilidade ao bloqueador da AOX e também, por apresentar uma respiração residual, mesmo após a adição do n-PG e da azida. Esses resultados da respiração em mitocôndrias isoladas da polpa do morango parecem indicar que nesses frutos maduros a via AOX não está presente como foi constatado no mamão maduro.

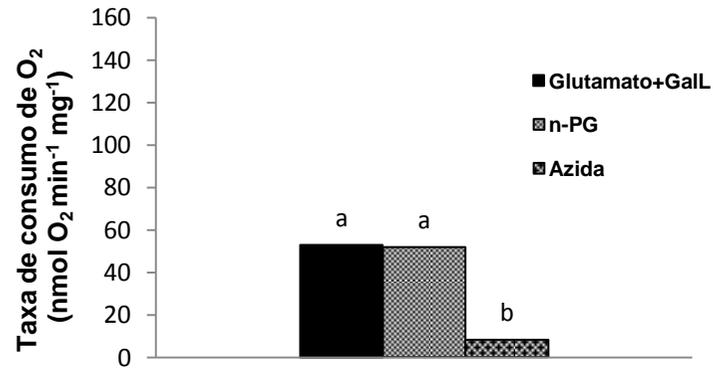
A



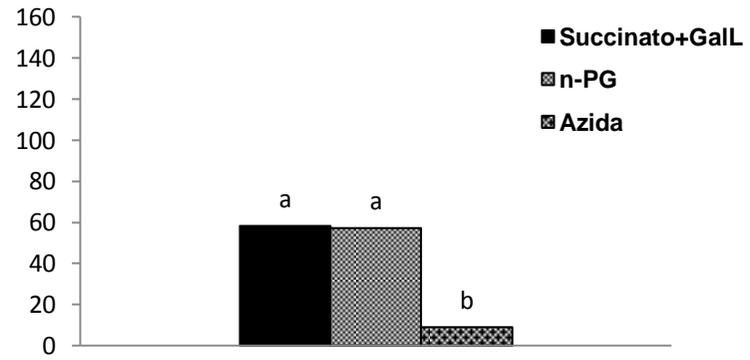
B

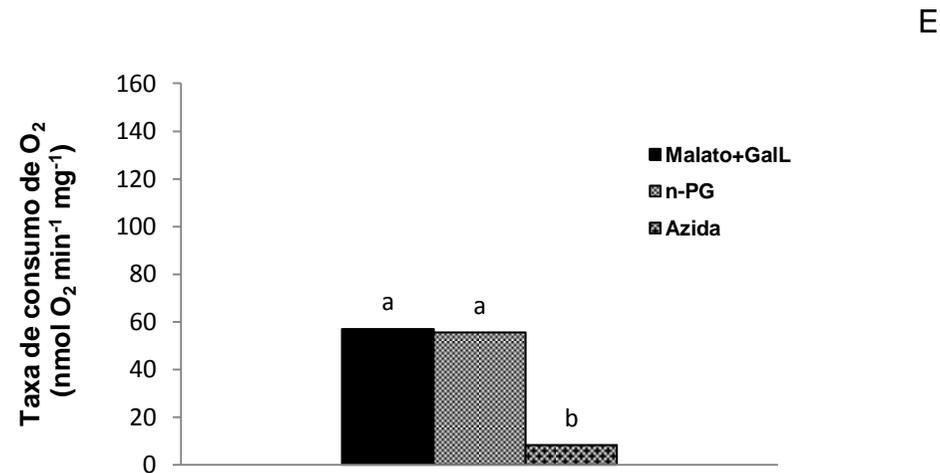


C



D





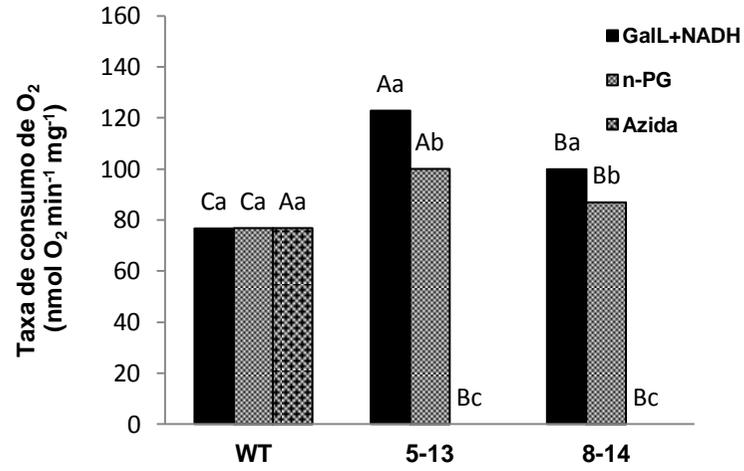
As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 10.** Taxa de consumo de O<sub>2</sub> (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos de morango. As taxas de consumo de O<sub>2</sub> foram registradas apenas na presença de GalL 5 Mm com os seguintes substratos respiratórios NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).

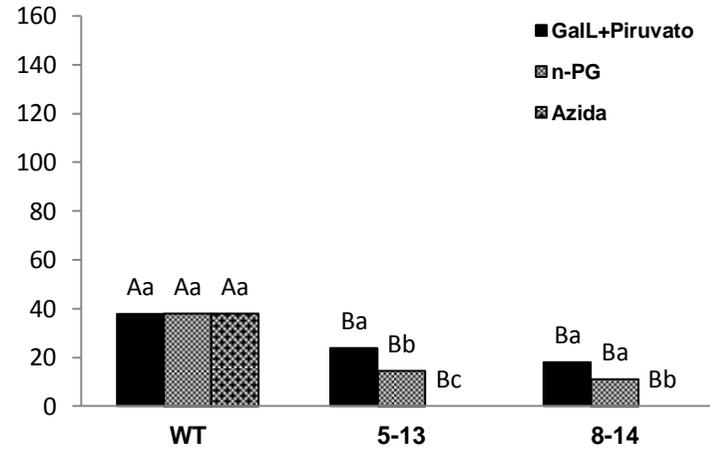
## **Efeito do GalL nas vias respiratórias em frutos de tomate com linhas transgênicas com a GalLDH silenciada e tipo selvagem**

Para explorar melhor a relação entre o pré-condicionamento das mitocôndrias em GalL e a possível relação com a atividade GalLDH e a atividade respiratória foram analisadas a capacidade respiratória das mitocôndrias de frutos de tomate selvagem e transgênicos com a GalLDH silenciada na presença do precursor GalL. Para isso foram utilizados tomates em dois estádios de maturação (verde e maduro).

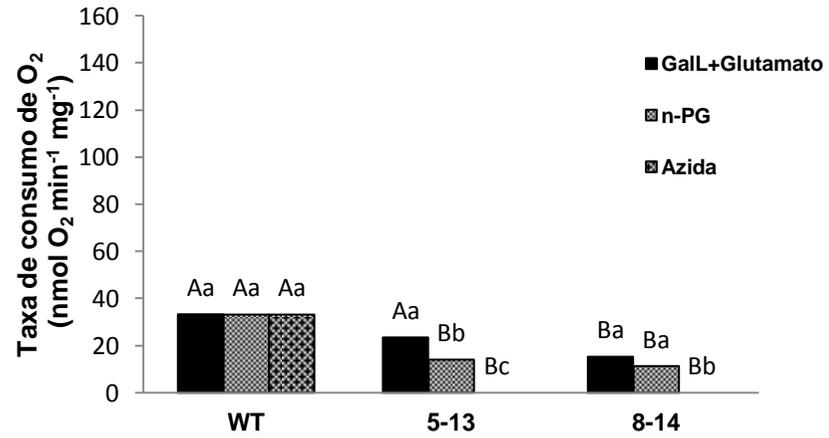
A adição dos bloqueadores n-PG e azida não inibiu o consumo de O<sub>2</sub> nas mitocôndrias isoladas do tomate WT em qualquer dos substratos utilizados para quantificar a respiração (Figuras 11A-E). Porém, resultados distintos podem ser observados nas linhas 5-13 e 8-14, onde a adição dos bloqueadores da COX e AOX levou a inibição das vias COX e AOX, mostrando queda na taxa respiratória (Figuras 11A-E). Destaca-se, ainda, que quando foi utilizado o NADH 8mM como substrato respiratório, a taxa respiratória total e a da via COX foi mais alta ( $P \leq 0,05$ ) nas linhas transgênicas 5-13 e 8-14 em comparação ao WT (Figura 11A). Para os demais substratos prevalece a tendência de maior atividade respiratória total e das vias COX e AOX no WT em comparação as linhas 5-13 e 8-14 (Figuras 11B-E).



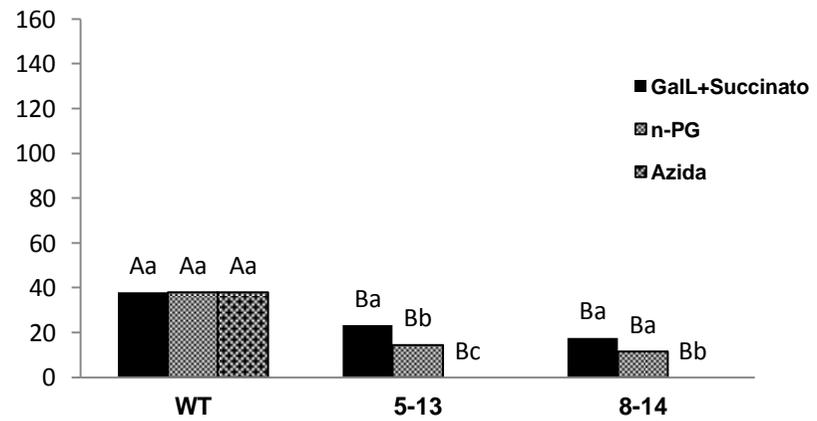
A



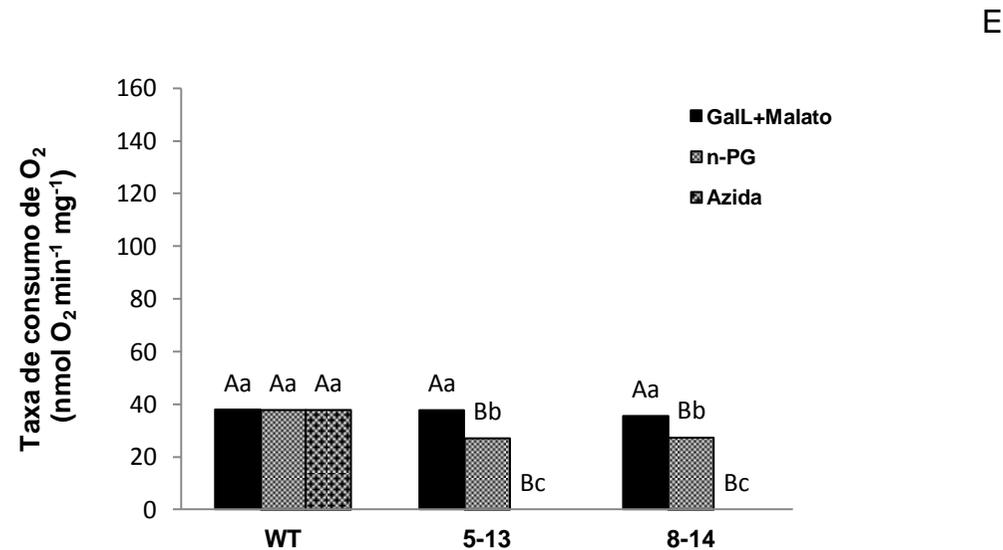
B



C



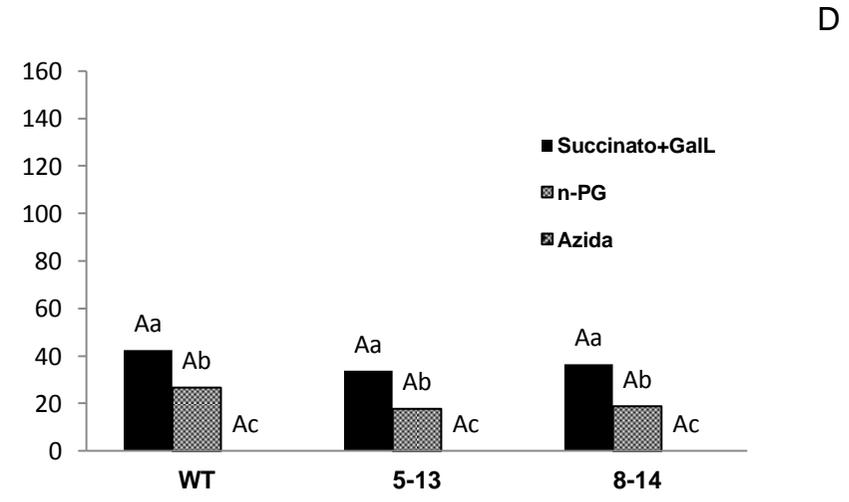
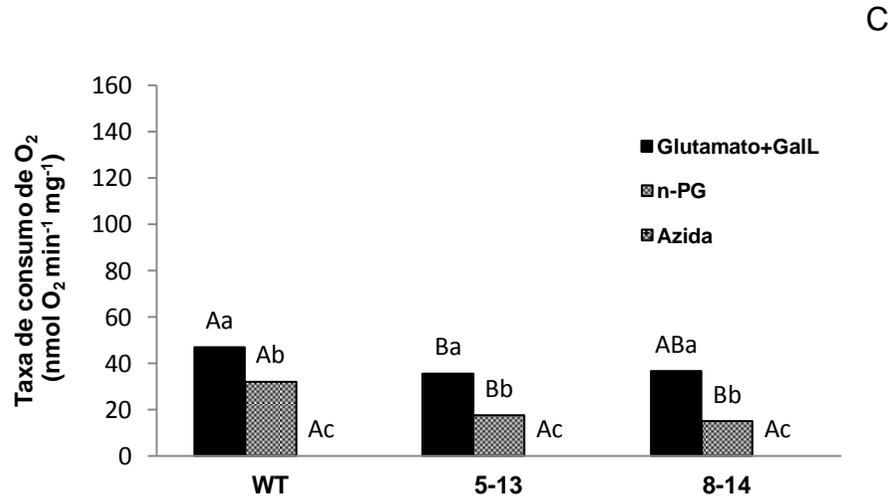
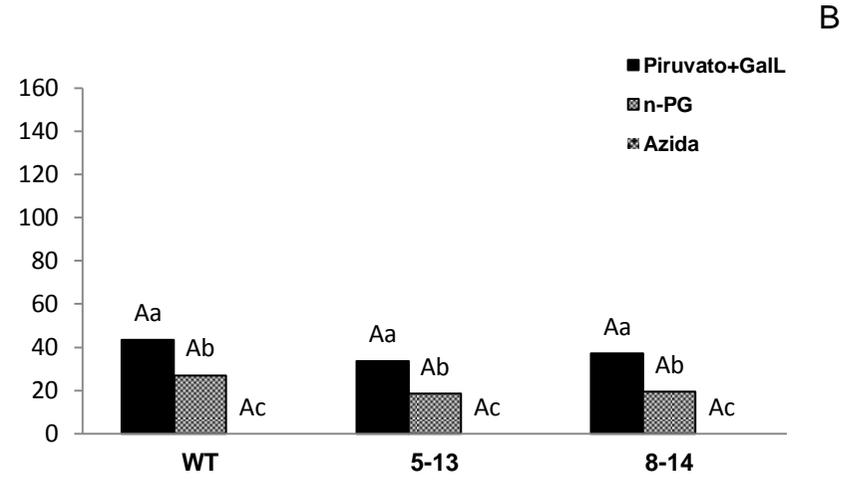
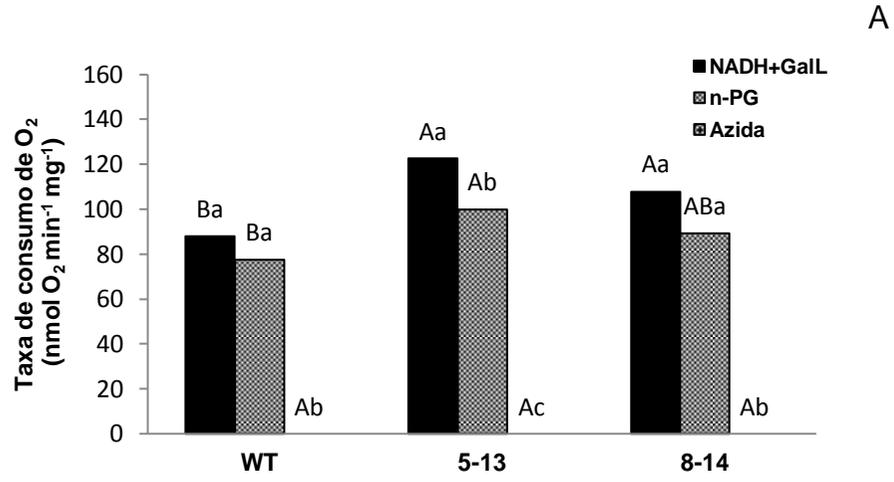
D

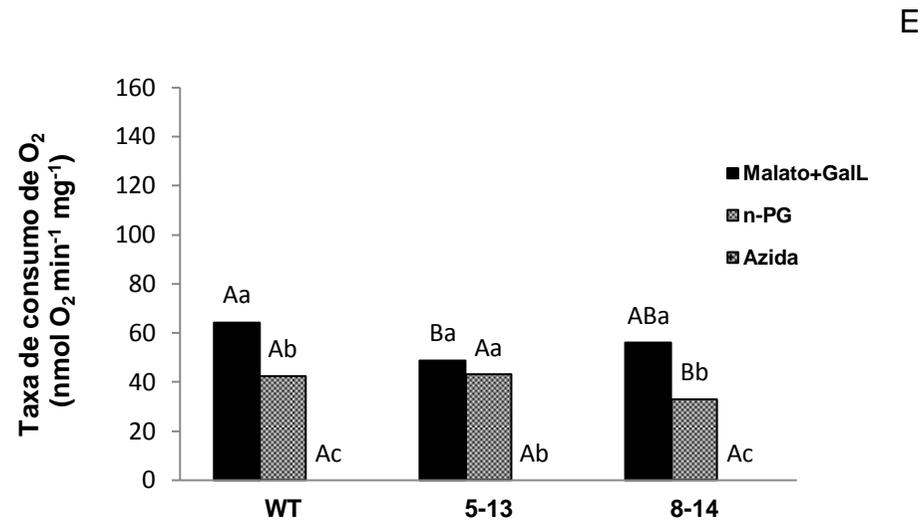


As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 11.** Taxa de consumo de  $O_2$  ( $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos dos genótipos de tomate (WT, 5-13 e 8-14) com o padrão de amadurecimento caracterizado como verde. As mitocôndrias foram pré-incubadas em GalL 5 mM antes de serem adicionados os substratos NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).

Novamente foi testado o efeito da adição de GalL ao meio de reação durante a avaliação do consumo de  $O_2$  em mitocôndrias isoladas (Figuras 12A-E). Os resultados mostram uma mudança significativa em relação ao pré-tratamento com GalL (Figuras 11A-E), principalmente na respiração do WT. Nesse caso, verifica-se efeito inibitório dos bloqueadores das vias COX e AOX, no tomate WT, o que não foi verificado quando as mitocôndrias foram pré-tratadas com GalL. Para as duas linhas transgênicas, entretanto, não foi verificado qualquer efeito na taxa respiratória em função da aplicação dos inibidores da COX e AOX entre mitocôndrias pré-tratadas com GalL e aquelas onde o GalL foi adicionado ao meio de reação durante as medidas do consumo de  $O_2$  (Figuras 12A-E).

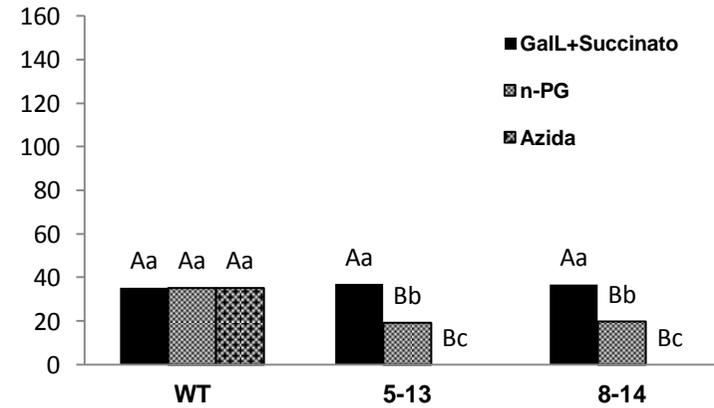
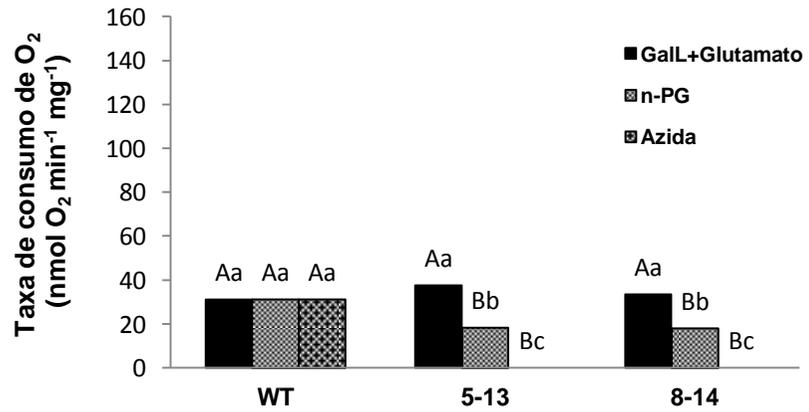
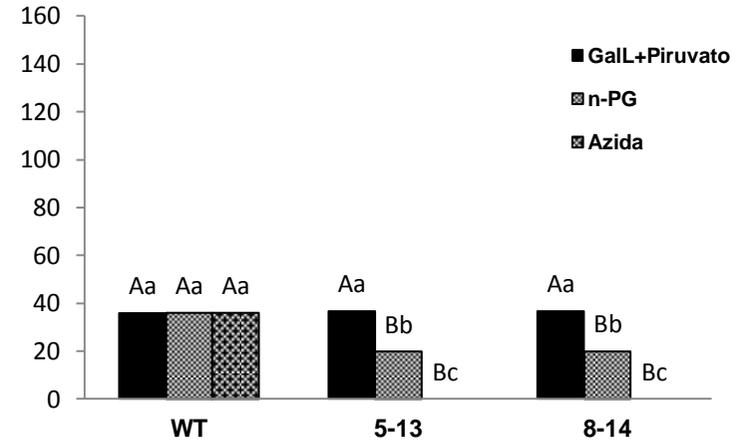
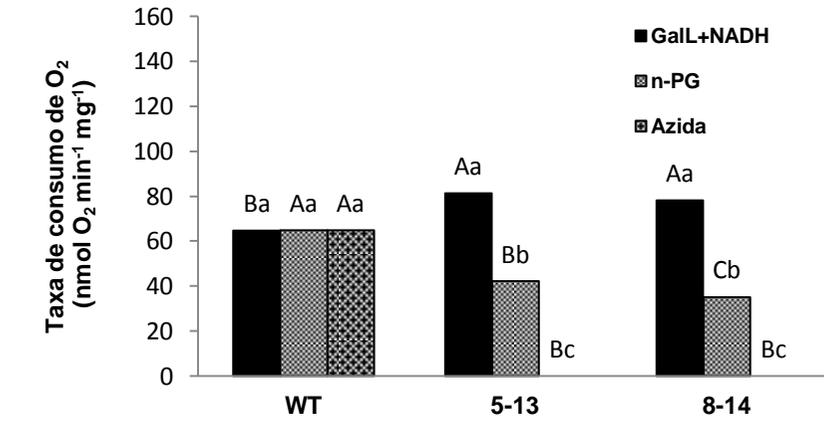


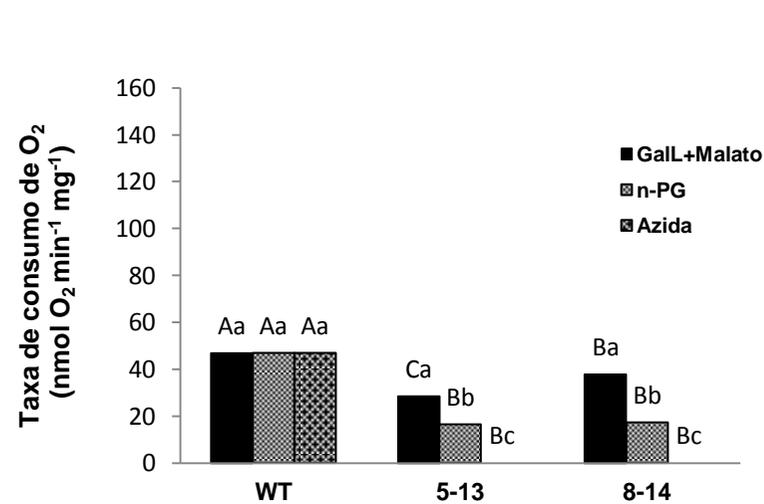


As médias seguidas pela mesma letra maiúsculas não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 12.** Taxa de consumo de  $O_2$  ( $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos dos genótipos de tomate (WT, 5-13 e 8-14) com o padrão de amadurecimento caracterizado como verde. As taxas de consumo de  $O_2$  foram registradas apenas na presença de GalL 5 Mm com os seguintes substratos respiratórios NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).

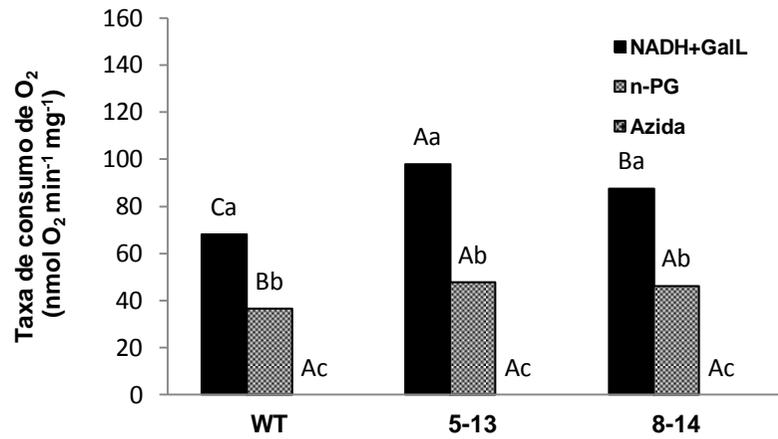
O mesmo ensaio também foi realizado em frutos de tomate maduros e os resultados verificados mostram uma tendência muito semelhante aquela registrada em frutos verdes (Figuras 13A-E e 14A-E). Exceto, porém, que de modo geral nos frutos maduros as taxas respiratórias foram mais baixas que nos frutos verdes, o que sugere que o estágio de maturação influenciou mais na intensidade do consumo de  $O_2$ , que na participação relativa entre as vias COX e AOX. Novamente observa-se que o pré-tratamento das mitocôndrias com GalL resultou na insensibilidade das vias COX e AOX aos seus inibidores específicos, azida e n-PG, respectivamente, como havia sido verificado em frutos de tomate verdes, assim como no mamão, enquanto nas linhas transgênicas apresentou sensibilidade. Também pode-se inferir que a atividade GalLDH tem efeito no transporte de elétrons tanto em frutos verdes (Figuras 11A-E e 12A-E) como em frutos maduros (Figuras 13A-E e 14A-E),



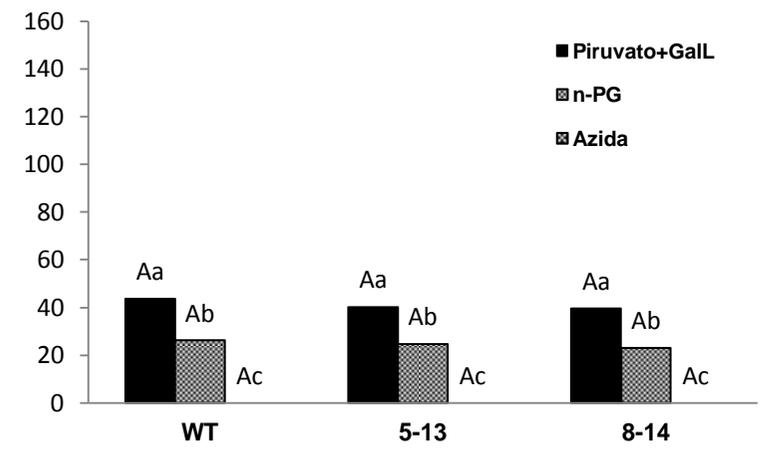


As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

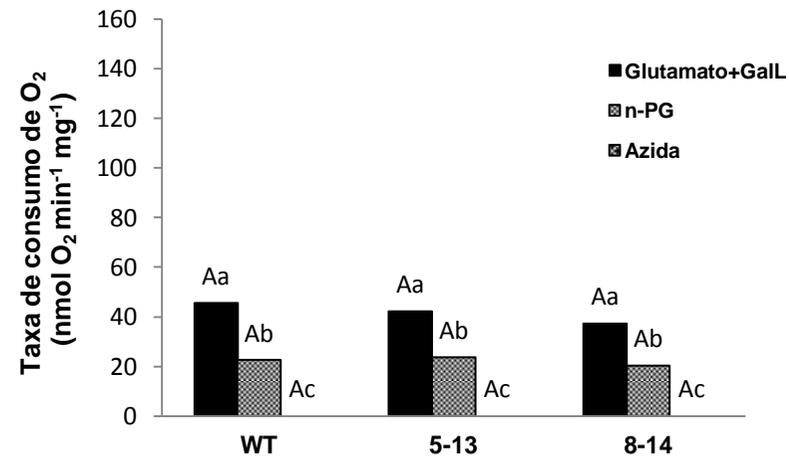
**Figura 13.** Taxa de consumo de  $O_2$  ( $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos dos genótipos de tomate (WT, 5-13 e 8-14) com o padrão de amadurecimento caracterizado como maduro. As mitocôndrias foram pré-incubadas em Gall 5 mM antes de serem adicionados os substratos NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).



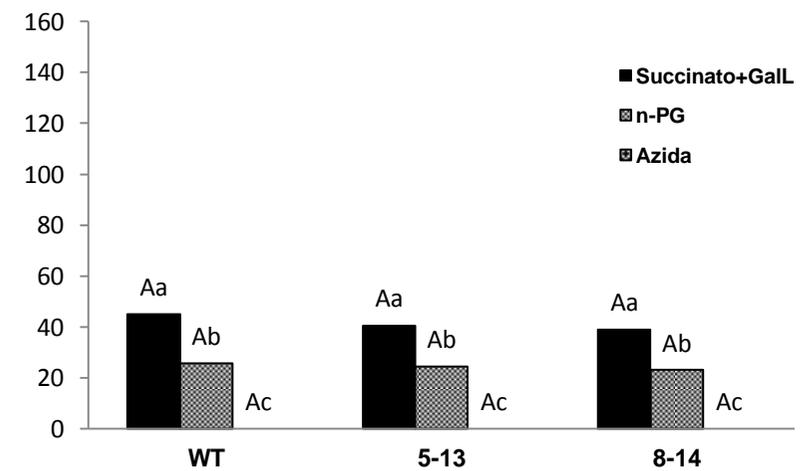
A



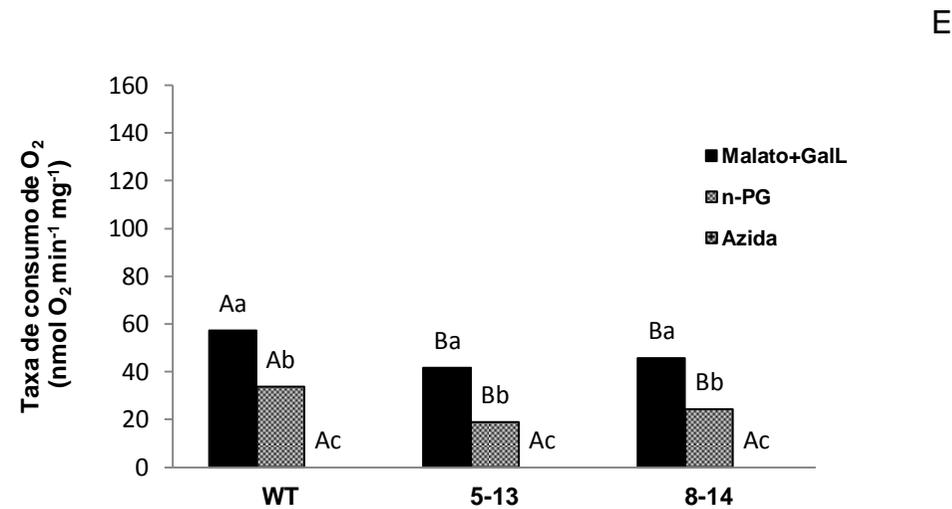
B



C



D



As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre as taxas respiratórias para o mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 14.** Taxa de consumo de O<sub>2</sub> (nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) em função do substrato respiratório utilizado e após as adições de n-PG (inibidor da AOX) e azida (inibidor da COX) em mitocôndrias isoladas de polpa de frutos dos genótipos de tomate (WT, 5-13 e 8-14) com o padrão de amadurecimento caracterizado como maduro. As taxas de consumo de O<sub>2</sub> foram registradas apenas na presença de GalL 5 Mm com os seguintes substratos respiratórios NADH 8mM (6A), piruvato 20 mM (6B), glutamato 20 mM (6C), succinato 15 mM (6D) e malato 10 mM (6E).

## DISCUSSÃO

A enzima GalLDH influencia na capacidade do transporte de elétrons das vias respiratórias em mitocôndrias de frutos. Neste trabalho, foram feitos ensaios para a avaliação da atividade respiratória em mitocôndrias isoladas dos frutos. Mais precisamente, no que se refere à atividade da GalLDH na síntese de AA e seus efeitos na regulação da atividade respiratória, envolvendo as vias COX e AOX. Para realização deste ensaio os frutos foram padronizados de acordo com os estádios de maturação.

De acordo com o amadurecimento dos frutos de mamão houve uma queda na taxa respiratória total. Resultado que também foi observado por Nogueira et al. (2011) que verificaram que a maior taxa respiratória nos frutos verdes deve-se, possivelmente, ao fato de estes terem atingido a maturidade fisiológica e ainda estarem em fase final de crescimento. Como se sabe, a fase de crescimento se caracteriza por intensa divisão celular e atividade respiratória (Bregoli et al., 2002).

Com o acompanhamento da taxa respiratória durante o amadurecimento do mamão foi possível observar uma diminuição na taxa respiratória total e na participação da COX com conseqüente aumento na participação da AOX. Silva et al. (2015) trabalhando com híbridos de mamão verificaram resultados semelhantes, mostrando que o híbrido Tainung01 apresentou uma taxa respiratória decrescente ao longo do amadurecimento do fruto, passando de 340,8 para 170,5 nmol O<sub>2</sub> mg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, o que representa a redução de cerca de 50% na taxa total, ligeiramente mais alta que a redução de 39,8% verificada aqui nesse ensaio.

Oliveira et al. (2015) avaliando o mamão 'Golden' nos mesmos estádios de maturação registraram diminuição ( $P \leq 0,05$ ) na taxa respiratória total. Os mesmos autores avaliando a capacidade da AOX em mitocôndrias isoladas verificaram um aumento significativo entre os frutos verdes, intermediários e maduros. Segundo Oliveira et al. (2015) a capacidade da AOX aumentou cerca de 50% entre os frutos verdes e frutos maduros, duplicando entre os frutos verdes e frutos intermediários, o que confirma a maior contribuição da AOX durante o amadurecimento dos frutos.

O mamão é considerado bastante perecível e com uma vida útil relativamente curta devido ao seu padrão respiratório, ao alto conteúdo de água e à intensa atividade de enzimas que degradam a parede celular (Jacomino et al., 2002). No caso do mamão, a utilização de ácidos orgânicos como substrato respiratório é justificada pelo fato de os teores de açúcares, que também são substratos para a respiração, reduzirem muito pouco ao longo do amadurecimento do fruto (Lazan et al., 1995; Fabi et al., 2007; Jacomino et al., 2010). A expressiva participação da AOX na respiração do mamão pode ser devido ao desacoplamento mitocondrial, o que resulta em menor resistência ao fluxo de elétrons na CTE (Millar et al., 2011; Perotti et al., 2014), verificado a partir da diminuição do controle respiratório registrado (4,5 a 2,5) nas medidas da respiração em mitocôndrias isoladas (Duque e Arrabaça, 1999; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008; Oliveira et al., 2015).

A AOX está associada ao aumento na respiração dos frutos climatéricos durante o amadurecimento, juntamente com a proteína desacopladora (Duque e Arrabaça, 1999; Vercesi et al., 2006; Oliveira et al., 2015). Dessa forma, a possibilidade de minimizar a atividade da AOX pode ser uma maneira de influenciar no controle das transformações bioquímicas relacionadas ao amadurecimento, possivelmente prolongando a vida útil do fruto de mamão.

A participação da AOX na respiração dos frutos climatéricos e sua correlação com os vários processos metabólicos associados ao amadurecimento de frutos precisam ser melhor compreendidos, podendo ser uma ferramenta útil no desenvolvimento de métodos e procedimentos para prolongar a vida útil, principalmente de frutos climatéricos.

A atividade da COX na respiração dos frutos de mamão diferiu significativamente entre os estádios avaliados. Silva et al. (2015) verificaram que a participação da COX na respiração durante o amadurecimento do mamão foi decrescente, oscilando de 57,8% a 16,2% para o híbrido UENF/Caliman01 e 65,0% a 22,7% para o Tainung01.

A participação da COX na respiração durante o amadurecimento de frutos climatéricos é decrescente com o tempo. Holtzapffel et al. (2002), ao investigarem a atividade de vários componentes da cadeia respiratória mitocondrial em tomates tratados com frio, puderam observar um aumento na expressão da AOX durante o amadurecimento. Ainda de acordo com esses autores, houve uma diminuição na

expressão de algumas subunidades constituintes de determinados complexos da CTE, principalmente pertencentes a ATP sintase e COX (Kumar e Sinha, 1992).

Considini et al. (2001), avaliando a expressão da AOX durante o período de amadurecimento em mangas, também perceberam elevação na expressão da AOX. Estes autores ainda sugerem que esta proteína atua facilitando a senescência enquanto a atividade da COX encontra-se em declínio devido à diminuição da demanda por ATP nesta fase.

O morango apesar de ser um fruto não climatério apresenta atividade respiratória muito alta (Iannetta et al., 2006), neste trabalho em que avaliou mitocôndrias isoladas de morango, observou-se taxa respiratória relativamente alta principalmente por estes frutos estarem maduros (Figura 5). De acordo com a literatura os frutos de padrão não climatério apresentam atividade da AOX praticamente nula, o que também se observa neste ensaio, o que difere de frutos de padrão climatério no qual observa aumento da atividade da AOX ao longo do amadurecimento (Holtzapffel et al., 2002).

As mitocôndrias de morango apresentaram controle respiratório baixo, em torno de 1,8 uma vez que os frutos encontravam-se maduros, o que pode ser considerado boas preparações com mitocôndrias ativas (Duque e Arrabaça, 1999; Pinheiro et al., 2004; Mariano et al., 2008; Oliveira et al., 2015).

De acordo com Wills et al. (1998), durante a fase de maturação de frutos não climatéricos sua taxa respiratória diminui e se estabiliza não apresentando pico ou elevação até a senescência, desta forma frutos com este padrão amadurecem de forma mais lenta. Sendo assim, o amadurecimento só acontece quando o fruto ainda está ligado à planta mãe, diferente dos frutos climatéricos que completam o amadurecimento mesmo após a colheita. A fase de amadurecimento dos frutos climatéricos é marcada pelo aumento nas taxas respiratórias e na produção de etileno (Souza et al., 2014).

Xu et al. (2012), demonstraram que tanto a superexpressão quanto a subexpressão dos genes da família AOX provocam mudanças perceptíveis na maturação. O silenciamento da AOX em tomateiro prolongou a vida pós-colheita elevando o tempo de maturação e reduzindo a mudança de cor do epicarpo. O aumento na participação da AOX no consumo total de O<sub>2</sub> está ligado com o amadurecimento.

Em frutos não climatéricos, após a aplicação exógena de etileno, não se pode observar aumento na produção de etileno e na taxa respiratória e a atividade da AOX está presente de forma bastante limitada (Lurie e Klein, 1990; Kays, 1994).

Em morango a participação da COX em relação à respiração total não segue um padrão de frutos climatéricos, onde geralmente a atividade deste complexo sofre redução com o amadurecimento dos frutos (Considini et al., 2001; Holtzapffel et al., 2002). Aqui se verifica que a participação da COX na taxa respiratória total do morango foi elevada nos frutos maduros (Figura 5).

A AOX apesar de não apresentar participação no processo respiratório nas mitocôndrias isoladas de morango, participa de todos os outros processos relacionados à atividade da enzima GalLDH, síntese e acumulação de AA. A atuação dessa enzima na CTE mitocondrial de frutos não climatéricos ainda precisa ser melhor detalhada.

Pinheiro et al. (2004) não identificaram participação desta via em tubérculos de batata armazenados em temperatura ambiente, somente foi verificada a contribuição da AOX quando o tecido foi submetido ao estresse pelo frio ou por envelhecimento artificial. Assim, não é possível dizer que os níveis reduzidos da participação da AOX em morango quando comparados aos da COX podem sofrer alterações caso as características de armazenamento mudem, como por exemplo em condições de baixa temperatura, onde apesar de não se conhecer o mecanismo, a atividade AOX é estimulada (Calegario et al., 2003). Ainda, para a confirmação da atividade característica ou induzida da AOX em morango precisaria da complementação desses resultados com análises em outros frutos de padrão não climatérico.

Sabe-se que a etapa final da síntese de AA tem como sítio a mitocôndria, mais precisamente a membrana interna, onde a oxidação de GalL e a consequente formação de AA tem suporte na CTE. O citocromo C é o receptor dos elétrons provenientes desta reação, responsável por também reduzir a COX que por fim utiliza estes elétrons para reduzir o  $O_2$  a  $H_2O$ . Isso torna o AA um importante substrato respiratório e também significativamente influente no consumo de oxigênio, possibilitando aumentos na taxa respiratória mitocondrial em tecidos com alto conteúdo total de AA (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003).

Os resultados aqui apresentados em frutos de mamão mostram a respiração sendo influenciada pela síntese de AA. Nessas condições, observa-se menores taxas de consumo de O<sub>2</sub>, provavelmente, devido à menor disponibilidade dos elétrons vindos apenas da oxidação do GalL na conversão à AA. Porém, o resultado mais marcante, certamente, foi a insensibilidade das vias AOX e COX aos seus respectivos bloqueadores, quando as mitocôndrias são pré-tratadas com GalL (Figura 6), o que não se repete quando o GalL é fornecido durante o estímulo à respiração e não em pré-condicionamento (Figura 7). Os resultados verificados mostram que tal efeito se deve não à presença do GalL, mas muito provavelmente à atividade da GalLDH. Admitindo que os bloqueadores da COX e da AOX estão inibindo estas vias, então o que poderia estar consumindo O<sub>2</sub> quando as mitocôndrias foram pré-condicionadas ao GalL, seria a GalLDH? Outra possibilidade, ainda considerando a hipótese da resposta ser devido à atividade GalLDH, seria a ativação da GalLDH gerar algum impedimento ao bloqueio de ambas as oxidases terminais. Em ambas as possibilidades, a influência da GalLDH no transporte de elétrons em mitocôndrias isoladas de frutos se mostra além da sua função até então conhecida, ou seja, de sintetizar o AA a partir do GalL, usando os elétrons doados pelo citocromo C (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003; Bartoli et al., 2005).

Um trabalho com plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* com linhas antisense da AOX, assim como usando linhas com aumento da expressão da AOX realizado em condições de intensidades de luz variadas, Bartoli et al. (2006) mostraram que o acúmulo e a síntese de AA, em folhas inteiras e em mitocôndrias isoladas, foram mais elevados em plantas onde a capacidade da AOX era maior, independente da intensidade luminosa.

Também é possível fazer associações entre a COX com a síntese de AA. A GalLDH catalisa a oxidação do GalL tendo como aceitador dos elétrons liberados nessa reação o citocromo C, assim o GalL é convertido em AA e por meio desta reação a COX recebe elétrons sendo reduzida. Assim, indiretamente, a COX contribui para o mecanismo antioxidante não enzimático do AA, ajudando a diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2003; Szarka et al., 2007; Blokhina e Fagerstedt, 2010).

Ainda não está totalmente esclarecido se a atividade da enzima GalLDH na produção do AA é necessária para o funcionamento do complexo I (Szarka et al.,

2013). Apesar desta questão, o mais interessante é que o fluxo de elétrons através do complexo I tem um papel regulador sobre a capacidade de biossíntese do AA (Millar et al., 2003). Assim como o AA pode, também, ter um papel no equilíbrio do fluxo de elétrons na CTE mitocondrial sob diferentes condições ambientais (Szarka et al., 2013).

Mais estudos ainda serão necessários para determinar o efeito da GalLDH na atividade da CTE e sobre as vias respiratórias, principalmente a AOX e COX, assim como avaliar se estes resultados se aplicam a outros genótipos de mamão, bem como a outros frutos climatérios durante o período de amadurecimento.

Assim como verificado no mamão, a ativação da GalLDH a partir do pré-condicionamento de mitocôndrias de morango em GalL, apresentou os mesmos resultados independente do substrato respiratório presente (Figuras 6 e 9).

Porém, as mitocôndrias dos frutos de morango apresentaram resultados diferentes e marcantes em relação ao observado nas mitocôndrias de mamão. Enquanto as mitocôndrias de mamão apresentam sensibilidade aos bloqueadores das vias COX e AOX quando o GalL é fornecido durante o estímulo à respiração, em mitocôndrias de morango observa-se uma completa insensibilidade da AOX ao seu inibidor. Também, diferentemente do que foi observado no mamão, após a adição dos bloqueadores da AOX e da COX, ainda foi verificada atividade respiratória nas mitocôndrias isoladas da polpa do morango maduro (Figuras 7 e 10). Este padrão observado pode significar que a taxa respiratória apresentada em mitocôndrias de morango seja consequência de uma menor participação da AOX, assim como da presença de alguma via, além da COX e AOX, responsável por uma respiração residual. Em frutos como o morango, com apenas uma via de respiração predominante no caso a COX, qual outra via seria capaz de consumir  $O_2$  na presença do bloqueador da COX?

Uma possível hipótese é que a GalLDH apresente atividade oxidase. Foi previamente demonstrada que esta enzima possui baixa atividade oxidase, entretanto esse trabalho foi realizado com a enzima purificada (Leferink et al., 2008). É possível aqui nesse trabalho onde a enzima GalLDH se encontra na mitocôndria junto aos outros componentes da CTE mitocondrial, a GalLDH pode apresentar maior atividade oxidase. Os resultados até aqui obtidos são bastante consistentes no sentido de que há o envolvimento da GalLDH no consumo de  $O_2$

na CTE, mesmo com o bloqueio das duas oxidases terminais da CTE, a AOX e a COX, em mitocôndrias de mamão e morango. Tal afirmação também leva em consideração o fato de este efeito inibitório não acontece em tomates transgênicos onde a enzima GalLDH não se expressa.

Especificamente, a GalLDH está ligada ao complexo I e sua funcionalidade está junto deste complexo mitocondrial em *Arabidopsis*, sendo a mesma regulada pela atividade da CTE (Heazlewood et al., 2003; Millar et al., 2003). A partir desta constatação, espera-se que a atividade da GalLDH influencie sobre o resto da via respiratória, uma propriedade improvável à luz do conhecimento atual tendo em vista a participação da enzima na etapa final da via metabólica de biossíntese do AA (Bartoli et al., 2005).

Diante do ineditismo dos resultados obtidos e da falta de dados na literatura a respeito dos mesmos, é natural o surgimento de algumas dúvidas. Por exemplo, a insensibilidade das vias AOX e COX aos seus respectivos bloqueadores quando as mitocôndrias são pré-tratadas com GalL, é devido à ativação da GalLDH ou uma consequência do produto da oxidação do GalL, ou seja, o AA? Os resultados mostram que esse efeito se deve à atividade da GalLDH e não à presença do GalL. Assim como, os resultados demonstraram, também, que a presença de AA no meio não teve o mesmo efeito sobre a sensibilidade das vias AOX e COX aos seus bloqueadores (Figura 8).

Foram testados o efeito da ativação da GalLDH em frutos transgênicos de tomates com a GalLDH silenciada com o propósito de observar os efeitos dessa enzima na respiração.

A taxa respiratória mediada pelo transporte de elétrons na presença de GalL apresentou uma diminuição quando comparados com a taxa respiratória iniciada por qualquer outro substrato da respiração, sendo o mesmo observado tanto em frutos verdes, quanto maduros. Alhag Dow et al. (2007), trabalhando com as mesmas linhas transgênicas obteve resultados semelhantes, utilizando o GalL para introduzir o fluxo de elétrons ao citocromo C, a taxa de respiração em ambas as linhas transgênicas também foi reduzida cerca de 50% em mitocôndrias isoladas comparadas ao controle (WT).

Pineau et al. (2008) verificaram quantidades reduzidas do complexo I ao caracterizarem um mutante de *Arabidopsis thaliana* que teve o gene que codifica a GalLDH silenciada. Em contraste, as quantidades dos outros complexos

proteicos da CTE mitocondrial não foram alteradas. Por isso, especula-se que a GalLDH, além de seu papel na formação do AA, representa um fator importante para a estrutura do complexo I (Schertl et al., 2012).

Os resultados obtidos neste trabalho são interessantes, confirmando uma forte ligação funcional entre a respiração e a síntese de AA. Esta associação funcional pode explicar, por exemplo, porque a atividade da GalLDH é dependente da intensidade da luz em plantas na fase de crescimento (Smirnov, 2000; Bartoli et al, 2006).

O AOX regula o estado de alta energia na membrana mitocondrial o que deve influenciar na síntese de AA pela localização da GalLDH, uma vez que disponibiliza mais citocromo C oxidado, aumentando a acumulação do AA. Porém, neste trabalho observa-se que além de influenciar o estado de alta energia na membrana, a AOX participa juntamente com a GalLDH nos processos de síntese do AA e respiração (consumo de O<sub>2</sub>).

O papel da AOX no metabolismo vegetal ainda não está bem estabelecido, até o momento a única função comprovada é sua ação termogênica em tecidos florais de algumas espécies de aráceas, onde essa enzima é responsável pela geração de calor usado para volatilizar compostos aromáticos capazes de atrair insetos polinizadores durante o desenvolvimento floral (Raskin et al., 1989). Também é atribuída à AOX a capacidade de minimizar a geração de ERO, sob condições de estresse, por consumir mais rapidamente os elétrons da CTE, evitando-se assim que estes possam ser utilizados para a redução parcial do O<sub>2</sub>, que formaria superóxido ou radical hidroxila (Moller, 2001). Para Siedow e Umbach (2000), a AOX tem a função de ajustar o fluxo de elétrons da CTE quando o metabolismo respiratório é perturbado, sendo gerado um sobrefluxo de elétrons, nem sempre associado ao aumento na produção de energia (ATP) nas mitocôndrias. Segundo estes autores, o sobrefluxo de elétrons é necessário para manter a ciclagem de esqueletos carbônicos através da glicólise e do ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos, quando a via COX está reprimida por algum fator de estresse, evitando-se dessa forma a autooxidação da ubiquinona reduzida e a subsequente formação de ERO. Ainda, de acordo com Oliveira et al. (2015) o aumento na atividade AOX no mamão maduro seria uma consequência do processo de amadurecimento, o que levaria ao aumento no desacoplamento das mitocôndrias, uma consequência da ação do etileno (Mazorra et al., 2013).

A participação da AOX na respiração, assim como a síntese de AA e sua correlação com os vários processos metabólicos associados ao amadurecimento e também o controle na produção de ERO, precisam ser melhor compreendidos. O entendimento e o controle desses processos podem ser úteis no desenvolvimento de métodos e procedimentos para prolongar a vida de prateleira e acumulação de AA nos frutos.

Este trabalho estabelece uma base para os futuros trabalhos sobre a regulação da GalLDH em frutos climatérios e não climatérios e a importância da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial nessa regulação, juntamente com a síntese e a acumulação de AA nos frutos.

## CONCLUSÃO

A enzima GalLDH influencia na capacidade do transporte de elétrons das vias respiratórias nas mitocôndrias de frutos.

A oxidação do Gal é sustentada por uma via alternativa redutora de O<sub>2</sub> resistente aos inibidores da AOX e COX.

As mitocôndrias isoladas de frutos de morango não apresentam a atividade da AOX.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhag Dow, M., Mounet, F., Gilbert, L., Nunes-Nesi, A., Garcia, V., Just, D., e 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*, v.145, 1408-1422.
- Bartoli, C. G., Guamet, J. J., Kiddle, G. U. Y., Pastori, G. M., Di Cagno, R., Theodoulou, F. L., e Foyer, C. H. (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell & Environment*, v.28, p.1073-1081.

- 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*, v.123, p.335–344.
- Bartoli, C. G., Yu, J., Gómez, 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*, v.57, p.1621-1631.
- Beavis, A. D., e Vercesi, A. E. (1992). Anion uniport in plant mitochondria is mediated by a Mg (2+)-insensitive inner membrane anion channel. *Journal of Biological Chemistry*, v.267, p.3079-3087.
- Blokhina, O., e Fagerstedt, K. V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia plantarum*, 138(4): 447-462
- Bodenstein-Lang, J., Buch, A., e Follmann, H. (1989). Animal and plant mitochondria contain specific thioredoxins. *FEBS Letters*, v.258, p. 22-26.
- 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*, v.72, p.248-254.
- Bregoli, A. M., Scaramagli, S., Costa, G., Sabatini, E., Ziosi, V., Biondi, S., e Torrigiani, P. (2002). Peach (*Prunus persica*) fruit ripening: aminoethoxyvinylglycine (AVG) and exogenous polyamines affect ethylene emission and flesh firmness. *Physiologia Plantarum*, v.114, p.472 481.
- Calegario, F. F., Cosso, R. G., Fagian, M. M., Almeida, F. V., Jardim, W. F., Jezek, P., Arruda, P., Vercesi, A. E. (2003). Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.35, p.211-220.
- Considine, M.J., Daley, D.O., Whelan, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology*, v.126, p.1619-1629.
- Duque, P., e Arrabaça, J. D. (1999). Respiratory metabolism during cold storage of apple fruit. II. Alternative oxidase is induced at the climacteric. *Physiologia Plantarum*, v.107, 24-31.
- Elhafez, D., Murcha, M. W., Clifton, R., Soole, K. L., Day, D. A., e Whelan, J. (2006). Characterization of mitochondrial alternative NAD (P) H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression. *Plant and cell physiology*, v.47, p.43-54.
- Fabi, J. P., Cordenunsi, B. R., de Mattos Barreto, G. P., Mercadante, A. Z., Lajolo, F. M., & Oliveira do Nascimento, J. R. (2007). Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1 methylcyclopropene (1-MCP). *Journal of agricultural and food chemistry*, v.55, p.6118-6123.

- Finnegan, P. M., Soole, K. L., e Umbach, A. L. (2004). Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants, p. 163-230. *Springer Netherlands*.
- Gupta, K. J., Zabalza, A., Van Dongen, J. T. (2009) Regulation of respiration when the oxygen availability changes. *Physiologia Plantarum*, v.137, p.383-391.
- Heazlewood J. A., Howell K. A. e Millar A. H. (2003). Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and yeast components coupled to plant-specific subunits. *BBA Bioenergetics*, v.1604, p.159–169.
- Holtzapffel, R. C., Finnegan, P. M., Millar, A. H., Badger, M. R., e Day, D. A. (2002). Mitochondrial protein expression in tomato fruit during on-vine ripening and cold storage. *Functional Plant Biology*, v.29, p.827-834.
- Iannetta, P. P., Laarhoven, L. J., Medina-Escobar, N., James, E. K., McManus, M. T., Davies, H. V., e Harren, F. J. (2006). Ethylene and carbon dioxide production by developing strawberries show a correlative pattern that is indicative of ripening climacteric fruit. *Physiologia Plantarum*, v.127, 247-259.
- Jacomino, A. P., Gallon, C. Z., Dias, I. S., e Pinto Pereira, W. S. (2010). Characterization and occurrence of early softening disorder in 'golden' papaya fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.32, p.1261-1266.
- Jacomino, A. P., Kluge, R. A., Brackmann, A., e Castro, P. D. C. (2002). Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. *Scientia Agricola*, v.59, p.303-308.
- Kumar, A. M., e Söll, D. (1992). Arabidopsis alternative oxidase sustains Escherichia coli respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.89, p. 10842-10846.
- Lambers, H. (1985). Respiration in intact plants and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. In *Higher Plant Cell Respiration*, p.418-473.
- Lazan, H., Ng, S. Y., Goh, L. Y., e Ali, Z. M. (2004). Papaya  $\beta$ -galactosidase/galactanase isoforms in differential cell wall hydrolysis and fruit softening during ripening. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.42, p.847-853.
- Leferink, N. G., van den Berg, W. A., e van Berkel, W. J. (2008). L-Galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS journal*, v.275, p.713-726.
- Mariano, A. B., Kovalhuk, L., Valente, C., Maurer-Menestrina, J., Pereira-Netto, A. B., Guerra, M. P., e Carnieri, E. G. S. (2004). Improved method for isolation of coupled mitochondria of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.47, p.873-879.

- 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*, v. 175, p.701-705.
- Martins, I. S., Carnieri, E. G. S., e Vercesi, A. E. (1993). Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> and anion transport across the inner membrane of plant mitochondria. *Current Topics in Plant Physiology*, v.1, p.211-217.
- Mazorra, L. M., Oliveira, M. G., Souza, A. F., Silva, W. B. D., Santos, G. M. D., Silva, L. R. A. D., Oliveira, J. G. D. (2013). Involvement of brassinosteroids and ethylene in the control of mitochondrial electron transport chain in postharvest papaya fruit. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, v.25, p.203-212.
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, v.27, p.1254-1255.
- Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J. L., Bartoli, C. G., Theodoulou, F. L., e Foyer, C. H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, v.133, p.443-447.
- Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L., e Day, D. A. (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review of Plant Biology*, v.62, p.79-104.
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant biology*, v.52, p. 561-591.
- Nogueira, B. L., Corrêa, P. C., Campo, S. D. C., Oliveira, G. H. H. D., e Baptestini, F. M. (2011). Influência do teor de água e do estágio de maturação na taxa respiratória do café, *ciência e Agrotecnologia*, v.44, 215-230.
- Oliveira, M. G., Mazorra, L. M., Souza, A. F., Silva, G. M. C., Correa, S. F., Santos, W. C., Oliveira, J. G. (2015). Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, v.189, p.42-50.
- Perotti, V. E., Moreno, A. S., e Podestá, F. E. (2014). Physiological aspects of fruit ripening: the mitochondrial connection. *Mitochondrion*, v.17, p.1-6.
- Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., and De Paepe, R. (2008). L-Galactono- 1,4 lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*. v.283, p.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*, v.16, p.69-76.

- Raskin, I., Turner, I. M., e Melander, W. R. (1989). Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.86, p.2214-2218.
- Rodríguez-Roldán, V., García-Heredia, J. M., Navarro, J. A., Hervás, M., De la Cerda, B., Molina-Heredia, F. P., e Miguel, A. (2006). A comparative kinetic analysis of the reactivity of plant, horse, and human respiratory cytochrome c towards cytochrome c oxidase. *Biochemical and biophysical research communications*, v.346, p.1108-1113.
- Schertl, P., Sunderhaus, S., Klodmann, J., Grozeff, G. E. G., Bartoli, C. G., e 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*, v.287, p.14412-14419.
- Siedow, J. N., e Umbach, A. L. (2000). The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics*, v.1459, p. 432-439.
- Silva, L. R. A. D., Silva, G. M. C., Silva, W. B., Souza, C. L. M. D., Oliveira, J. G. D. (2015). Respiratory activity in isolated mitochondria from the pulp of Uenf/Caliman01 and Tainung01 papaya in postharvest fruit conservation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.37, p.296-307.
- Smirnoff, N. (1996). Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, v.78, p.661-669.
- Smirnoff, N., e Wheeler, G., L. (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *CRC Critical Reviews in Plant Science*, v.19, 267–290.
- Sweetlove, L. J., Taylor, N. L., e Leaver, C. J. (2007). Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Mitochondria*, v.125, p.136.
- Szarka, A., Bánhegyi, G., e Asard, H. (2013). The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants & redox signaling*, v.19, 1036-1044.
- Szarka, A., Horemans, N., Kovács, Z., Gróf, P., Mayer, M., e Bánhegyi, G. (2007). Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiologia Plantarum*, v.129, p.225-232.
- Szarka, A., Horemans, N., Kovács, Z., Gróf, P., Mayer, M., e Bánhegyi, G. (2007). Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiologia plantarum*, v.129, p.225-232
- Van Dongen, J. T., Gupta, K. J., Ramírez-Aguilar, S. J., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. (2011) Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology*, v.168, p.1434-1443.

- Vercesi, A. E., Borecký, J., Maia, I. D. G., Arruda, P., Cuccovia, I. M., & Chaimovich, H. (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annual Review of Plant Biology*, v.57, p.383-404.
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D., (1998). Introducción a la fisiología e la manipulación poscosecha de frutas, hostalizas y plantas ornamentales, p.240.
- Xu, F., Yuan, S., Zhang, D. W., Lv, X., e Lin, H. H. (2012). The role of alternative oxidase in tomato fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene. *Journal of experimental botany*, v.63, p. 5705-5716

#### 4.2. Influência do transporte de elétrons na capacidade de síntese e acumulação de AA em mitocôndrias de frutos

##### RESUMO

A L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) catalisa o último passo na via principal de síntese de AA em plantas. Há evidências da influência da GalLDH sobre o transporte de elétrons em mitocôndrias isoladas. O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos dos substratos e bloqueadores respiratórios na capacidade de síntese e acumulação de AA em mitocôndrias de frutas com diferentes níveis de participação da AOX na respiração total. Os níveis da AOX foram avaliados de acordo com os estádios de amadurecimento em frutos de mamão 'Golden', morango 'Oso Grande' e tomate cereja (*Solanum lycopersicum* West Virginia 106') selvagem e com linhas transgênicas com a GalLDH silenciada. Verificou-se também a atividade da GalLDH e a acumulação de AA em mitocôndrias isoladas dos frutos. A acumulação de AA em mamão, morango e tomate foram avaliadas em HPLC na presença de diferentes substratos da respiração e tempos de incubação correspondentes. A atividade da enzima GalLDH foi superior em frutos verdes de mamão quando comparado aos outros estádios de amadurecimento. A adição dos bloqueadores resultou numa diminuição da atividade podendo ser observado nos três estádios avaliados, sendo maior expresso com a adição do bloqueador n-PG. Em mitocôndrias de frutos de morango os resultados foram semelhantes ao mamão, a adição dos bloqueadores diminuiu a atividade da GalLDH, com maior expressão para o

bloqueador n-PG. Nas mitocôndrias de tomates, as linhas transgênicas apresentaram menor atividade da GalLDH, resultados esperados devido ao silenciamento da GalLDH. A adição do bloqueador n-PG diminuiu a atividade da enzima GalLDH nos dois estádios de maturação e nos três genótipos. Mas a adição do bloqueador do complexo I (rotenona), estimulou a atividade da GalLDH no tomate WT. A acumulação de AA na presença dos substratos respiratórios em mitocôndrias de frutos de mamão demonstrou resultados semelhantes nos três estádios de amadurecimento, sendo o substrato respiratório piruvato o que promoveu o maior acúmulo de AA independente do tempo de incubação, resultado semelhante foi observado em mitocôndrias de morango. Quando foram testados os bloqueadores do complexo III e AOX, a antimicina A (bloqueador do complexo III) estimulou o acúmulo de AA, enquanto o SHAM (bloqueador da AOX) inibiu a acumulação de AA, a adição dos dois bloqueadores ao mesmo tempo, também promoveu a inibição do acúmulo de AA. Em mitocôndrias de tomate foi observada à acumulação de AA semelhante entre as linhas transgênicas e o WT. A adição do bloqueador da AOX inibiu o acúmulo de AA nos três genótipos avaliados. As linhas transgênicas com a GalLDH silenciada apresentaram atividade mínima da GalLDH, mas ainda assim foram capazes de sintetizar AA. Por outro lado, quando a via AOX foi bloqueada, houve significativa redução na capacidade de síntese do AA, o que sugere certa influência dessa via na atividade da GalLDH e no acúmulo de AA. Estes resultados confirmam a complexidade do processo de síntese do AA em frutos e sua ligação com a CTE mitocondrial, bem como a ligação da atividade da enzima GalLDH e a AOX. Além disso, sugere fortemente que a função da GalLDH não é somente sintetizar o AA, mas sim, regular a CTE mitocondrial.

## **Influence of electron transport changes in the capacity of synthesis and AA accumulation in fruit mitochondria**

### **ABSTRACT**

L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (LGalLDH) catalyzes the final step in the pathway of AA synthesis in plants. This study aims at evaluating the effects of respiratory substrates and blockers on the capacity of AA synthesis and accumulation in mitochondria from fruits with different AOX levels. Levels of AOX were evaluated according to the ripening stages in papaya fruit 'Golden', strawberry 'Oso Grande' and cherry tomato (*Solanum lycopersicum*) with transgenic lines with GalLDH silenced. The activity of GalLDH and AA accumulation were verified in mitochondria isolated from fruits. AA accumulation in papaya and strawberry was evaluated by HPLC in the presence of respiratory substrates (NADH 8 mM pyruvate, 20 mM glutamate 20 mM succinate 15 mM and malate 10mM) and corresponding incubation times (15 min, 30 min, 1h and 2h). Respiratory substrates increased AA accumulation, with higher accumulation corresponding to pyruvate, the results were observed at all incubation times evaluated. The blockers of complex I, III and AOX, altered the AA accumulation. Blocking AOX inhibited the AA accumulation, where as the antimycin A (blocker of complex III) increased the accumulation or kept it, rotenone (blocker of complex I) showed different results. There was an inhibition of AA accumulation in papaya and strawberry mitochondria, where as AA accumulation was increased in tomato fruit. Transgenic lines with silenced GalLDH showed minimal GalLDH activity and AA

accumulation remained even with minimal activity of the enzyme. The AOX presented influence on the activity of GalLDH and AA accumulation in those transgenic lines. This work confirms the complexity of AA synthesis and its link with mitochondrial CTE in plants as well as the linkage between the GalLDH enzyme and AOX. In addition, it strongly suggests that the function of GalLDH is not only synthesize AA, but, regulate the mitochondrial ETC.

## INTRODUÇÃO

Embora o AA desempenhe muitas funções importantes na biologia vegetal (Arrigoni e De Tullio, 2000; Smirnoff e Wheeler, 2000; Gill e Turgeta, 2010; Foyer e Noctor, 2011), pouco se sabe sobre os fatores que controlam a sua síntese e acumulação do AA em diferentes tecidos. Os tecidos vegetais contêm geralmente grandes quantidades de AA, no entanto, o aumento no acúmulo e na estabilidade do AA em frutos e outros órgãos vegetais continuam como objeto de interesse de muitas pesquisas para a melhoria da qualidade alimentar e nutricional (Davey et al., 2000). Os fatores que controlam a acumulação de AA em plantas estão longe de ser totalmente compreendidos, existem vários pontos obscuros na via de síntese de AA que ainda precisam ser elucidados (Bartoli et al., 2005).

A via de síntese proposta por Wheeler e Smirnoff (1998) representa uma importante via de síntese de AA em plantas. No entanto, outras vias têm sido propostas (Davey et al., 1999) enquanto outras vias biossintéticas ainda precisam ser comprovadas (Davey et al., 1999; Agius et al., 2003; Wolucka e Van Montagu, 2003; Lorence et al., 2004). Em todas as vias já conhecidas ou propostas, independentemente das etapas iniciais e intermediárias na síntese de AA, há unanimidade quanto à etapa final que é catalisada pela L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) (Ôba et al., 1995; Østergaard et al., 1997; Pallanca e Smirnoff, 1999; Siendones et al., 1999; Bartoli et al., 2000), uma enzima localizada na membrana mitocondrial interna. O substrato para a GalLDH é o L-galactono-1,4-lactona (GalL), que é oxidado a AA, doando elétrons para o

citocromo C. Esta reação necessita do citocromo C oxidado, o que já foi demonstrado em batata (*Solanum tuberosum*) (Bartoli et al., 2000) e *Arabidopsis thaliana* (Millar et al., 2003).

Bartoli et al. (2000) demonstraram que a taxa de síntese de AA foi completamente inibida pelo cianeto (CN<sup>-</sup>), que bloqueia a oxidação do citocromo C pela COX. Mas não foi inibida por antimicina A (inibidor do complexo III), que mantém o citocromo C oxidado e conseqüentemente aumenta a atividade da GalLDH. A adição de rotenona, um inibidor específico do complexo I, não teve efeito sobre a síntese de AA nestas mesmas condições (Bartoli et al., 2000).

Em contrapartida, Millar et al. (2003), demonstraram em *A. thaliana* que a adição de rotenona inibiu a taxa de síntese de AA com a mesma intensidade que o CN<sup>-</sup> quando foi utilizado o piruvato e o malato para conduzir o transporte de elétrons na atividade respiratória.

São apresentadas evidências em *A. thaliana*, que a capacidade de síntese e acumulação de AA são influenciadas pela luz e pela respiração. Bartoli et al. (2006), demonstraram que alta irradiância aumentou a capacidade das folhas em sintetizar, acumular e regenerar o AA. Além disso, este mesmo trabalho apresenta evidências que uma maior expressão da AOX aumenta a síntese e acumulação de AA. Assim, a síntese de AA é influenciada por uma atividade que também regula o estado de alta energia da membrana, drenando elétrons e prevenindo a produção de ERO. A estreita interação da síntese de AA e a atividade da AOX fornece evidências para uma interação na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, possivelmente para proteger a célula contra a oxidação descontrolada (Foyer e Noctor, 2005).

O silenciamento da succinate-Q oxidoreductase (complexo II) em tomates transgênicos (*Lycopersicon esculentum* cv. MoneyMaker) resultou no aumento de 5 a 7 vezes nos níveis de AA, sem efeito sobre a atividade da GalLDH (Nunes-Nesi et al., 2005). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Szarka et al. (2013) em tabaco, onde a adição de inibidores do complexo II, também resultou no aumento nos níveis de AA. O que sugere que este complexo também controla os níveis de síntese e acumulação de AA.

Apesar do conhecimento detalhado de várias etapas da biossíntese de AA em plantas, ainda não está totalmente elucidado como a estimulação no transporte de elétrons e a atividade da AOX influenciam na síntese do AA.

Algumas evidências são apresentadas por Bartoli et al. (2006), que observaram que a síntese de AA foi mais elevada em plantas de *A. thaliana* onde a expressão da AOX foi superior.

Há uma pressuposição neste trabalho que durante a síntese de AA poderia ocorrer uma redução excessiva do citocromo C e que por esse motivo, a AOX aumentaria a sua participação no consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial, evitando, assim, a super-redução do citocromo C. Se esta hipótese estiver correta, é possível que em mitocôndrias com alta atividade da AOX como por exemplo em mamão (Oliveira et al., 2015), haveria maior potencial para a síntese de AA.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade da GaLLDH e os efeitos de alguns substratos e inibidores da respiração na capacidade de síntese e acumulação de AA em mitocôndrias de frutas com diferentes níveis de atividade da AOX.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Frutos

#### Mamão

Foram utilizados frutos de mamão 'Golden', procedentes de pomar comercial da empresa Caliman Agrícola S/A, localizado em 19°15'S e 39°51'70"W, na cidade de Linhares – ES. Os frutos foram colhidos e após lavagem e seleção no *packing house* foram transportados para o Setor de Fisiologia Vegetal (SFV) do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ), a cerca de seis horas do local da colheita.

No laboratório os frutos foram sanitizados em solução de hipoclorito de sódio, 100 mL L<sup>-1</sup> por 5 min, seguido de lavagem em água deionizada. Após a sanitização, os frutos foram depositados em bancadas para a secagem com auxílio de papel toalha.

Os frutos verdes (fruto desenvolvido com 100% da casca verde) foram armazenados em câmaras com controle de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $85\% \pm 5\%$ ) e amostrados em três estádios de desenvolvimento, sendo utilizadas cinco repetições. A padronização dos estádios de desenvolvimento, verde, intermediário e maduro, foi baseada principalmente pela coloração da casca dos frutos, conforme apresentado na figura 1 e tabela 1, que apresenta também os dados da caracterização do amadurecimento dos frutos realizada pela análise dos atributos físico-químicos, conforme descrito a seguir.

### **Morango**

Os frutos de morango 'Oso Grande', foram adquiridos no comércio local, completamente maduros (fruto desenvolvido com 100% da casca vermelha), sendo transportados imediatamente para o SFV da UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ) onde foram avaliados no mesmo dia. No laboratório os frutos foram sanitizados conforme descrito anteriormente para o mamão e foram avaliados utilizando 5 repetições (20 frutos por repetição), sendo caracterizados quanto ao estágio de amadurecimento a partir da análise dos atributos físico-químicos, conforme apresentado na figura 2 e tabela 2.

### **Tomate**

Sementes de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106') gentilmente cedidas pelo pesquisador Pierre Baldet do Institut National de La Recherche Agronomique, Université Bordeaux, França foram plantadas em vasos com 50 cm de altura em solo com matéria orgânica (argila 49%, matéria orgânica 28% e areia 23%). Foram utilizadas plantas do tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (linhas 5-13 e 8-14) com a GalLDH silenciada. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, regadas 2 vezes ao dia, diariamente, sendo os vasos adubados de acordo com as necessidades da cultura.

Os frutos dos três genótipos foram colhidos na maturação fisiológica (frutos desenvolvidos com casca 100% verde) e após a lavagem foram transportados para o SFV do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal da

UENF, em Campos dos Goytacazes (RJ). No laboratório, após sanitização como descrito anteriormente para os demais frutos, os mesmos foram armazenados em câmaras com controle de temperatura ( $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa ( $85\% \pm 5\%$ ) e amostrados em dois estádios de desenvolvimento, sendo utilizadas cinco repetições (30 frutos por repetição). A padronização dos estádios de desenvolvimento, verde e maduro, foi baseada principalmente pela coloração da casca dos frutos, conforme apresentado na figura 3, que apresenta também os dados da caracterização do amadurecimento dos frutos realizada pela análise dos atributos físico-químicos (Tabela 3), conforme descrito a seguir.

### **Padronização dos estádios de amadurecimento**

Para padronização dos estádios de amadurecimento dos frutos foram utilizados três atributos físico-químicos, a coloração da casca, firmeza do fruto e o teor de sólidos solúveis.

As medições da coloração da casca dos frutos foram realizadas utilizando um colorímetro portátil (Chroma Meter, modelo CR-300, Minolta, Japão), registrando as variáveis de cor dentro do espaço CIELAB: a luminosidade ( $L^*$ ) e o ângulo de cor *hue* (McGuire, 1992).

A firmeza (F) foi obtida por meio da resistência à penetração dos frutos com o auxílio de um texturômetro digital (Texture analyser, modelo TA. XT Express, UK) com sonda de 2 milímetros de diâmetro. A velocidade de penetração da sonda nos frutos foi de  $1 \text{ mm s}^{-1}$  sendo registrado os valores quando a sonda detectou resistência igual a 0,1 Newton. Foram efetuadas duas medições em cada fruto sempre na região equatorial e em lados opostos sendo os testes conduzidos até a profundidade de 1 cm com o registro da maior força durante a penetração e os resultados expressos em Newtons.

O teor de sólidos solúveis (SS) foi determinado utilizando-se um refratômetro portátil (DRBS-300, França) e os resultados expressos em  $^{\circ}\text{Brix}$ .

No caso do mamão foram definidos três estádios de amadurecimento (verde, intermediário e maduro). Os frutos de morango foram avaliados de acordo com o padrão da colheita, no qual se encontravam completamente maduros. E os frutos de tomate foram definidos em dois estádios de amadurecimento (verde e maduro)

## Isolamento de mitocôndrias

### Mamão

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 300g da polpa dos mesmos frutos utilizados para as análises físico-químicas. O procedimento seguiu o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015). O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) em cerca de 1,0 L de tampão de isolamento [manitol 0,35 M, MOPS 50 mM, EDTA 3 mM, Cys 8 mM, BSA 0,1% (p/v), PVP-25 0,4% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.500 g, por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min, sendo o *pellet* ressuspendido em tampão de lavagem [manitol 0,35 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 8 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 9.000 g por 15 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

A purificação das mitocôndrias foi feita em gradiente de *percoll*. O precipitado coletado foi suspenso em 1 a 2 mL do tampão de lavagem e vertido sobre 30 mL de tampão de purificação [*percoll* 22,5 % (v/v), manitol 0,6 M, MOPS 10 mM, BSA 0,5% (p/v), pH 7,2] sendo centrifugado a 12.000 g por 45 min. As mitocôndrias purificadas foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na região basal dos tubos, sendo diluídas aproximadamente dez vezes com tampão de lavagem e centrifugadas a 10.000 g por 15 min.

### Morango

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 600g de frutos, os mesmos utilizados para as análises físico-químicas. O procedimento seguiu o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015), com modificações descritas no texto. O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) em cerca de 1,0 L de tampão de isolamento [sacarose 0,4 M,

MOPS 50 mM, EDTA 3 mM, Cys 8 mM, BSA 0,1% (p/v), PVP-25 0,2% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.000 g, por 10 min. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 g, por 15 min, sendo o *pellet* ressuspenso em tampão de lavagem [sacarose 0,4 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,1% (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 10 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 10.000 g, por 20 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

A purificação das mitocôndrias seguiu o mesmo protocolo descrito para a purificação das mitocôndrias de polpa de mamão com modificações descritas no texto acima.

### **Tomate**

As mitocôndrias foram isoladas a 4°C, utilizando-se cerca de 40g de frutos, os mesmos utilizados para as análises físico-químicas. O procedimento seguiu o protocolo proposto por Oliveira et al. (2015), com modificações descritas no texto. O tecido foi homogeneizado em centrífuga (Juicer, modelo R16720, Walita, Brasil) em cerca de 200 ml de tampão de isolamento [sacarose 0,4 M, MOPS 50 mM, EDTA 8 mM, Cys 4 mM, BSA 0,5 % (p/v), PVP-25 0,4% (p/v), pH 7,4] sob agitação constante. O homogenato foi filtrado através de quatro camadas de gaze e uma de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado a 1.500 g, por 15 min. O sobrenadante foi centrifugado a 15.000 g, por 15 min, sendo o *pellet* ressuspenso em tampão de lavagem [manitol 0,4 M, MOPS 10 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 0,5 % (p/v), pH 7,2]. Esta suspensão foi centrifugada a 1.000 g por 8 min, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a 9.000 g, por 15 min para obtenção das mitocôndrias no precipitado.

A purificação das mitocôndrias seguiu o mesmo protocolo descrito para a purificação das mitocôndrias de polpa de mamão com modificações descritas no texto acima.

### **Determinação da integridade de membrana**

A integridade da membrana mitocondrial foi avaliada medindo a atividade da COX pela adição do citocromo C. A COX localiza-se na membrana interna da mitocôndria e requer o citocromo C na forma reduzida. O citocromo C é uma proteína grande, deste modo não consegue atravessar a membrana de uma mitocôndria intacta. Portanto, quando as mitocôndrias intactas são incubadas com o citocromo C a atividade da COX deve permanecer inalterada. Assim, por meio da comparação da atividade da COX, na presença e na ausência de Triton X-100, detergente empregado para romper a membrana. Desta forma uma estimativa da integridade da membrana mitocondrial pode ser obtida (Sweetlove et al., 2007).

A COX é quantificada com o citocromo C, na presença ou ausência de Triton X-100, por meio do consumo de oxigênio registrado pelo método polarográfico, usando um eletrodo de O<sub>2</sub> tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK) (Sweetlove et al., 2007).

O ensaio foi conduzido em temperatura de 25°C. Em 1 mL do meio de reação adicionou 5-20 µL de mitocôndrias purificadas seguindo-se de: a) 20 µL de AA 500 mM sendo registrada a taxa respiratória; b) 10µL de citocromo C 5 mM após o qual também foi registrada a taxa respiratória e c) 5 µL Triton X-100 10% (v/v), sendo a seguir registrada a taxa respiratória. A atividade da COX foi dada pela diferença entre a taxa respiratória (c) e a taxa respiratória (a). A porcentagem de integridade da membrana foi dada pela expressão a seguir, segundo Sweetlove et al. (2007):

$$1 - \frac{\text{taxa respiratória (b)} - \text{taxa respiratória (a)}}{\text{taxa respiratória (c)} - \text{taxa respiratória (a)}} \times 100$$

### **Determinação da concentração de proteínas**

Determinado espectrofotometricamente, em 595 nm, como descrito por Bradford (1976), utilizando BSA como proteína padrão.

## **Efeito dos inibidores do complexo I, III e AOX na atividade da GalLDH**

A atividade da GalLDH foi avaliada a partir da redução do citocromo C a 550 nm em presença do substrato GalL. O método enzimático foi similar ao descrito por Ôba et al. (1995), com algumas modificações.

As mitocôndrias purificadas (1mg) foram incubadas em tampão Tris 50 mM, pH 7,8 na presença de citocromo C 5 mM, Triton X-100 5% (v/v) e azida 5 mM (para manter o citocromo C reduzido). Os bloqueadores foram adicionados antes do início da redução do citocromo C em um volume final de 1 mL. A reação foi iniciada com a adição de GalL 5 mM e a redução do citocromo C pelo GalL foi monitorada espectrofotometricamente a 550 nm em intervalos de 10 segundos durante 1 minuto.

Foram utilizados os seguintes bloqueadores: i) para o bloqueio do complexo I, rotenona 4 mM; ii) bloqueio do complexo III, antimicina A 5 mM e iii) para o bloqueio da AOX, n-PG 20  $\mu$ M. A reação sem a presença dos bloqueadores foi utilizada como reação controle. Uma unidade de atividade da GalLDH foi definida como a quantidade de citocromo C reduzido durante 1 minuto.

No caso do mamão, as análises foram feitas com mitocôndrias purificadas a partir da polpa de frutos em três estádios de amadurecimento. Para o morango foram analisadas mitocôndrias purificadas somente em frutos completamente maduros, enquanto nos três genótipos de tomates foram utilizadas mitocôndrias purificadas de frutos verdes e maduros.

## **Efeito dos substratos e bloqueadores respiratórios na acumulação do AA em mitocôndrias isoladas**

### **Efeito dos substratos respiratórios na acumulação do AA em mitocôndrias isoladas**

Para verificar o efeito dos sustratos respiratórios na acumulação de AA, as mitocôndrias purificadas foram pré-tratadas com GalL 5 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 em presença dos substratos NADH 8 mM, ou malato 10 mM, ou glutamato 20 mM, ou piruvato 20mM, ou succinato 15 mM com o volume final de

250  $\mu\text{L}$ . As reações foram interrompidas após 15 min, 30 min, 1h e 2h com ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v). Imediatamente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 5 min a temperatura de 4°C e o sobrenadante coletado. O tratamento controle foi avaliado somente na presença de Gall 5 mM sem os substratos NADH, malato, glutamato, piruvato e succinato. Para a quantificação do AA, as amostras foram condicionadas às condições neutras adicionando tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) e em seguida foram tratadas com 5 mM de DTT por 5 min. Em seguida, as amostras foram filtradas com filtro de nylon em PVDF, com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$ .

Para determinação do AA, 20  $\mu\text{L}$  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” a uma velocidade do fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e o pico de AA foi identificado aos 5 min. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol mg}^{-1}$  proteína<sup>-1</sup>.

### **Efeito dos bloqueadores do complexo II e AOX na acumulação do AA nas mitocôndrias**

As mitocôndrias purificadas dos frutos foram pré-tratadas com Gall 5 mM em tampão fosfato 100 mM, pH 7,0 na presença de NADH 8mM e dos bloqueadores SHAM 4 mM, antimicina A 5mM e uma combinação dos dois bloqueadores, SHAM 4 mM e antimicina A 5mM. As amostras foram incubadas durante 2 horas. Como controle foi estabelecido uma reação sem a adição dos bloqueadores. Após a incubação as reações foram interrompidas com TFA 5% (v/v), sendo centrifugadas a 10.000 g por 5 min a 4° C e o sobrenadante foi coletado para determinação do AA no HPLC, seguindo condições descritas anteriormente.

Foram realizadas análises em mitocôndrias purificadas dos frutos de mamão em três estádios de amadurecimento, no morango em frutos maduros e nos três genótipos de tomates foram avaliados somente em mitocôndrias purificadas no estágio verde. Não foram realizadas as análises em frutos maduros devido à falta de disponibilidade dos frutos nesse estágio de amadurecimento.

## **Análises estatísticas**

Após a coleta, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas por meio do Teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ), utilizando o programa R.

## RESULTADOS

### Padronização dos estádios de amadurecimento

A Figura 1 mostra os frutos de mamão nos diferentes estádios de amadurecimento, utilizados no presente trabalho. Na tabela 1 observa-se diferença ( $P \leq 0,05$ ) no parâmetro de luminosidade da casca, apresentando maiores médias nos frutos maduros. Em todos os estádios de amadurecimento os mamões apresentaram valores médios para luminosidade superiores a  $50 L^*$ , o que correspondem a cores claras.

Os dados apresentaram diferença ( $P \leq 0,05$ ) para o ângulo de cor *hue* mostrando uma diminuição com o amadurecimento dos frutos, evoluindo para uma coloração da casca mais amarelada (Tabela 1). As maiores médias foram verificadas nos frutos verdes com valores de  $115,9 h^\circ$ , enquanto os frutos intermediários e maduros apresentaram médias de  $88,11 h^\circ$  e  $81,21 h^\circ$ , respectivamente.

Observou-se a rápida perda de firmeza (F) chegando a valores médios de  $4,9 N$ , indicando o rápido amolecimento da polpa. Os frutos verdes apresentaram médias superiores ( $P \leq 0,05$ ) com valores de  $14,6 N$  (Tabela 1).

O teor de SS não apresentou diferença significativa oscilando entre  $9,3^\circ\text{Brix}$  e  $10,0^\circ\text{Brix}$  (Tabela 1).



**Figura 1.** Fotos ilustrativas da padronização dos frutos de mamão 'Golden' em três estádios de amadurecimento, verde, intermediário e maduro.

**Tabela 1.** Parâmetros físicos e químicos da caracterização dos frutos de mamão ‘Golden’ em três estádios de amadurecimento, verde, intermediário e maduro.

Estádios de maturação	Parâmetros de cor			
	Luminosidade <i>L*</i>	Ângulo de cor	Firmeza (F)	SS (°Brix)
		<i>hue</i> <i>h°</i>		
Verde	55,0 c	115,8 a	14,6 a	9,3 a
Intermediário	72,9 b	88,1 b	9,8 b	9,6 a
Maduro	94,9 a	81,2 c	4,9 c	10,0 a
CV	6,6	4,0	18,0	10,6

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

Os frutos de morango foram avaliados quando apresentaram valores médios nos parâmetros de luminosidade de 40,2  $L^*$ , ângulo de cor *hue* de 38,6  $h^\circ$ ; firmeza (F) de 1,7 N e teor de SS de 9,3 °Brix (Figura 2 e Tabela 2).



**Figura 2.** Foto ilustrativa da padronização dos frutos de morango ‘Oso Grande’.

**Tabela 2.** Médias dos parâmetros físicos e químicos da caracterização dos frutos de morango ‘Oso Grande’.

Parâmetros de cor		Firmeza (N)	Teor de SS (°Brix)
Luminosidade $L^*$	Ângulo de cor $hue (h^\circ)$		
40,2	38,6	1,78	9,3

De acordo com a Figura 3 os frutos de tomate foram selecionados com a coloração uniforme quando se encontravam verdes e maduros. Não há diferença ( $P \leq 0,05$ ) entre os genótipos que apresentaram valores médios similares de luminosidade e ângulo de cor  $hue$  (Tabela 3).

A firmeza diferiu significativamente apenas nos frutos verdes, quando os frutos WT apresentaram média de 11,5 N superior ( $P \leq 0,05$ ) ao registrado para as linhas transgênicas 5-13 e 8-14, que com médias de 8,1 N e 8,8 N, respectivamente, não diferiram entre si (Tabela 3). Quando os frutos estavam maduros não foi verificada diferença significativa para a firmeza entre os genótipos (Tabela 3). Nestes frutos, a firmeza registrada foi de 3,4 N; 3,5 N e 3,7 N para o WT, 5-13 e 8-14, respectivamente.

O teor de SS não apresentou diferença ( $P \leq 0,05$ ) entre os genótipos, resultado que pode ser observado nos dois estádios de amadurecimento dos frutos (Tabela 3).



**Figura 3.** Fotos ilustrativas da padronização dos frutos de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106') do tipo selvagem (WT) e linhas transgênicas (GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14) em dois estádios de maturação (verde e maduro).

**Tabela 3.** Parâmetros físicos e químicos da caracterização dos frutos de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106') do tipo selvagem (WT) e linhas transgênicas da GalLDH (GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14) em dois estádios de amadurecimento frutos verdes e maduros.

Genótipos no estágio verde	Parâmetros de cor			
	Luminosidade $L^*$	Ângulo de cor $hue (h^*)$	Firmeza (N)	Teor de SS ( $^{\circ}$ Brix)
WT	47,4 a	120,0 a	11,5 a	3,5 a
5-13	51,1 a	118,6 a	8,1 b	3,3 a
8-14	48,9 a	119,4 a	8,8 b	3,8 a
CV	4,6	7,5	7,6	11,3
Genótipos no estágio maduro				
WT	35,6 a	41,8 a	3,4 a	4,2 a
5-13	35,1 a	51,7 a	3,5 a	4,5 a
8-14	35,7 a	46,6 a	3,7 a	4,6 a
CV	4,5	8,8	8,6	7,0

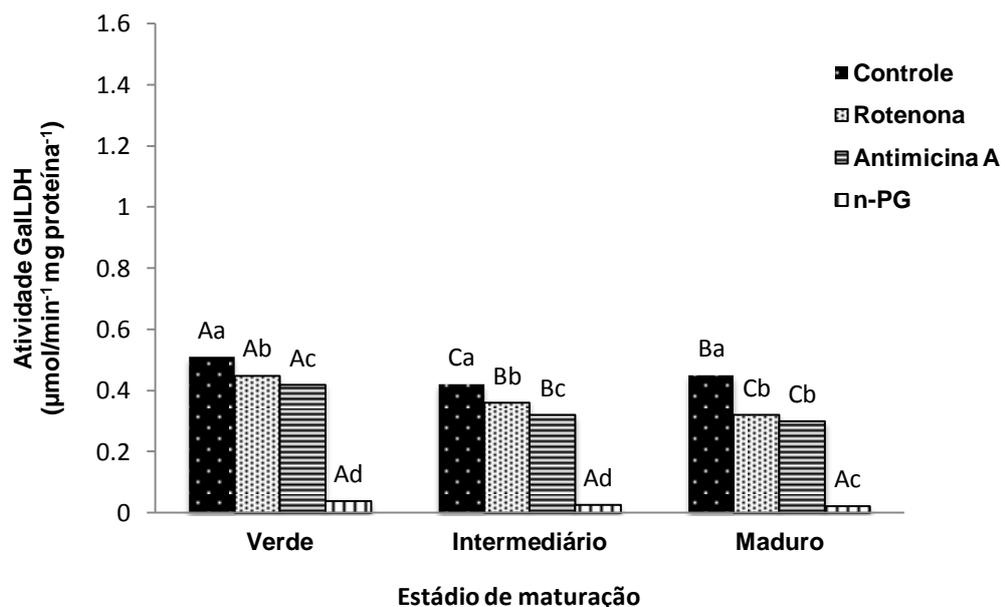
Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

### **Efeito dos bloqueadores dos complexos I, III e AOX na atividade da enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase**

O efeito dos bloqueadores dos complexos I, III e a AOX na atividade da GalLDH foi determinada a partir da adição de rotenona, antimicina A e n-PG, respectivamente bloqueadores do complexo I, complexo III e da AOX (Figura 4).

As mitocôndrias encontravam-se íntegras com medias de integridade acima de 85%, valores aceitáveis e comprobatórios da integridade das mitocôndrias que validam o método de extração utilizado na purificação. (Sweetlove et al., 2007).

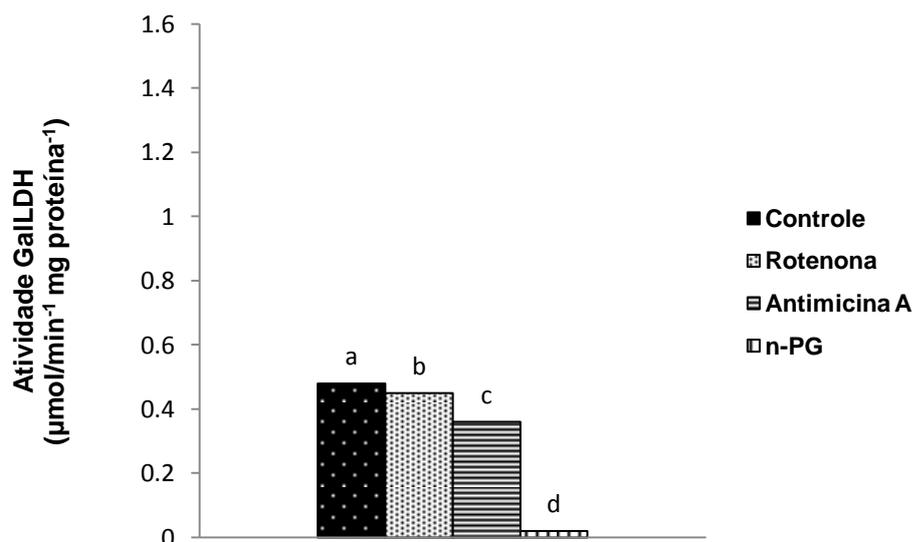
A atividade GalLDH foi maior ( $P \leq 0,05$ ) nos frutos de mamão verde e menor ( $P \leq 0,05$ ) nos frutos em estágio de amadurecimento intermediário, enquanto nos frutos maduros a mesma diferiu ( $P \leq 0,05$ ) dos demais estádios (Figura 4). A adição dos bloqueadores dos complexos I, III e AOX resultou em diminuição ( $P \leq 0,05$ ) da atividade da GalLDH nos três estádios de amadurecimento avaliados, sendo mais expressivo a diminuição após a adição do bloqueador da AOX, quando a atividade GalLDH reduziu aproximadamente 94% em relação ao controle (Figura 4). Nos frutos verdes e em estágio de amadurecimento intermediário a atividade da GalLDH foi sempre reduzida ( $P \leq 0,05$ ) a cada adição dos bloqueadores acima descritos. Porém, em frutos maduros a adição de rotenona e antimicina A tiveram o mesmo efeito na redução ( $P \leq 0,05$ ) da atividade GalLDH em relação ao controle (Figura 4).



As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os estádios de maturação (verde, intermediário e maduro), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação dentro do mesmo estágio de maturação pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 4.** Efeito dos bloqueadores respiratórios na atividade da GalLDH (determinada pela redução do citocromo C) em mitocôndrias purificadas de mamão “Golden” em três estádios de amadurecimento (verde, intermediário e maduro).

Nas mitocôndrias isoladas de morango a atividade GalLDH também diminuiu, assim como no mamão, após a adição dos bloqueadores dos complexos I, II e AOX (Figura 5). Aqui também, verifica-se diminuição da atividade GalLDH a cada adição dos bloqueadores, rotenona, antimicina A e n-PG, novamente, com maior expressividade na redução da atividade da GalLDH após a adição do bloqueador da AOX (Figura 5). Após a adição do n-PG a atividade GalLDH caiu cerca de 96% em relação ao controle.



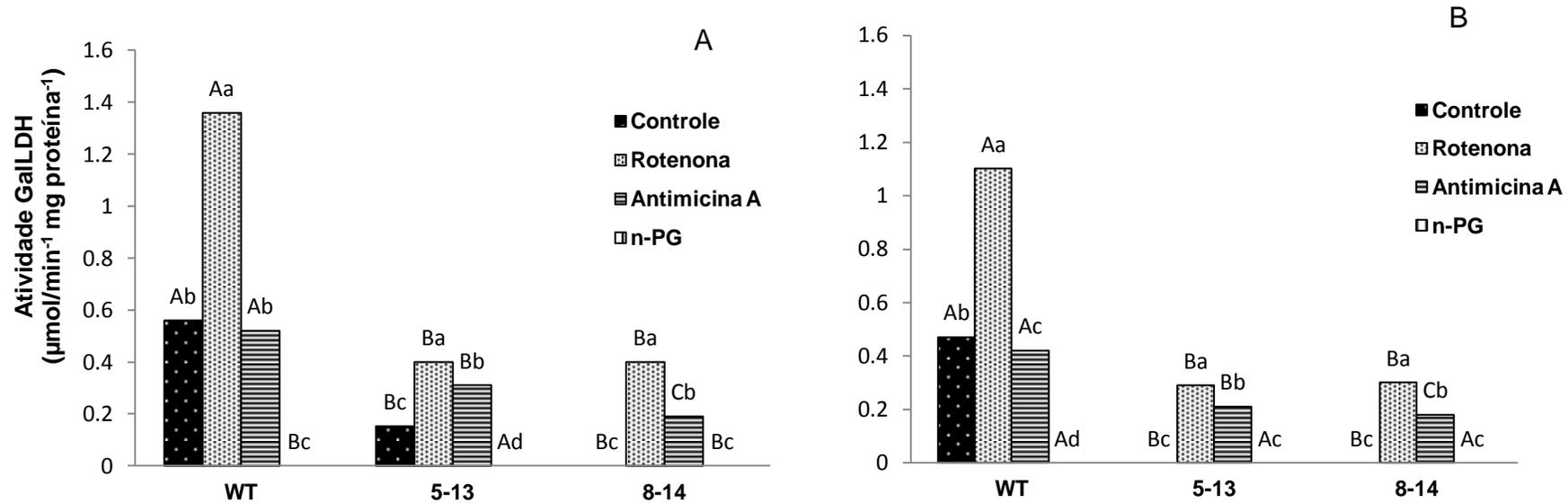
As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 5.** Efeito dos bloqueadores respiratórios na atividade da GalLDH (determinada pela redução do citocromo C) em mitocôndrias purificadas de morango ‘Oso Grande’.

Os resultados mostraram menor atividade da GalLDH nas linhas transgênicas 5-13 e 8-14 quando comparados com o do tipo selvagem (WT). Resultados observados nos dois estádios de amadurecimento (Figuras 6A e B). Estes resultados são esperados devido ao silenciamento da GalLDH.

Na figura 6A observa-se o bloqueio da atividade da GalLDH com a adição do n-PG no WT e nas linhas 5-13 e 8-14. Resultados semelhantes foram observados em frutos maduros (Figura 6B).

Dois efeitos são mais marcantes em relação à atividade GalLDH em mitocôndrias de tomate após a adição dos bloqueadores, independentemente do estágio de amadurecimento do fruto. Primeiro, o estímulo à atividade GalLDH pela aplicação da rotenona, inibidor do complexo I e segundo, a completa inibição da atividade GalLDH após a adição do bloqueador da AOX (Figuras 6A e B). O aumento na atividade GalLDH devido à adição da rotenona foi mais expressivo nos frutos WT, apresentando aumento de cerca de 2,0 vezes em relação ao controle em frutos verdes e maduros.



As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre a atividade da GalLDH para o mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 6.** Efeito dos bloqueadores respiratórios na atividade da GalLDH (determinada pela redução do citocromo C) em mitocôndrias purificadas de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106') do tipo selvagem (WT) e linhas transgênicas da GalLDH (GalLDH 5-13 e GalLDH 8-14) em dois estádios de amadurecimento em frutos verdes (A) e maduros (B).

## Efeito dos substratos e bloqueadores respiratórios na acumulação do AA em mitocôndrias isoladas

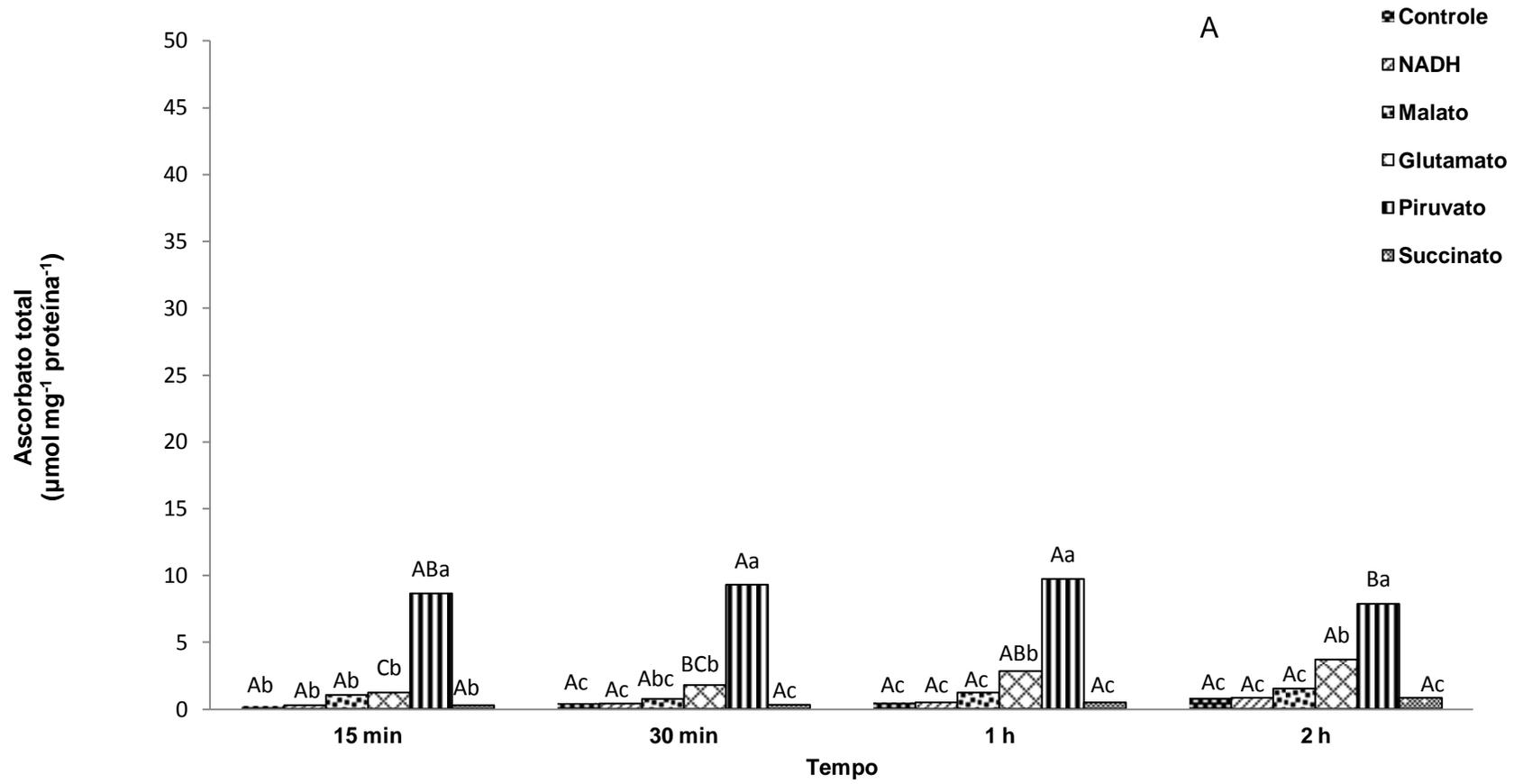
A acumulação total de AA em mitocôndrias de mamão foi mensurada em presença dos substratos respiratórios (NADH, piruvato, glutamato, succinato e malato) de acordo com os estádios de amadurecimento (verde, intermediário e maduro) e tempo de incubação (15 min, 30 min, 1h e 2h). Nas mitocôndrias de frutos no estágio de amadurecimento verde, o acúmulo de AA apresentou diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) na presença dos substratos respiratórios. O substrato piruvato aumentou o acúmulo de AA apresentando médias superiores aos demais, com valores de  $8,65 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ;  $9,27 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ;  $9,74 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$  e  $7,84 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$  nos tempos de incubação de 15 min, 30 min, 1h e 2h, respectivamente (Figura 7A). Seguido pelo glutamato que também estimulou o acúmulo de AA demonstrando diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) nos tempos de 30 min ( $1,78 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ), 1h ( $2,83 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) e 2h ( $3,7 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) (Figura 7A).

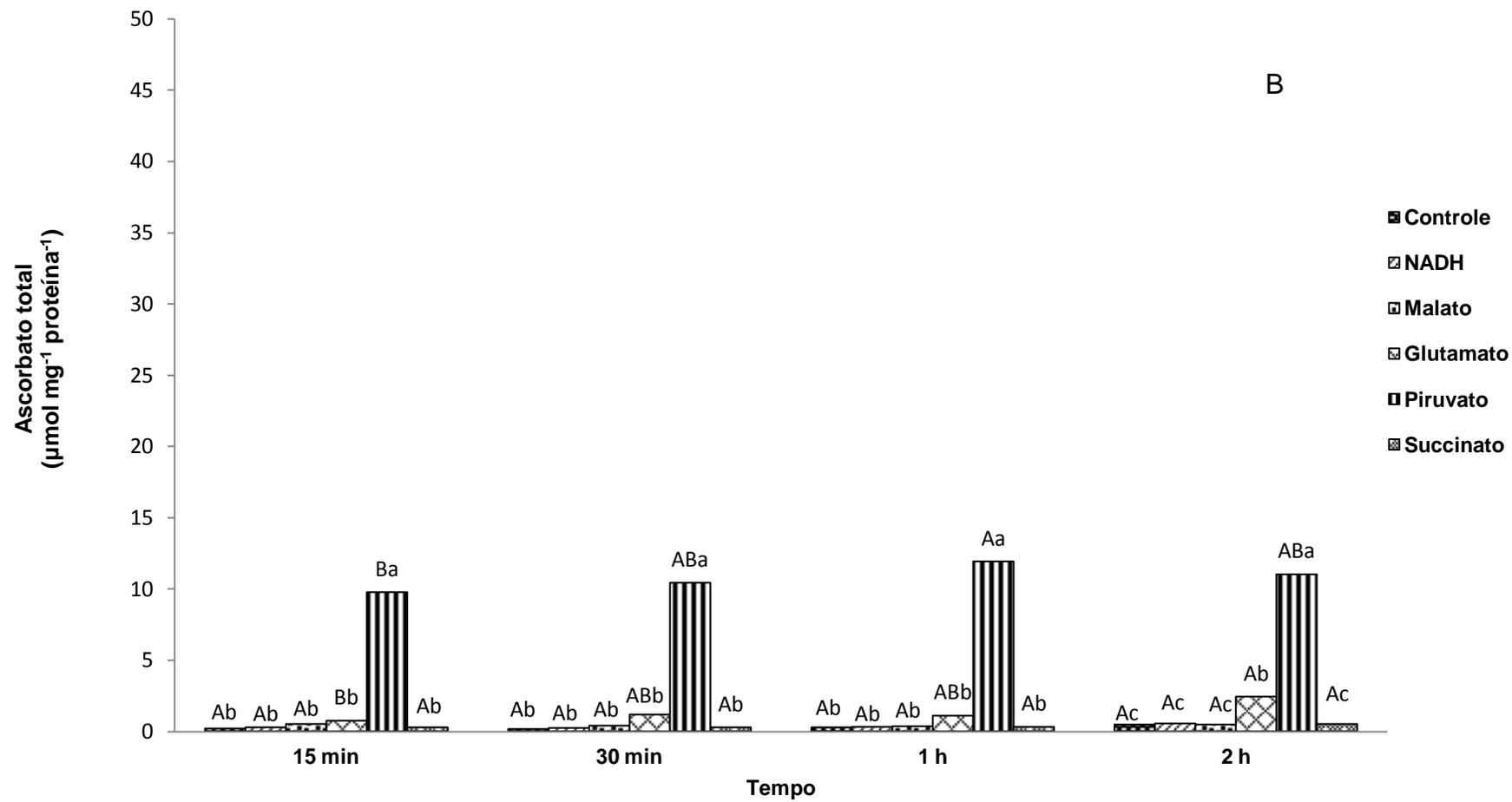
Os resultados demonstrados nos frutos intermediários (Figura 7B) apresentaram diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) na presença dos substratos avaliados, o substrato piruvato promoveu o aumento no acúmulo de AA mostrando valores superiores aos demais substratos com médias entre  $9,77$ - $11,91 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$  em todos os tempos de incubação avaliados. Seguidamente observa-se o substrato glutamato incrementando o acúmulo de AA apresentando diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) apenas no tempo de incubação correspondente a 2h, com média de  $2,41 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ . Os substratos NADH, succinato e malato não apresentaram diferença significativa.

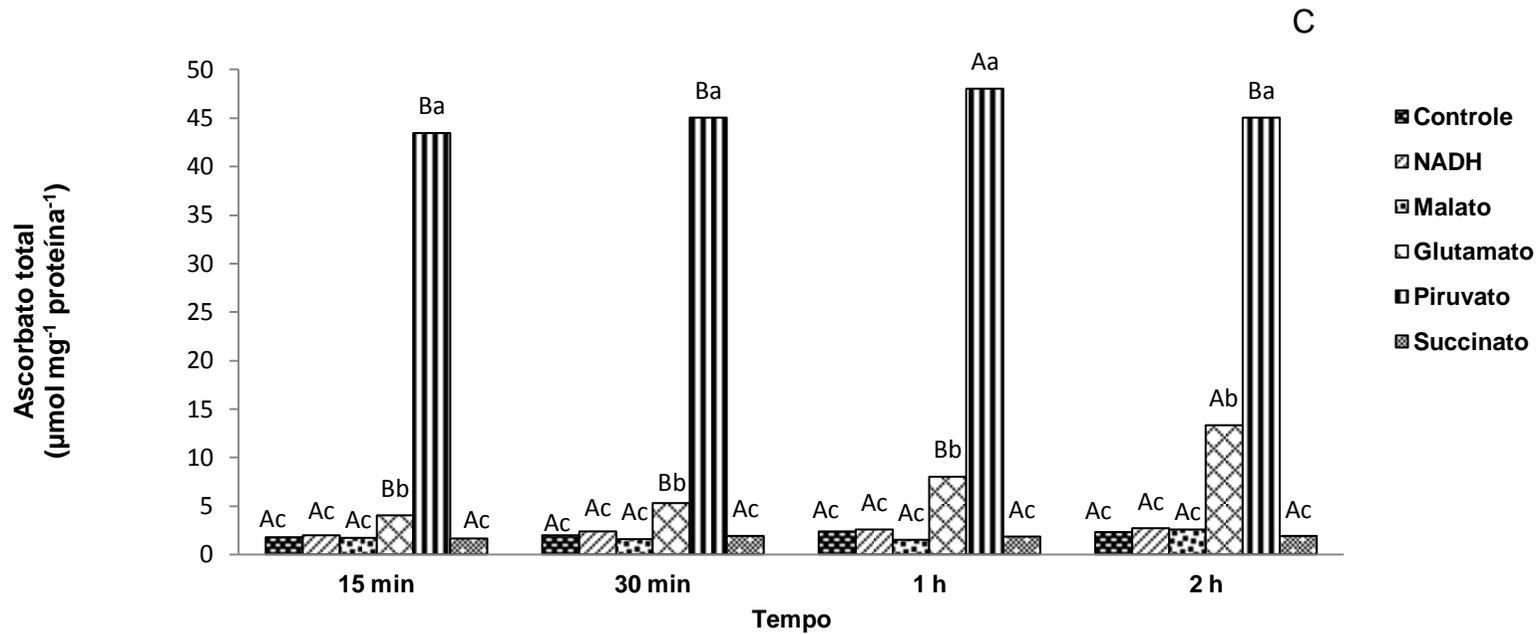
Nos frutos maduros os substratos respiratórios apresentaram diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ). As médias foram superiores para o substrato respiratório piruvato que estimulou o acúmulo de AA nos tempos de incubação correspondente a 15 min ( $42 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ), 30 min ( $44 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ), 1h ( $49,1 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) e 2h ( $45 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) (Figura 7C). Em seguida observa-se o substrato glutamato promovendo o acúmulo de AA apresentando diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) com maiores médias para o tempo de incubação correspondente a 2h ( $13,1 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$ ) (Figura 7C). Os

substratos respiratórios NADH, succinato e malato não apresentaram diferença significativa.

Os frutos maduros apresentaram maior acumulação de AA com médias superiores aos outros estádios de amadurecimento em presença dos substratos respiratórios. Deste modo o substrato respiratório que mais apresentou estímulo na acumulação de AA foi o piruvato apresentando médias superiores que variaram de 42 - 49,1  $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$  em todos os tempos de incubação avaliados. De acordo com estes resultados podemos destacar que com o amadurecimento dos frutos ocorre um aumento na acumulação de AA em mitocôndrias isoladas dos frutos de mamão.







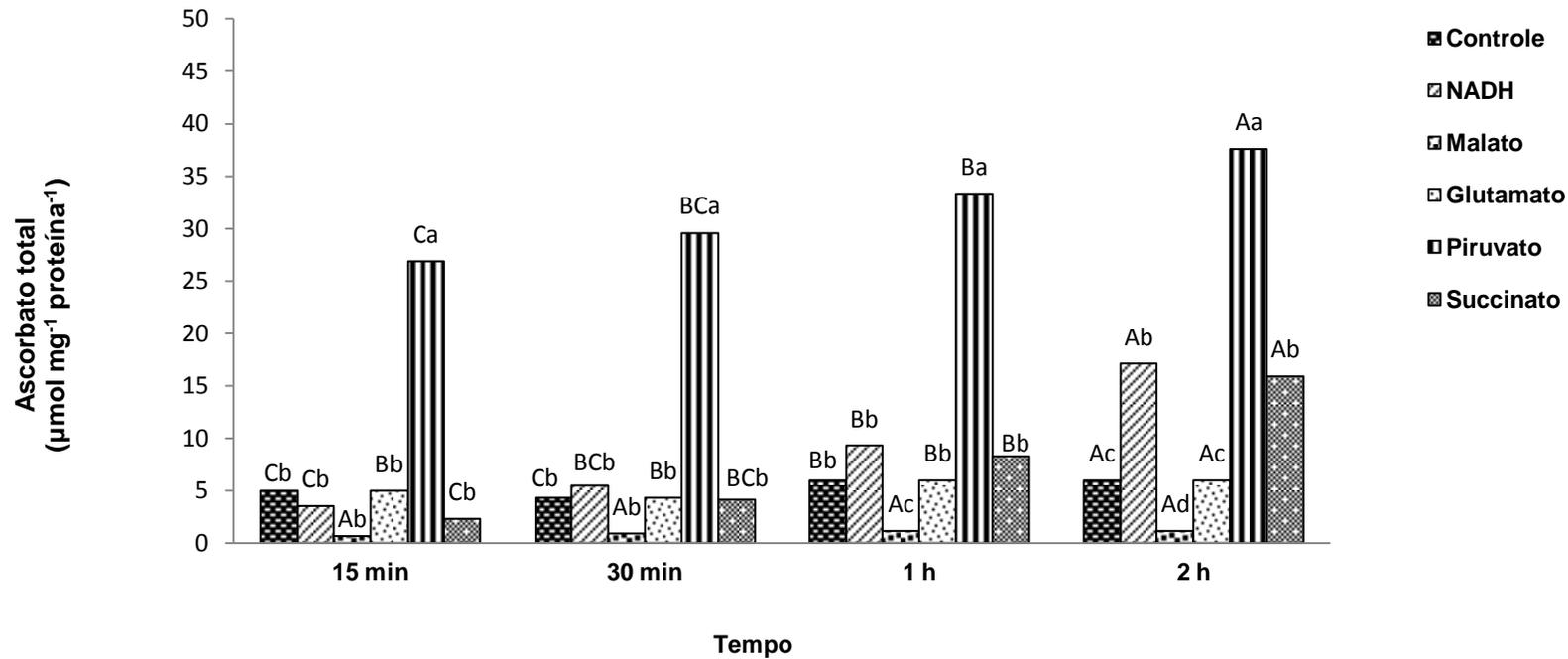
As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os tempos de incubação (15 min, 30 min, 1h e 2h), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre o acúmulo do ascorbato total para o mesmo tempo de incubação pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 7.** Efeito dos substratos na acumulação de AA em mitocôndrias de polpa de mamão em quatro tempos de incubação (15 min, 30 min, 1h e 2h) avaliados em três estádios amadurecimento frutos verdes (Figura A), intermediários (Figura B) e maduros (Figura C).

A acumulação total de AA em presença dos substratos respiratórios NADH, piruvato, succinato e malato, foi avaliada em mitocôndrias de frutos maduros de morango (Figura 9). O substrato respiratório piruvato promoveu o aumento no acúmulo de AA ( $38,02 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$ ) no tempo de incubação correspondente a 2h, apresentando diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ). E a menor acumulação de AA foi em mitocôndrias no tempo de incubação correspondente a 15 min ( $26,83 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$ ).

Em seguida os substratos NADH e succinato incrementaram a acumulação de AA no tempo de incubação referente a 2h, apresentando médias de  $17,07 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$  e  $15,88 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$ , respectivamente (Figura 9).

O malato apresentou menores médias em todos os tempos avaliados com valores entre  $0,91 - 0,98 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$ .



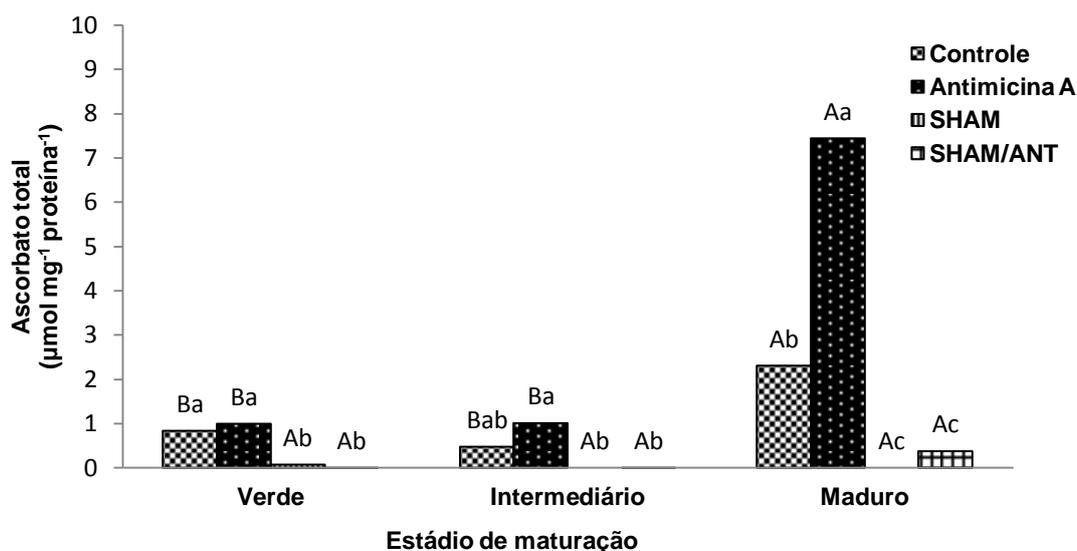
As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre tempos de incubação (15 min, 30 min, 1h e 2h), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre o acúmulo do ascorbato total para o mesmo tempo de incubação pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 8.** Efeito dos substratos na acumulação de AA em mitocôndrias de frutos maduros de morango em quatro tempos de incubação (15 min, 30 min, 1h e 2h).

Foi verificada a influência dos bloqueadores dos complexos respiratórios I, III e AOX na acumulação de AA no tempo de incubação referente à 2h. Os resultados apresentados em frutos de mamão demonstraram que a antimicina A, o bloqueador do complexo III, promoveu o aumento no acúmulo de AA apresentando diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ) com médias superiores ( $7,43 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ ) para os frutos maduros, enquanto os frutos verdes ( $1,02 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ ) e intermediários ( $0,98 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ ) não apresentaram diferença significativa. Estes resultados demonstram que a antimicina A influenciou no aumento do acúmulo de AA em frutos de mamão (Figura 9).

Utilizando o SHAM, bloqueador específico da AOX, observou-se a diminuição no acúmulo de AA, foram detectados apenas valores mínimos nos frutos verdes ( $0,05 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ ), os outros estádios de amadurecimento não apresentaram valores na acumulação de AA, não apresentando diferença significativa (Figura 9).

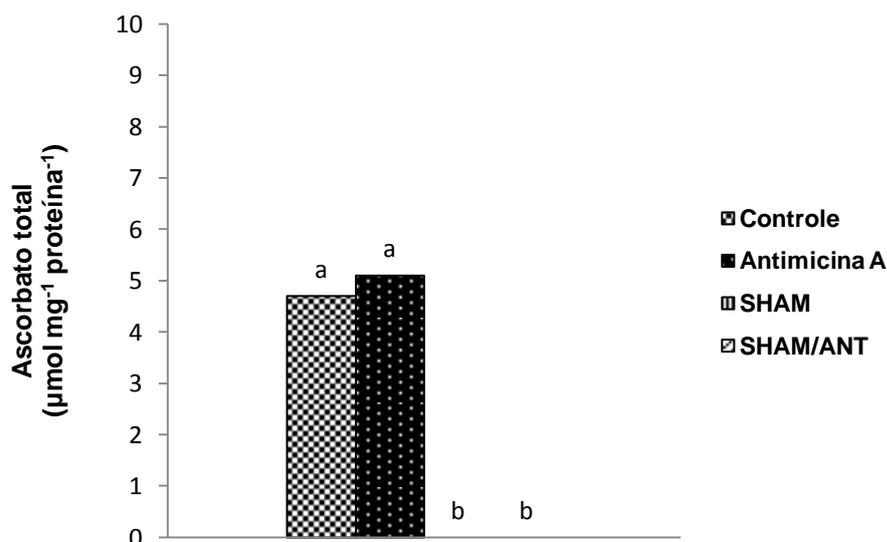
A combinação dos bloqueadores SHAM e antimicina A, não apresentou diferença significativa, observando a diminuição no acúmulo de AA com valores mínimos que variaram entre  $0,001 - 0,38 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$ , nos três estádios de amadurecimento avaliados. Resultados que demonstram que o bloqueio da AOX interfere causando a diminuição no acúmulo de AA na presença de antimicina A (Figura 9).



As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os estádios de amadurecimento (verde, intermediário e maduro), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre a acumulação do ascorbato total para o mesmo estádio de amadurecimento pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 9.** Efeito dos bloqueadores na acumulação de AA em mitocôndrias purificadas de mamão nos estádios (verde, intermediário e maduro) por um período de incubação correspondente às 2h.

Foram feitos ensaios para determinação do acúmulo de AA em frutos de morango. Utilizou bloqueadores do complexo I (rotenona), complexo III (antimicina A) e a AOX (SHAM), por um período de incubação correspondente à 2h. Estes resultados apresentaram diferença significativa ( $P \leq 0,05$ ), as médias observadas com a inibição do complexo III com o uso de antimicina A ( $5,1 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$ ) promoveu o aumento no acúmulo de AA semelhante ao controle ( $4,7 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$ ). O bloqueador da AOX (SHAM) e a combinação SHAM e antimicina apresentaram diminuição no acúmulo de AA, com valores mínimos não detectados (Figura 10).

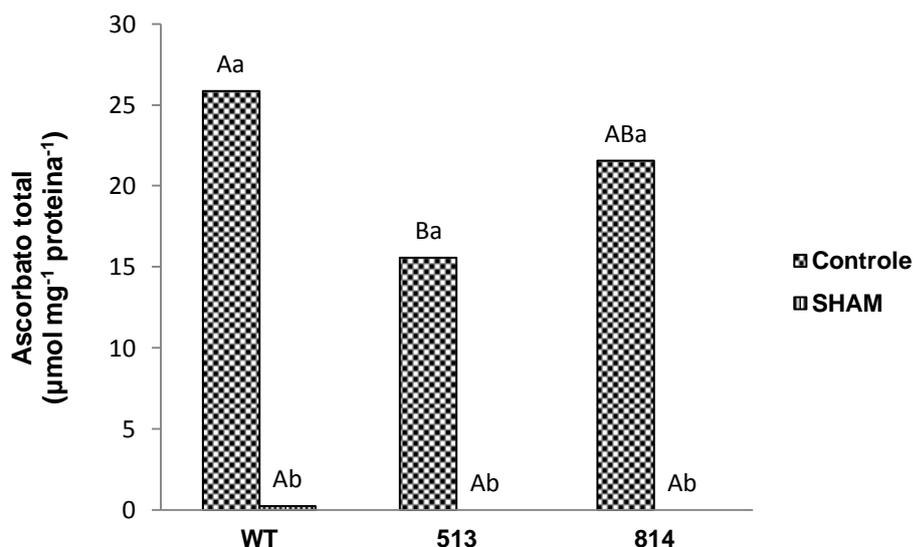


As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 10.** Efeito dos bloqueadores na acumulação de AA em mitocôndrias purificadas de morango, por um período de incubação correspondente à 2h.

Foi avaliada a capacidade de acumulação de AA nos frutos verdes de tomates em linhas transgênicas (5-13 e 8-14) e tipo selvagem (WT). Os frutos das linhas transgênicas 5-13 e 8-14, acumularam  $16,01$  e  $23,2 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$  de AA, respectivamente. O WT e a linha transgênica 8-14 não diferiram. Enquanto as linha 5-13 e linha 8-14 também não diferiram (Figura 11).

Para determinar se a acumulação de AA nas linhas transgênicas foi influenciada pela AOX, foi utilizado o SHAM (bloqueador da AOX). O bloqueador promoveu uma diminuição no acúmulo de AA observando valores que variaram entre  $0,00 - 0,23 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{proteína}^{-1}$  nos genótipos, não apresentando diferença significativa (Figura 11).



As médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si na comparação entre os genótipos (WT, 5-13 e 8-14), enquanto as médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na comparação entre a acumulação de AA para o mesmo genótipo pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**Figura 11.** Efeito do bloqueador da AOX (SHAM) na acumulação de AA em mitocôndrias purificadas de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106') do tipo selvagem (WT) e linhas transgênicas da GalLDH silenciadas (5-13 e 8-14) em frutos verdes.

## DISCUSSÃO

A mudança na coloração da casca dos frutos é um evento típico que ocorre durante a fase de amadurecimento. Alterações na pigmentação da casca durante essa fase envolvem, entre outros, a degradação das clorofilas e a biossíntese de carotenoides (Malgarim et al., 2014; Motta e Melo, 2015).

A mudança na coloração dos frutos de mamão está relacionada com o amadurecimento. Os resultados mostram um aumento na luminosidade da casca, verificado a partir do índice *L* e uma diminuição do ângulo *hue* durante o amadurecimento dos frutos, que evidencia a evolução da cor da casca do verde

para o amarelo. De acordo com Bron (2006), o amadurecimento é a fase que ocorre no final da maturação e início da senescência, composta por processos que determinam as características de qualidade, evidenciadas por mudanças na composição da polpa, principalmente, dada por várias transformações bioquímicas. Entre essas transformações destacam-se a mudança na coloração, devido à degradação das clorofilas e à síntese dos carotenoides (Jain et al., 2003), alteração do metabolismo dos carboidratos, amolecimento da polpa, modificação na textura e síntese de voláteis (Jain et al., 2003; Fonseca et al., 2007; Cara e Giovannoni, 2008; Bouzayen et al., 2010).

A coloração externa dos frutos de morango apresentou valores de  $L^*$  correspondente a 40,2; indicando frutos com coloração mais clara. Em trabalho com plantas de morangueiro, Yommi et al. (2003), em Tucumán, na Argentina, encontraram valores semelhantes correspondentes a  $L^*$  49,30 (cv. Aromas) e 42,11 (cv. Selva).

Neste presente trabalho o valor do ângulo *hue* encontrado nos frutos de morango foi de 38,6; indicando o ângulo de inclinação da coloração. Yommi et al. (2003), encontraram valores semelhantes para Aromas 33,44 °h e Camarosa 33,56 °h, na Argentina. Oliveira et al. (2009) não verificaram diferenças para o ângulo *hue* entre as cultivares Earlibrite (42,6 °h e 24,4 °h) e Camarosa (44,1 °h e 21,1 °h) quanto à coloração interna e externa dos frutos. Outro trabalho realizado em Portugal, visando avaliar a qualidade de frutos das cultivares Albion, Candonga, Gariguette e Galéxia, os autores encontraram diferenças claras entre cultivares, onde Gariguette apresentou frutos mais coloridos (Sousa et al., 2009). Os frutos de tomate apresentaram mudança na coloração variando da cor verde para o vermelho, mas sem apresentarem diferença significativa entre os genótipos de acordo com os parâmetros de coloração avaliados. A mudança na coloração do estadio verde para o maduro (início da mudança de cor) é considerado o primeiro sintoma visual para o índice da maturação. (Sentanin e Rodriguez-Amaya, 2007).

Outra característica que passa por transformação durante o amadurecimento é a firmeza dos frutos, essa transformação pode ser observada nos frutos de mamão apresentando diminuição gradativa da firmeza (Tabela 2). A firmeza tende a diminuir devido à hidrólise de componentes da parede celular, tais como pectina, hemicelulose e celulose devido às enzimas específicas, cuja

atividade torna mais pronunciada durante esta fase do desenvolvimento do fruto. Dentre estas enzimas pode-se citar a pectinametilesterase (PME) e a poligalacturonase (PG), contribuindo para o abrandamento da polpa (Cordenunsi et al., 2005; Gayosso-García et al., 2010).

O aumento no acúmulo de AA pode ser consequência do aumento da síntese de intermediários precursores da acumulação de AA (Mercado-silva et al., 1998; Upadhyaya et al., 2010). A degradação dos polissacarídeos da parede celular, principalmente as pectinas sofrem alterações durante o amadurecimento dos frutos, são solubilizadas aumentando a disponibilidade de galactose. Estas modificações são responsáveis pelo decréscimo na firmeza do tecido (Dumville e Fry, 2003; Fontes e Gilbert, 2010). Os teores de AA tendem a aumentar com o amadurecimento já que a galactose é um precursor da via de síntese (Wheeler et al., 1998; Smirnoff et al., 2001; Tezotto et al., 2011; Pinto et al., 2013). Então podemos afirmar que o aumento no acúmulo de AA está na maioria das vezes relacionada com a perda de firmeza dos frutos.

Sabe-se que a etapa limitante na síntese de AA está relacionada entre esses dois precursores: a manose-1-P e a L-galactose (Wheeler e Smirnoff, 1998; Davey et al., 1999). Neste estudo foi demonstrado que em frutos maduros ocorreu maior acumulação de AA mitocondrial, é possível que estes frutos tenham maior disponibilidade de galactose devido a degradação das pectinas, por essa razão os frutos maduros apresentaram maior acumulação de AA do que os frutos verdes. Todavia, não se tem conhecimento de estudos correlacionando estádios de amadurecimento e teor de AA com a capacidade mitocondrial na acumulação de AA em frutos.

Nos frutos de mamão os teores de SS sofreram poucas alterações. Atribui-se esta pequena variação no teor de SS na pós-colheita do mamão à baixa quantidade de amido encontrada na polpa destes frutos (Gómez et al., 2002). Estes resultados são semelhantes àqueles observados por Oliveira et al. (2015), que verificaram também pouca variação neste atributo durante o amadurecimento do mamão 'Golden'.

A atividade da enzima GalLDH apresentou respostas distintas com adição de rotenona (bloqueador do complexo I) em mitocôndrias dos frutos avaliados. Nas mitocôndrias de mamão e morango, o bloqueio com rotenona diminuiu a atividade da GalLDH (Figura 4 e 5). Em frutos de tomate o bloqueio do complexo I

com adição de rotenona aumentou a atividade da enzima GalLDH (Figura 6). Trabalho realizado por Bartoli et al. (2000) demonstrou que a adição de rotenona não teve efeito sobre a síntese de AA em batatas. Todavia, Millar et al. (2003), demonstraram que a adição de rotenona em *A. thaliana* inibiu a taxa de síntese de AA. Estes resultados demonstram que o complexo I regula a atividade da GalLDH por um mecanismo ainda desconhecido, pode-se observar a partir destes resultados que as respostas da regulação ocorrem de formas diferenciadas em mitocôndrias de frutos.

Trabalho realizado por Szarka et al. (2012), demonstrou que a enzima GalLDH é importante para a estrutura do complexo I, mas essas evidências ainda não são conclusivas (Szarka et al., 2013). Em mutantes de *A. thaliana* com o gene que codifica a GalLDH silenciado houve redução na quantidade do complexo I. Em contraste, os outros complexos proteicos da CTE mitocondrial não foram alterados (Pineau et al., 2008). Para elucidar melhor o papel do complexo I seria interessante futuros trabalhos avaliando a acumulação de AA em frutos mutantes com o complexo I silenciado.

Várias evidências demonstram que a acumulação de AA nas mitocôndrias pode ser independente da atividade da GalLDH. A adição de antimicina A, diminuiu a atividade da GalLDH em mitocôndrias de frutos de mamão e morango (Figura 4 e 5), mas os níveis de acumulação de AA nessas mesmas mitocôndrias se mantiveram ou foram superiores. Estes resultados demonstram que o aumento na acumulação de AA não está associado a maior atividade da GalLDH. As linhas transgênicas com a enzima GalLDH silenciada (>90% de inibição da GalLDH) (Figura 11) mantiveram a capacidade de acumular AA a níveis similares ao tipo selvagem (Figura 11).

Devido a falta de correlação entre a atividade da GalLDH e acumulação de AA, é possível que a atividade da GalLDH não seja um bom marcador no acúmulo de AA. Estes resultados são consistentes com estudos realizados em folhas de trigo, onde Bartoli et al. (2005) verificaram que não há nenhuma relação entre a quantidade de proteína, a atividade máxima da GalLDH e síntese de AA. Em frutos de morango, a infiltração com o substrato GalL aumentou os níveis de AA sem aumento na atividade da GalLDH (Do Nascimento et al., 2005).

Contudo, outros trabalhos mostraram que a atividade GalLDH pode influenciar os níveis de AA. Kuźniak e Skłodowska (2004) mostraram uma

correlação entre o teor de AA mitocondrial e a atividade máxima da GalLDH, com a inoculação de *Botrytis cinerea* em folhas de tomate. Em trabalho realizado com batatas fatiadas, Obá et al. (1994) apresentaram a estimulação da enzima GalLDH aumentando os níveis de AA. Tabata et al. (2001) em trabalho com o silenciamento do gene da GalLDH mostrou a redução no acúmulo de AA em tabaco. O aumento da expressão desta enzima em tabaco aumentou os níveis de AA de 2 a 4 vezes e aumentou significativamente o processo redox (Chen et al., 2003).

Bartoli et al. (2005) demonstraram em trabalho realizado com a enzima GalLDH que a quantidade de proteína não necessariamente consiste na atividade da mesma. Segundo esses autores as mitocôndrias podem ter grandes quantidades de proteínas e poucas dessas proteínas ativas, ou poucas proteínas e muitas delas ativas. A explicação consiste em que a GalLDH tem pelo menos dois componentes redox-ativo que regulam a atividade máxima extraível da enzima. Esses componentes podem refletir o estado da ativação da GalLDH no momento da extração e por conseguinte não seria necessariamente proporcional à quantidade de proteína. Neste presente trabalho não foi determinada a quantidade de GalLDH (apenas foi quantificada proteína total) de acordo com as avaliações apenas determinaram as proteínas ativas.

A AOX demonstrou ser necessária para manter a atividade da GalLDH. Os resultados deste trabalho mostraram a interferência da AOX na enzima GalLDH. O bloqueio da AOX com os seus respectivos bloqueadores, SHAM e n-PG, influenciou na atividade da enzima GalLDH e na acumulação de AA. Em trabalhos realizados por Alhag Dow et al. (2007) com as linhas transgênicas da GalDH silenciadas (5-13 e 8-14) foi verificado maior atividade da AOX. Tais resultados podem confirmar os resultados obtidos aqui neste estudo, onde demonstrou-se, que mesmo com níveis baixos da enzima GalLDH, há um grande acúmulo do AA (Figura 11), verificando que a AOX é necessária para atividade da GalLDH e acumulação de AA. Observou-se que na presença do bloqueador da AOX, o SHAM, apresentou uma diminuição na acumulação de AA, mesmo em frutos que não apresentam atividade da AOX, como neste caso específico o morango (Figura 10)

Estes resultados pressupõe a possibilidade da AOX, mesmo apresentando atividade mínima, tornar-se imprescindível para manter a

acumulação de AA em mitocôndrias de frutos independente da redução do citocromo C. Outro resultado que confirma essa evidencia é a adição dos dois bloqueadores do complexo III e da AOX, a antimicina A e SHAM, respectivamente, a antimicina A promove um aumento no acúmulo de AA, mas na presença do bloqueador SHAM há uma diminuição no acúmulo de AA, demonstrando que o bloqueio da AOX, com o SHAM, inibe o acúmulo de AA mesmo na presença de antimicina A.

Com o amadurecimento dos frutos observa-se maior participação da AOX, resultados que foram mostrados por Oliveira et al. (2015). Diante disso, nesse trabalho observou-se que a antimicina A apresenta maior efeito na acumulação de AA em frutos maduros de mamão (Figura 9). É provável que um menor fluxo de elétrons esteja sendo transportado pela COX devido a maior participação da AOX e conseqüentemente maior quantidade de citocromo C oxidado estaria disponível. E com a inibição do complexo III haveria maior disponibilidade de citocromo C oxidado, conseqüentemente resultaria em maior acumulação de AA.

Bartoli et al. (2006) mostraram em plantas transgênicas de *A. thaliana*, que em folhas inteiras e em mitocôndrias isoladas o acúmulo e a síntese de AA foi mais elevado em plantas onde a capacidade da AOX era mais elevada, independente da intensidade luminosa.

O piruvato estimulou a acumulação de AA em mitocôndrias de frutos de mamão e morango, em todos os estádios de amadurecimento e tempos de incubação avaliados (Figura 7 e 9). O piruvato é um ativador da AOX, Vanlerberghe et al. (1995) demonstraram que o piruvato aumentou o fluxo de elétrons através da AOX, reduzindo as ligações de dissulfeto ativando a forma reduzida.

O piruvato provoca o aumento da atividade da AOX e conseqüentemente aumenta a acumulação de AA. Trabalho realizado em mitocôndrias de plântulas de soja na presença do piruvato como estimulador da AOX demonstrou atividade máxima quando comparados com o controle (Umbach et al., 1994).

Como a AOX poderia manter a acumulação do AA sem ativar a GalLDH? Uma possível explicação seria considerar a possibilidade de um decréscimo na oxidação do AA. A AOX é um antioxidante e assim diminuiria a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida o AA a DHA, assim, com a diminuição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

provavelmente haveria uma diminuição das formas oxidadas do AA. Seria interessante testar o nível de  $H_2O_2$  durante a acumulação do AA.

A participação da AOX na respiração, assim como a síntese de AA e sua correlação com os vários processos metabólicos associados ao amadurecimento e também o controle na produção de ERO, precisam ser melhor compreendidos. O entendimento e o controle desses processos podem ser úteis no desenvolvimento de métodos e procedimentos para prolongar a vida de prateleira e acumulação de AA nos frutos.

## CONCLUSÃO

A acumulação de AA em mitocôndrias de frutas pode ser independente da atividade da GalLDH.

A AOX é necessária para manter a atividade da GalLDH e a acumulação do AA.

O substrato respiratório piruvato promove um estímulo na acumulação de AA.

E o aumento da atividade da GalLDH em frutos de tomates na presença de rotenona (inibidor do complexo I).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alhag Dow, M., Mounet, F., Gilbert, L., Nunes-Nesi, A., Garcia, V., Just, D., e 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*, v.145, p.1408-1422.
- Agius, F., González-Lamothe, R., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M. A., e Valpuesta, V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, v.21, p.177-181.

- Arrigoni, O., e De Tullio, M. C. (2000). The role of ascorbic acid in cell metabolism: between gene-directed functions and unpredictable chemical reactions. *Journal of Plant Physiology*, v.157, p.481-488.
- Bartoli, C. G., Guiamet, J. J., Kiddle, G. U. Y., Pastori, G. M., Di Cagno, R., Theodoulou, F. L., e Foyer, C. H. (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal l-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell & Environment*, v.28, p.1073-1081.
- Bartoli, C. G., Pastori, G. M., e Foyer, C. H. (2000). Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiology*, v.123, 335-344.
- Bartoli, C. G., Yu, J., Gómez, 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*, v.57, p.1621-1631.
- 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*, v.72, p.248-254.
- Bron, I. U., Jacomino, A. P. (2009). Ethylene action blockade and cold storage affect ripening of Golden papaya fruit. *Acta Physiology*, v.31, p.1165-1173.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., e Pech, J. C. (2010). Mechanism of fruit ripening. In *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, v.1, p.319-339.
- Cara, B., Giovannoni, J. J. (2008). Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*, v.175, p.106-113.
- Chen, Z., Young, T. E., Ling, J., Chang, S. C., e Gallie, D. R. (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.100, p.3525-3530.
- Cordenunsi, B. R.; Genovese, M. I; Nascimento, J. R. O.; Hassimotto, N. M. A.; Santos, R. J.; Lajolo, F. M. (2005). Effect of temperature on the chemical composition and antioxidant activity on three strawberry cultivars. *Food Chemistry*, v. 91, p. 113-121.
- Davey, M. W., Gilot, C., Persiau, G., Østergaard, J., Han, Y., Bauw, G. C., e Van Montagu, M. C. (1999). Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. *Plant Physiology*, v.121, p.535-544.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., e Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.825-860.

- Do Nascimento, J. R. O., Higuchi, B. K., Gómez, M. L. P. A., Oshiro, R. A., & Lajolo, F. M. (2005). L-Ascorbate biosynthesis in strawberries: L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. *Postharvest biology and technology*, v.38, p.34-42.
- Dumville, J. C., e Fry, S. C. (2003). Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta*, v.217, 951-961.
- Fonseca, M. J. O., Leal, N. R., Ceni, S. A., Cecon, P. R., Bressan-Smith, R. E., Balbino, J. M. S. (2007). Evolução dos pigmentos durante o amadurecimento de mamão 'Sunrise Solo' e 'Golden'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.29, p.451-455.
- Fontes, C. M., e Gilbert, H. J. (2010). Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates. *Annual review of biochemistry*, v.79, p.655-681.
- Foyer, C. H., e Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, v.155, p.2-18.
- Foyer, C. H., e Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, v.28, p.1056-1071.
- Gayosso-García Sancho, L. E., Yahia, E. M., Martínez-Téllez, M. A., e González-Aguilar, G. A. (2010). Effect of maturity stage of papaya maradol on physiological and biochemical parameters. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, v.5, p.194-203.
- Gill, S. S., e Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, v.48, p.909-930.
- Gómez, M. L. P. A., Lajolo, F., e Cordenunsi, B. (2002). Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. *Journal of food science*, v.67, 442-447.
- Jain, N., Dhawan, K., Malhotra, S., Singh, R. (2003) Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guajava* L.): Compositional and enzymatic changes. *Plant Foods for Human Nutrition*, v.58, p.309-315.
- Kuźniak, E., e Skłodowska, M. (2004). The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of Experimental Botany*, v.55, p.605-612.
- Lorence, A., Chevone, B. I., Mendes, P., e Nessler, C. L. (2004). myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, v.134, p.1200-1205.

- Malgarim, M. B., Tibola, C. S., Zaicowisk, C., Ferri, V. C., e da Silva, P. R. (2014). Modificação da atmosfera e resveratrol na qualidade póscolheita de morangos cv. Camarosa. *Current Agricultural Science and Technology*, v.12.
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, v.27, p.1254-1255.
- Mercado-Silva, E., Benito-Bautista, P., e de los Angeles García -Velasco, M. (1998). Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biology and Technology*, v.13, p.143-150.
- Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J. L., Bartoli, C. G., Theodoulou, F. L., e Foyer, C. H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, v.133, 443-447.
- Motta, J. D., de Melo Queiroz, A. J., de Figueirêdo, R. M. F., e de Sousa, K. D. S. M. (2015). Índice de cor e sua correlação com parâmetros físicos e físico químicos de goiaba, manga e mamão/Color index and correlation with physical and chemical parameters of guava, mango and papaya. *Comunicata Scientiae*, v.6, p.74.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., e Fernie, A. R. (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*, v.137, p.611-622.
- Óba K, Fukui M, Imai Y, Iriyama S, Nogami K (1994) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. *Plant Cell Physiology*, v.35, p.473-478.
- Óba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T (1995) Purification and properties of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *Journal of Biological Chemistry* v.117, p.120-124.
- Oliveira, M. G., Mazorra, L. M., Souza, A. F., Silva, G. M. C., Correa, S. F., Santos, W. C., Oliveira, J. G. (2015). Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, v.189, p.42-50.
- Oliveira, R. P.; Scivittaro, W. B. (2009). Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. *Horticultura Brasileira*, v.27, p.91- 95.

- Østergaard, J., Persiau, G., Davey, M. W., Bauw, G. e Van Montagu, M. (1997) Isolation of a cDNA coding for L-galactono-g-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p.30009–30016.
- Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., and De Paepe, R. (2008) L-Galactono- 1,4 lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*. v.283, p.32500–32505.
- Pinto, L. K. A., Martins, M. L. L., Resende, E. D., Thiébaud, J. T. L., e Martins, M. A. (2013). Avaliação da atividade das enzimas pectinametilesterase e  $\beta$ -galactosidase em mamões cv. Golden armazenados sob diferentes concentrações de oxigênio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.35, p.15-22.
- Sentanin, M. A., Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Teores de carotenóides em mamão e pêssago determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, p.787-92.
- Siendones, E., González-Reyes, J. A., Santos-Ocaña, C., Navas, P., Córdoba, F. (1999). Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiology*, v.120, p.907-912.
- Smirnoff, N., Conklin, P. L., e Loewus, F. A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual review of plant biology*, v.52, p.437-467.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.355, p.1455-1464.
- Sousa, M. B.; Curado, T.; Trigo, M. J.; Vasconcelos, F. N.; Nunes, T. (2009). Strawberry quality: effect of cultivars, harvest date and storage. *Acta Horticulturae*, v. 2, p. 877-880.
- Sweetlove, L. J., Taylor, N. L., e Leaver, C. J. (2007). Isolation of intact, functional mitochondria from the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Mitochondria*, v.125, p.136.
- Szarka, A., Bánhegyi, G., Asard, H. (2013). The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.19, p.1036-1044.
- Szarka, A., Tomasskovic, B., e Bánhegyi, G. (2012). The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, v.13, p.4458-4483.

- Tabata, K., Ôba, K., Suzuki, K., e Esaka, M. (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. *The Plant Journal*, v.27, p.139-148.
- Tezotto, J. V., Jacomino, A. P., Godoy, A. E., Cerqueira-Pereira, E. C., e Gallon, C. Z. (2011). Efeito do corte como dano mecânico na qualidade e na fisiologia de mamões 'golden'. *Revista Brasileira de Fiticultura*, volume especial: p.241-247.
- Umbach, A. L., Wiskich, J. T., e Siedow, J. N. (1994). Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS letters*, v.348, p.181-184.
- Upadhyaya, C. P., Akula, N., Young, K. E., Chun, S. C., Kim, D. H., e Park, S. W. (2010). Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnology letters*, v.32, p.321-330.
- Vanlerberghe, G. C., Day, D. A., Wiskich, J. T., Vanlerberghe, A. E., e McIntosh, L. (1995). Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria (dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation). *Plant Physiology*, v.109, 353-361.
- Wheeler G, Jones M, Smirnoff N (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, v.393, p.365–369.
- Wolucka, B. A., e 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*, v.278, p.47483-47490.
- Yommi, A. K.; Borquez, S. L.; Quipildor, S. L.; Kirschbaum, D. S. (2003). Fruit quality evaluation of strawberry cultivars grown in Argentina. *Acta Horticulturae*, v. 628, p. 871-875.

## 5. RESUMO E CONCLUSÕES

A L-galactona-1,4 lactona desidrogenase (GalLDH), catalisa o último passo na via de biossíntese de AA em plantas. Neste estudo avaliando os mecanismos responsáveis pelas alterações nos teores de AA em frutos, onde se avaliou a atividade da GalLDH e a sua participação na CTE mitocondrial. Durante esse trabalho, muitos resultados foram obtidos avaliando o bloqueio dos complexos I, III e AOX e a influência da enzima GalLDH na síntese e acumulação de AA em mitocôndrias isoladas, os ensaios foram realizados em diferentes frutos e diferentes estádios de maturação. Estes resultados avaliados em conjunto confirmam a complexidade da biossíntese de AA e a ligação com o metabolismo do fruto.

Em frutos verdes de mamão a via predominante da respiração é a COX que tem como receptor de elétrons o  $O_2$ , sendo este reduzido à  $H_2O$  (1), com o amadurecimento dos frutos a via AOX passa a ser mais efetiva nesse processo de redução do  $O_2$  a  $H_2O$  (2). Todavia, em frutos de morango de padrão respiratório não climatérico, não foi verificada a participação da AOX durante a avaliação da respiração.

Com o amadurecimento dos frutos ocorre a hidrólise da parede celular disponibilizando maior quantidade de GalL, o GalL é oxidado a AA pela enzima GalLDH (3), gerando maior acúmulo de AA em frutos maduros. Esse AA pode ser oxidado a DHA pela enzima APX reduzindo o  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (4), outra evidência seria a participação da AOX como antioxidante, supostamente estaria realizando

essa função, disponibilizando menor quantidade das formas oxidadas do AA. A longo prazo, seria interessante quantificar o  $H_2O_2$  combinado com as formas oxidadas do AA. O potencial redox do AA parece de fato desempenhar um papel muito importante na resposta dos frutos durante as fases de amadurecimento.

A GalLDH por meio da oxidação do GalL a AA participa do transporte de elétrons na CTE mitocondrial (3), de modo a interferir no bloqueio das oxidases terminais. Outra estimativa é que uma pequena quantidade da proteína GalLDH é suficiente para sintetizar e acumular o AA em mitocôndrias isoladas de frutos. A participação da AOX na síntese de AA e na atividade da GalLDH é de suma importância, o bloqueio da AOX diminui ou bloqueia a atividade, a síntese e acumulação.

Durante o trabalho foi possível estabelecer um protocolo de extração de mitocôndrias isoladas da polpa dos frutos de morango, permitindo investigar algumas particularidades da fisiologia da mitocôndria no tecido específico, fornecendo subsídios para ajudar a esclarecer algumas características do funcionamento das rotas alternativas na respiração, em frutos de padrão não climatérico.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agius, F., González-Lamothe, R., Caballero, J. L., Muñoz-Blanco, J., Botella, M. A., e Valpuesta, V. (2003). Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, v.21, p.177-181.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., e Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.30, 161-175.
- Alhagdow, M., Mounet, F., Gilbert, L., Nunes-Nesi, A., Garcia, V., Just, D., e 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*, v.145, p.1408-1422.
- Almeida, A. M., Jarmuszkiewicz, W., Khomsi, H., Arruda, P., Vercesi, A. E., e Sluse, F. E. (1999). Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest ripening of tomato fruit. *Plant Physiology*, v.119, p.1323-1330.
- Alves, G. V. L., dos Santos, W. C., Waldman, W. R., Oliveira, J. G., Vargas, H., e da Silva, M. G. (2010). A photoacoustic technique applied to detection of ethylene emissions in edible coated passion fruit. In *Journal of Physics: Conference Series*, v.214, p.012020.
- Alves, R. E., Filgueiras, H. A. C., Moura, C. F. H., Araujo, N. C. C., Almeida, A. S. (2002). Camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): a rich natural source of vitamin C. *48th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Tegucigalpa*, v.46, p.7-11

- Amor, Y., Chevion, M., e Levine, A. (2000). Anoxia pretreatment protects soybean cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death: possible involvement of peroxidases and of alternative oxidase. *FEBS letters*, v.477, p.175-180.
- Arrigoni O. (1994). Ascorbate system in plant development. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.26, p.407-419.
- Askerlund, P., e Larsson, C. (1991). Transmembrane electron transport in plasma membrane vesicles loaded with an NADH-generating system or ascorbate. *Plant Physiology*, v.96, p.1178-1184.
- Baig, M. M., Kelly, S., e Loewus, F. (1970). L-ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulonolactone and L-galactonolactone. *Plant Physiology*, v.46, p.277-280.
- Balibrea, M. E., Dell'Amico, J., Bolarín, M. C., e Pérez-Alfocea, F. (2000). Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. *Physiologia Plantarum*, v.110, p.503-511.
- Ball, G. F. (1998). Bioavailability and analysis of vitamins in foods. *Chapman & Hall*.
- Bapat, V. A., Trivedi, P. K., Ghosh, A., Sane, V. A., Ganapathi, T. R., e Nath, P. (2010). Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, v.28, p.94-107.
- Barata-Soares, A. D., Gomez, M. L., Mesquita, C. H. D., e Lajolo, F. M. (2004). Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v.16, p.147-154.
- Barth, C., De Tullio, M., e Conklin, P. L. (2006). The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. *Journal of Experimental Botany*, v.57, p.1657-1665.
- Barth, C.; Moeder, W.; Klessig, D. F. Conklin, P. L. (2004). The timing of senescence and response to pathogens is altered in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant vitamin vtc1. *Plant Physiology*, v.134, p. 1784–1792.
- Bartoli, C. G., Guiamet, J. J., Kiddle, G., Pastori, G., Di Cagno, R., Theodoulou, F. L., Foyer, C. H. (2005). The relationship between L-galactonolactone dehydrogenase (GalLDH) and ascorbate content in leaves under optimal and stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, v.28, p.1073-1081.
- 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*, v.123, p.335–344.

- Bartoli, C. G., Yu, J., Gómez, 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*, v.57, p.1621-1631.
- Beck, E., Burkert, A., e Hofmann, M. (1983). Uptake of L-ascorbate by intact spinach chloroplasts. *Plant Physiology*, v.73, p.41-45.
- Biale, J. B. (1964). Growth, Maturation, and Senescence in Fruits Recent knowledge on growth regulation and on biological oxidations has been applied to studies with fruits. *Science*, v.146, p.880-888.
- Blokhina, O., e Fagerstedt, K. V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, v.138, p.447-462.
- Bouzayen, M., Latché, A., Nath, P., e Pech, J. C. (2010). Mechanism of fruit ripening. In *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, v.1, p.319-339.
- Bultema, J. B., Braun, H. P., Boekema, E. J., e Kouřil, R. (2009). Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v.1787, p.60-67.
- Calegario, F. F., Cosso, R. G., Fagjan, M. M., Almeida, F. V., Jardim, W. F., Ježek, P., e Vercesi, A. E. (2003). Stimulation of potato tuber respiration by cold stress is associated with an increased capacity of both plant uncoupling mitochondrial protein (PUMP) and alternative oxidase. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.35, p.211-220.
- Carrasco-Luna, J., Calatayud, A., Gonzalez-Daros, F., de Valle-Tascon, S. (1995). Hexacyanoferrate (III) stimulation of elongation in coleoptiles segments from *Zea mays* L. *Protoplasma* v.184, p.63-71.
- Centeno, D. C., Osorio, S., Nunes-Nesi, A., Bertolo, A. L., Carneiro, R. T., Araújo, W. L., e Oliver, S. N. (2011). Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *The Plant Cell*, v.23, p.162-184.
- Cerqueira, F. M., Medeiros, M. H. G., Augusto, O. (2007) Antioxidantes: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, v.30, p.441-449.
- Chen, Z., e Gallie, D. R. (2005). Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiology*, v.138, p.1673-1689.
- Chen, Z., Young, T. E., Ling, J., Chang, S. C., e Gallie, D. R. (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.100, p.3525-3530.

- Chen, Z.; Gallie, D. R. (2004). The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell*, v.16, p.1143–1162.
- Chew, O., Whelan, J., e Millar, A. H. (2003). Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, p.46869-46877.
- Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, v.165, p.1545-1562.
- Conklin, P. L., e Barth, C. (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell & Environment*, v.27, p.959-970.
- Conklin, P. L., Gatzek, S., Wheeler, G. L., Dowdle, J., Raymond, M. J., Rolinski, S., e Smirnov, N. (2006). Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v.281, p.15662-15670.
- Conklin, P. L., Norris, S. R., Wheeler, G. L., Williams, E. H., Smirnov, N., e Last, R. L. (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.96, p.4198-4203.
- Conklin, P. L., Saracco, S. A., Norris, S. R., e Last, R. L. (2000). Identification of ascorbic acid-deficient Arabidopsis thaliana mutants. *Genetics*, v.154, p.847-856.
- Conklin, P. L., Williams, E. H., e Last, R. L. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.93, p.9970-9974.
- Considine, M. J., Daley, D. O., Whelan, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology*, v.126, p.1619-1629.
- Cordenunsi, B. R., Oliveira do Nascimento, J. R., Genovese, M. I., Lajolo, F. M. (2002). Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, p.2581-2586.
- Corrêa, S. F., Da Silva, M. G., Oliveira, J. G., Aroucha, E. M. M., Silva, R. F., Pereira, M. G., e Vargas, H. (2005). Effect of the potassium permanganate during papaya fruit ripening: Ethylene production. In *Journal de Physique IV (Proceedings)*, v.125, p.869-871.
- Cruz-Rus, E., Amaya, I., Sánchez-Sevilla, J. F., Botella, M. A., & Valpuesta, V. (2011). Regulation of L-ascorbic acid content in strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany*, v.62, p.4191–4201.

- Cui, Y., Yue, Y., Qian, G., e Chen, B. (2011). Luminescent functional metal organic frameworks. *Chemical Reviews*, v.112, p.1126-1162.
- Davey, M. W., Gilot, C., Persiau, G., Østergaard, J., Han, Y., Bauw, G. C., & Van Montagu, M. C. (1999). Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture. *Plant Physiology*, v.121, p.535-544.
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., e Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.80, p.825-860.
- Day, D. A., Arron, G. P., e Laties, G. G. (1980). Nature and control of respiratory pathways in plants: cyanide sensitive and cyanide resistant respiration. *The Biochemistry of Plants*, v.2, p.197-241.
- De Gara, L., Paciolla, C., Tommasi, F., Liso, R., e Arrigoni, O. (1994) *In vivo* inhibition of galactono-g-lactone conversion to ascorbate by lycorine. *Journal of Plant Physiology*, v. 144, p.649–653.
- De Gara, L., Tommasi, F., Liso, R., e Arrigoni, O. (1992). The biogenesis of galactono-g-lactone oxidase in *Avena sativa* embryos. *Phytochemistry*, v. 31, p.755–756.
- De Pinto, M. C., Paradiso, A., Leonetti, P., De Gara, L. (2006). Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *The Plant Journal*, v.48, p.784-795.
- DeBolt, S., Cook, D. R., Ford, C. M. (2006). L-tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.103, p.5608–5613.
- DeBolt, S., Melino, V., Ford, C. M. (2007). Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany*, v.99, p.3–8.
- Deutsch, H., Becker, K., Matt, S., e Märk, T. D. (2000). Theoretical determination of absolute electron-impact ionization cross sections of molecules. *International Journal of Mass Spectrometry*, v.197, p.37-69.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., e Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, v.52, p.4.
- Diplock, A. T., Charuleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., e Vina-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*, v.80, p.77-S112.

- Do Nascimento, J. R. O., Higuchi, B. K., Gómez, M. L. P. A., Oshiro, R. A., e Lajolo, F. M. (2005). L-Ascorbate biosynthesis in strawberries: L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase expression during fruit development and ripening. *Postharvest Biology and Technology*, v.38, p.34-42.
- Dowdle, J., Ishikawa, T., Gatzek, S., Rolinski, S., e Smirnoff, N. (2007). Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-l-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *The Plant Journal*, v.52, p.673-689.
- Dumas, Y., Dadomo, M., Di Lucca, G., e Grolier, P. (2003). Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, p.369-382.
- Dumville, J. C., e Fry, S. C. (2003). Solubilisation of tomato fruit pectins by ascorbate: a possible non-enzymic mechanism of fruit softening. *Planta*, v.217, 951-961.
- Dutilleul, C., Garmier, M., Noctor, G., Mathieu, C., Chétrit, P., Foyer, C. H., & De Paepe, R. (2003). Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *The Plant Cell*, v.15, p.1212-1226.
- Eltelib, H. A., Badejo, A. A., Fujikawa, Y., e Esaka, M. (2011). Gene expression of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase during fruit ripening and in response to environmental stresses in acerola (*Malpighia glabra*). *Journal of Plant Physiology*, v.168, p.619-627.
- Esaka, M., Fujisawa, K., Goto, M., e Kisu, Y. (1992). Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiology*, v.100, p.231-237.
- Eskling, M., Arvidsson, P. O., e Åkerlund, H. E. (1997). The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiologia Plantarum*, v.100, p.806-816.
- Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., e Braun, H. P. (2004). Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.42, p.937-942.
- Eubel, H., Jansch, L., e Braun, H. P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiology*, v.133, p.274-286.
- Fabi, J. P., Cordenunsi, B. R., de Mattos Barreto, G. P., Mercadante, A. Z., Lajolo, F. M., e Oliveira do Nascimento, J. R. (2007). Papaya fruit ripening: response to ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.6118-6123.

- Feng, Z., Pang, J., Nouchi, I., Kobayashi, K., Yamakawa, T., e Zhu, J. (2010). Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. *Environmental Pollution*, v.158, p.3539-3545.
- Fiorani, F., Umbach, A. L., e Siedow, J. N. (2005). The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis AOX1a* transgenic plants. *Plant Physiology*, v.139, p.1795-1805.
- Fotopoulos, V., De Tullio, M. C., Barnes, J., e Kanellis, A. K. (2008). Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *Journal of Experimental Botany*, v.59, p.729-737.
- Foyer, C. H. (2003). The role of ascorbic acid in defense networks and signalling in plants. *Vitamin C: its Function and Biochemistry in Animals and Plants*, p.65-82.
- Foyer, C. H., e Lelandais, M. (1996). A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *Journal of Plant Physiology*, v.148, p.391-398.
- Foyer, C. H., e Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, v.28, p.1056-1071.
- Foyer, C. H., e Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiology*, v.155, p.2-18.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.11, p.861-905.
- Fraaije, M. W., Sjollema, K. A., Veenhuis, M., e van Berkel, W. J. (1998). Subcellular localization of vanillyl-alcohol oxidase in *Penicillium simplicissimum*. *FEBS letters*, v.422, p.65-68.
- Franceschi, V. R., e Tarlyn, N. M. (2002). L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology*, v.130, p.649-656.
- Gallie, D. R. (2013). L-Ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*.
- Gao, Q., e Zhang, L. (2008). Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, v.165, p.138-148.

- Gatzek, S., Wheeler, G. L., e Smirnoff, N. (2002). Antisense suppression of l-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. *The Plant Journal*, v.30, p.541-553.
- Gergoff, G., Chaves, A., e Bartoli, C. G. (2010). Ethylene regulates ascorbic acid content during dark-induced leaf senescence. *Plant Science*, v.178, p.207-212.
- Gest, N., Gautier, H., e Stevens, R. (2013). Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany*, v.64, p.33-53.
- Gill, S. S., e Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, p.909-930.
- Giraud, E., Ho, L. H., Clifton, R., Carroll, A., Estavillo, G., Tan, Y. F. e Whelan, J. (2008). The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology*, v.147, p.595-610.
- Gomez, M. L., e Lajolo, F. M. (2008). Ascorbic acid metabolism in fruits: activity of enzymes involved in synthesis and degradation during ripening in mango and guava. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.88, p.756-762.
- Gonçalves, C. X., Tiecher, A., Chaves, F. C., Nora, L., Zhengguo, L., Latché, A., Rombaldi, C. V. (2013). Putative role of cytokinin in differential ethylene response of two lines of antisense ACC oxidase cantaloupe melons. *Postharvest Biology and Technology*, v.86, p.511-519.
- Gonzalez-Reyes, J. A., Alcain, F. J., Caler, J. A., Serrano, A., Cordoba, F., e Navas, P. (1995). Stimulation of onion root elongation by ascorbate and ascorbate free radical in *Allium cepa* L. *Protoplasma*, v.184, p.31-35.
- Gonzalez-Reyes, J. A., Hidalgo, A., Caler, J. A., Palos, R., e Navas, P. (1994). Nutrient uptake changes in ascorbate free radical-stimulated onion roots. *Plant physiology*, v.104, p.271-276.
- Green, M. A., e Fry, S. C. (2005). Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature*, v.433, p.83-87.
- Guerrero, N. A. C., e Sánchez, R. M. (2005). Problema bioquímico bioenegetica. Cadenas Respiratorias ramificadas. *Revista de Educación Bioquímica*, v.24, p.104-105.
- Hale, C. R. (1962). Synthesis of organic acids in the fruit of the grape. *Nature*, v.195, p.917-918.

- Halliwell, B. (1996). Oxidative Stress, Nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research*, v.25, p. 57-74.
- Halliwell, B., e Gutteridge, J. M. (1998). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hancock, R. D., e Viola, R. (2002). Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *TRENDS in Biotechnology*, v.20, p.299-305.
- Harris, R. S. (1975). Effects of agricultural practices on the composition of foods. *Nutritional evaluation of Food Processing*, v.2, p.33-57.
- Hausladen, A., e Kunert, K. J. (1990). Effects of artificially enhanced levels of ascorbate and glutathione on the enzymes monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase, and glutathione reductase in spinach (*Spinacia oleracea*). *Physiologia Plantarum*, v.79, p.384-388.
- Heazlewood, J. L., Howell, K. A., e Millar, A. H. (2003). Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v.1604, p.159-169.
- Heber, U., Bukhov, N. G., Wiese, C., e Hedrich, R. (2003). Energized uptake of ascorbate and dehydroascorbate from the apoplast of intact leaves in relation to apoplastic steady state concentrations of ascorbate. *Plant Biology*, v.5, p.151-158.
- Heinemeyer, J., Braun, H. P., Boekema, E. J., e Kouřil, R. (2007). A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, v.282, p.12240-12248.
- Helmerhorst, E. J., Murphy, M. P., Troxler, R. F., e Oppenheim, F. G. (2002). Characterization of the mitochondrial respiratory pathways in (*Candida albicans*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v.1556, p.73-80.
- Herbert, R. W., Hirst, E. L., Percival, E. G. V., Reynolds, R. J. W., e Smith, F. (1933). 299. The constitution of ascorbic acid. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, p.1270-1290.
- Hidalgo, A., Gonzalez-Reyes, J. A., e Navas, P. (1989). Ascorbate free radical enhances vacuolization in onion root meristems. *Plant, Cell & Environment*, v.12, p.455-460.
- Horemans, N., Foyer, C. H., e Asard, H. (2000a). Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science*, v.5, p.263-267.

- Horemans, N., Foyer, C. H., Potters, G., e Asard, H. (2000b). Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.38, p.531-540.
- Huang, C., He, W., Guo, J., Chang, X., Su, P., e Zhang, L. (2005). Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. *Journal of Experimental Botany*, v.56, p.3041-3049.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 1841-1856.
- Imahori, Y., Yamamoto, K., Tanaka, H., e Bai, J. (2013). Residual effects of low oxygen storage of mature green fruit on ripening processes and ester biosynthesis during ripening in bananas. *Postharvest Biology and Technology*, v.77, p.19-27.
- Imai, T., Karita, S., Shiratori, G. I., Hattori, M., Nunome, T., Ôba, K., e Hirai, M. (1998). L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant and Cell Physiology*, v.39, p.1350-1358.
- Ioannidi, E., Kalamaki, M. S., Engineer, C., Pateraki, I., Alexandrou, D., Mellidou, I., Kanellis, A. K. (2009). Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *Journal of Experimental Botany*, ern322.
- Isherwood, F. A., Chen, Y. T., e Mapson, L. W. (1954). Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochemical Journal*, v.56, p.1.
- Ishikawa, T., Dowdle, J., Smirnoff, N. (2006). Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiologia Plantarum*, v.126, p.343-355.
- Jarmuszkiewicz, W., Almeida, A. M., Vercesi, A. E., Sluse, F. E., e Sluse-Goffart, C. M. (2000). Proton re-uptake partitioning between uncoupling protein and ATP synthase during benzohydroxamic acid-resistant state 3 respiration in tomato fruit mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.13315-13320.
- Jaspers, P., e Kangasjärvi, J. (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, v.138, p.405-413.
- Jimenez, A., Hernandez, J. A., del Rio, L. A., e Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, v.114, p.275-284.
- Johnston, J. W., Gunaseelan, K., Pidakala, P., Wang, M., e Schaffer, R. J. (2009). Co-ordination of early and late ripening events in apples is regulated through differential sensitivities to ethylene. *Journal of Experimental Botany*, erp122.

- Kadenbach, B., Ramzan, R., Wen, L., Vogt, S. (2010) New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1800, p.205–212.
- Klodmann, J., Sunderhaus, S., Nimtz, M., Jänsch, L., and Braun, H. P. (2010) Internal architecture of mitochondrial complex I from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. v.22, p.797–810.
- Kumar, S., Yadav, P., Jain, V., Malhotra, S. P. (2011). Evaluation of oxidative stress and antioxidative system in ber (*Ziziphus mauritiana* L.) fruits during storage. *Journal of Food Biochemistry*, v.35, p.1434-1442.
- Kwon, S. Y., Ahn, Y. O., Lee, H. S., e Kwak, S. S. (2001). Biochemical characterization of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *BMB Reports*, v.34, p.316-321.
- Kwon, S. Y., Choi, S. M., Ahn, Y. O., Lee, H. S., Lee, H. B., Park, Y. M., e Kwak, S. S. (2003). Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *Journal of Plant Physiology*, v.160, p.347-353.
- Laing, W. A., Bulley, S., Wright, M., Cooney, J., Jensen, D., Barraclough, D., e MacRae, E. (2004). A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.101, p.16976-16981.
- Lamond, A. I., e Sleeman, J. E. (2003). Nuclear substructure and dynamics. *Current biology*, v. 13, p.825-828.
- Larkindale, J., Hall, J. D., Knight, M. R., e Vierling, E. (2005). Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*, v.138, p.882-897.
- Lee, S. K., e Kader, A. A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, v.20, p.207-220.
- Leferink, N. G., Heuts, D. P., Fraaije, M. W., e van Berkel, W. J. (2008a). The growing VAO flavoprotein family. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.474, p.292-301.
- Leferink, N. G., van den Berg, W. A., e van Berkel, W. J. (2008b). L-Galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *FEBS Journal*, v.275, p.713-726.
- Li, M., Ma, F., Shang, P., Zhang, M., Hou, C., Liang, D. (2009). Influence of light on ascorbate formation and metabolism in apple fruits. *Planta*, v.230, p.39-51.

- Li, Y., e Schellhorn, H. E. (2007). New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *The Journal of Nutrition*, v.137, p.2171-2184.
- Lin, L. S., e Varner, J. E. (1991). Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiology*, v.96, p.159-165.
- Lin, Z., Zhong, S., e Grierson, D. (2009). Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany*, v.60, p.3311-3336.
- Linster, C. L., e Clarke, S. G. (2008). L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of *VTC2*. *Trends in Plant Science*, v.13, p.567-573.
- Liso, R., Calabrese, G., Bitonti, M. B., e Arrigoni, O. (1984). Relationship between ascorbic acid and cell division. *Experimental Cell Research*, v.150, p.314-320.
- Liu, T. C., Liu, Y. C., Chen, K. E., Chao, C. W., e Wu, C. T. (2012). The nonclimacteric guava cultivar 'Jen-Ju Bar' is defective in System 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity. *Postharvest Biology and Technology*, v.67, p.10-18.
- Loewus FA. (1988). Ascorbic acid and its metabolic products. In: Preiss J. *The Biochemistry of Plants*. v. 14, p.85-107.
- Loewus, F. A. (1999). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*, v.52, p.193-210.
- Loewus, F. A., Loewus, M. W., e Seib, P. A. (1987). Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.5, p.101-119.
- Lorence, A., Chevone, B. I., Mendes, P., e Nessler, C. L. (2004). myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, v.134, p.1200-1205.
- Ma, G., Zhang, L., Kato, M., Yamawaki, K., Asai, T., Nishikawa, F., e Matsumoto, H. (2010). Effect of 1-methylcyclopropene on the expression of genes for ascorbate metabolism in postharvest broccoli. *Postharvest Biology and Technology*, v.58, p.121-128.
- Mailloux, R. J., Harper, M. E. (2011). Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radical Biology and Medicine*, v.51, p.1106-1115.
- Mapson, L. W., e Breslow, E. (1958). Biological synthesis of ascorbic acid: I-galactono-g-lactone dehydrogenase. *Biochemistry Journal*, v.68, p.359-406.
- Mapson, L. W., Isherwood, F. A., e Chen, Y. T. (1954). Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of L-galactono-γ-lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria. *Biochemical Journal*, v.56, p.21.

- Mattevi, A., Fraaije, M. W., Mozzarelli, A., Olivi, L., Coda, A., e van Berkel, W. J. (1997). Crystal structures and inhibitor binding in the octameric flavoenzyme vanillyl-alcohol oxidase: the shape of the active-site cavity controls substrate specificity. *Structure*, v.5, p.907-920.
- Maurino, V. G., Grube, E., Zielinski, J., Schild, A., Fischer, K., e Flügge, U. I. (2006). Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase–ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, v.47, p.1381-1393.
- Melino, V. J., Soole, K. L., e Ford, C. M. (2009). Ascorbate metabolism and the developmental demand for tartaric and oxalic acids in ripening grape berries. *BMC Plant Biology*, v.9, p.145.
- Meyer, E. H., Tomaz, T., Carroll, A. J., Estavillo, G., Delannoy, E., Tanz, S. K., e Millar, A. H. (2009). Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses *Arabidopsis* germination and growth and alters control of metabolism at night. *Plant Physiology*, v.151, p.603-619.
- Millar, A. H., Eubel, H., Jansch, L., Kruff, V., Heazlewood, J. L., e Braun, H. P. (2004). Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Molecular Biology*, v.56, p.77-90.
- 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*, v.133, p.443-447.
- 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*, v.62, p.79-104.
- Misteli, T. (2001). Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science*, v.291, p.843–847.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v.7, p.405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., & Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, v.9, p.490-498.
- Moore, A. L., e Siedow, J. N. (1991). The regulation and nature of the cyanideresistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v.1059, p.121-140.
- Müller, K., Linkies, A., Vreeburg, R. A., Fry, S. C., Krieger-Liszka, A., & Leubner-Metzger, G. (2009). In vivo cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiology*, v.150, p.1855-1865.

- Müller-Moulé, P. (2008). An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. *Plant Molecular Biology*, v.68, p.31-41.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P. L., Niyogi, K. K. (2002). Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology*, v.128, p.970-977.
- Müller-Moulé, P., Golan, T., Niyogi, K. K. (2004). Ascorbate-deficient mutants of *Arabidopsis* grow in high light despite chronic photooxidative stress. *Plant Physiology*, v.134, p.1163–1172.
- Muller-Moule, P.; Conklin, P. L.; Niyogi, K. K. (2002). Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology*, v.128, p. 970 977.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., e Jacquot, J. P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, v.129, p.185-195.
- Nishikimi, M., Fukuyama, R., Minoshima, S., Shimizu, N., e Yagi, K. (1994). Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry*, v.269, p.13685-13688.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J. K., Kubo, Y., Bennett, K. A., Wangjin, L., Bennett, A. B. (2007) Ethylene regulation of fruit softening and cell wall disassembly in Charentais melon. *Journal of Experimental Botany*, v.58, p.1281-1290.
- Noctor, G., De Paepe, R., e Foyer, C. H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, v.12, p.125-134.
- Noctor, G., e Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, v.49, p.249-279.
- Nunes-Nesi, A., Carrari, F., Lytovchenko, A., Smith, A. M., Loureiro, M. E., Ratcliffe, R. G., e Fernie, A. R. (2005). Enhanced photosynthetic performance and growth as a consequence of decreasing mitochondrial malate dehydrogenase activity in transgenic tomato plants. *Plant Physiology*, v.137, p.611-622.
- Ôba, K., Fukui, M., Imai, Y., Iriyama, S., e Nogami, K. (1994). L-Galactono-γ-lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. *Plant and Cell Physiology*, v.35, p.473-478.
- Ôba, K., Ishikawa, S., Nishikawa, M., Mizuno, H., e Yamamoto, T. (1995). Purification and properties of L-galactono-γ-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *Journal of Biochemistry*, v.117, p.120–124.

- Oliveira, M. G., Oliveira, J. G., Gomes Filho, A., Pereira, M. G., Viana, A. P., Souza Filho, G. A., Lopes, G. E. M. (2009). Genetic diversity of Barbados cherry (*Malpighia emarginata* D. C.), with RAPD molecular markers and morpho-agronomical characteristics. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.31, p.162-170.
- Oliveira, M. G., Mazorra, L. M., Souza, A. F., Silva, G. M. C., Correa, S. F., Santos, W. C., Oliveira, J. G. (2015). Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, v.189, p.42-50.
- Østergaard, J., Persiau, G., Davey, M. W., Bauw, G. e Van Montagu, M. (1997) Isolation of a cDNA coding for l-galactono-g-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, p.30009–30016.
- Otter, T., e Polle, A. (1994). The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell wall-associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant and Cell Physiology*, v.35, p.1231-1238.
- Padh, H. (1990). Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and Cell Biology*, v.68, p.1166-1173.
- Papa, S., e Skulachev, V. P. (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Detection of Mitochondrial Diseases*, v.174, p.305-319.
- Parsons, H. T., e Fry, S. C. (2010). Reactive oxygen species-induced release of intracellular ascorbate in plant cell-suspension cultures and evidence for pulsing of net release rate. *New Phytologist*, v.187, p.332-342.
- Parsons, H. T., e Fry, S. C. (2012). Oxidation of dehydroascorbic acid and 2, 3 diketogulonate under plant apoplastic conditions. *Phytochemistry*, v.75, p.41-49.
- Pastori, G. M., Kiddle, G., Antoniw, J., Bernard, S., Veljovic-Jovanovic, S., Verrier, P. J., e Foyer, C. H. (2003). Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *The Plant Cell*, v.15, 939-951.
- Pateraki, I., Sanmartin, M., Kalamaki, M. S., Gerasopoulos, D., e Kanellis, A. K. (2004). Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. *Journal of Experimental Botany*, v.55, p.1623 163.
- Paul, V., Pandey, R., Srivastava, G. C. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene an overview. *Journal of Food Science and Technology*, v.49, p.1-21.

- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniwi, J., e Foyer, C. H. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v.139, 1291-1303.
- Pech, J. C., Bouzayen, M., e Latché, A. (2008). Climacteric fruit ripening: ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Science*, v.175, p.114-120.
- Peiffer, W. E., Ingle, R. T., e Ferguson-Miller, S. (1990). Structurally unique plant cytochrome c oxidase isolated from wheat germ, a rich source of plant mitochondrial enzymes. *Biochemistry*, v.29, p.8696-8701.
- Perotti, V. E., Moreno, A. S., Podestá, F. E. (2014). Physiological aspects of fruit ripening: The mitochondrial connection. *Mitochondrion*, v.17, p.1-6.
- Pignocchi, C., Foyer, C. H. (2003). Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, v.6, p.379-389.
- Pignocchi, C., Kiddle, G., Hernández, I., Foster, S. J., Asensi, A., Taybi, T., e Foyer, C. H. (2006). Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiology*, v.141, p.423-435.
- Pineau, B., Layoune, O., Danon, A., e De Paepe, R. (2008). L-galactono-1, 4 lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*, v.283, p. 32500-32505.
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P., Fanciullino, A. L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F., e Urban, L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, p.12065-12082.
- Ramzan, R., Staniek, K., Kadenbach, B., e Vogt, S. (2010). Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v.1797, p.1672-1680.
- Rasmusson, A. G., e Møller, I. M. (1990). NADP-utilizing enzymes in the matrix of plant mitochondria. *Plant Physiology*, v.94, p.1012-1018.
- Rasmusson, A. G., Heiser, V., Zabaleta, E., Brennicke, A., e Grohmann, L. (1998). Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, v.1364, p.101-111.

- Rassam, M., Laing, W. (2005). Variation in ascorbic acid and oxalate levels in the fruit of *Actinidia chinensis* tissues and genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, p.2322–2326.
- Rautenkranz AAF, Li L, Machler F, Martinoia E, Oertli JJ. (1994). Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel) leaves. *Plant Physiology*, v.106, p.187-193.
- Rayle, D. L., e Cleland, R. E. (1992). The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, v.99, p.1271-1274.
- Reichstein, T., Grussner, A., e Oppenheimer, R. (1933). Synthesis of d-and L-ascorbic acid (vitamin C). *Nature*, v.132, p.280.
- Resende, E. C. O., Martins, P. F., Azevedo, R. A. D., Jacomino, A. P., Bron, I. U. (2012) Oxidative processes during 'Golden' papaya fruit ripening. *Journal of Plant Physiology*, v.24, p.85-94.
- Reuhs, B. L., Glenn, J., Stephens, S. B., Kim, J. S., Christie, D. B., Glushka, J. G., e O'Neill, M. A. (2004). L-Galactose replaces L-fucose in the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II synthesized by the L-fucose-deficient mur1 Arabidopsis mutant. *Planta*, v.219, p.147-157.
- Rodríguez-Roldán, V., García-Heredia, J. M., Navarro, J. A., Hervás, M., De la Cerda, B., Molina-Heredia, F. P., e Miguel, A. (2006). A comparative kinetic analysis of the reactivity of plant, horse, and human respiratory cytochrome c towards cytochrome c oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.346, p.1108-1113.
- Running, J. A., Peng, S., e Rosson, R. A. (2003). The biotechnology of ascorbic acid manufacture. *Vitamin C: Its Functions and Biochemistry in Animals and Plants*, v.49.
- Sanmartin, M., Drogoudi, P. D., Lyons, T., Pateraki, I., Barnes, J., e Kanellis, A. K. (2003). Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta*, v.216, p.918-928.
- Santo-Domingo, J., e Demaurex, N. (2012). The renaissance of mitochondrial pH. *The Journal of General Physiology*, v.139, p.415-423.
- Schertl, P., Sunderhaus, S., Klodmann, J., Grozeff, G. E. G., Bartoli, C. G., e 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*, v.287, p.14412-14419.
- Schonbaum, G. R., Bonner, W. D., Storey, B. T., e Bahr, J. T. (1971). Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids. *Plant Physiology*, v.47, p.124-128.

- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahy, G., e Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, v.214, p.821-828.
- Schweikert, C., Liskay, A., e Schopfer, P. (2000). Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry*, v.53, p.565-570.
- Siendones, E., González-Reyes, J. A., Santos-Ocaña, C., Navas, P., Córdoba, F. (1999). Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiology*, v.120, p.907-912.
- Silva, L. R. A. D., Silva, G. M. C., Silva, W. B., Souza, C. L. M. D., e Oliveira, J. G. D. (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*, v.37, p.296-307.
- Simpson, G. L., e Ortwerth, B. J. (2000). The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v.1501, p.12-24.
- Singh, S. P., Singh, Z., Swinny, E. E. (2012). Climacteric level during fruit ripening influences lipid peroxidation and enzymatic and non-enzymatic antioxidative systems in Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Postharvest Biology and Technology*, v.65, p.22-32.
- Smirnoff, N. (1996). Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, v.78, p.661-669.
- Smirnoff, N. (2000). Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v.355, p.1455-1464.
- Smirnoff, N. (2001). L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitamins & Hormones*, 61, 241-266.
- Smirnoff, N., Running, J. A., e Gatzek, S. (2004). Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways. *Vitamin C: its Functions and Biochemistry in Animals and Plants*, p.7-29.
- Souza, A. F., Silva, W. B., Gonçalves, Y. S., Silva, M. G., e Oliveira, J. G. (2014). Fisiologia do amadurecimento de mamões de variedades comercializadas no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v.36, p.34-44.
- Stuart, R. A. (2008). Supercomplex organization of the oxidative phosphorylation enzymes in yeast mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.40, p.411-417.

- Sun, W. H., Duan, M., Shu, D. F., Yang, S., e Meng, Q. W. (2010). Over-expression of StAPX in tobacco improves seed germination and increases early seedling tolerance to salinity and osmotic stresses. *Plant Cell Reports*, v.29, p.917-926.
- Suzuki, Y., e Ogiso, K. (1973). Development of Ascorbate Oxidase Activity and Its Iso-enzyme Pattern in the Roots of Pea Seedlings. *Physiologia Plantarum*, v.29, p.169-172.
- Sweetlove, L. J., Beard, K. F., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., e Ratcliffe, R. G. (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science*, v.15, p.462-470.
- Szarka, A., Bánhegyi, G., Asard, H. (2013). The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.19, p.1036-1044.
- Szarka, A., Horemans, N., Bánhegyi, G., e Asard, H. (2004). Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.428, p.73-80.
- Szarka, A., Horemans, N., Kovács, Z., Gróf, P., Mayer, M., e Bánhegyi, G. (2007). Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiologia Plantarum*, v.129, p.225-232.
- Szarka, A., Tomasskovics, B., e Bánhegyi, G. (2012). The ascorbate-glutathione- $\alpha$ -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, v.13, p.4458-4483.
- Szent-Györgyi, A. (1931). On the function of hexuronic acid in the respiration of the cabbage leaf. *Journal Biology Chemical*, v.90, p.385-393.
- Tabata, K., Ôba, K., Suzuki, K., e Esaka, M. (2001). Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. *The Plant Journal*, v.27, p.139-148.
- Takahama, U. (1993). Redox state of ascorbic acid in the apoplast of stems of *Kalanchoë daigremontiana*. *Physiologia Plantarum*, v.89, p.791-798.
- Talla, S., Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Sunil, B., Rajsheel, P., e Raghavendra, A. S. (2011). Ascorbic acid is a key participant during the interactions between chloroplasts and mitochondria to optimize photosynthesis and protect against photo inhibition. *Journal of Biosciences*, v.36, p.163-173.
- Tedone, L., Hancock, R. D., Alberino, S., Haupt, S., & Viola, R. (2004). Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology*, v.4, p.16.

- Tokunaga, T., Miyahara, K., Tabata, K., e Esaka, M. (2005). Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. *Planta*, v.220, p.854-863.
- Umbach, A. L., Fiorani, F., e Siedow, J. N. (2005). Characterization of transformed *Arabidopsis* with altered alternative oxidase levels and analysis of effects on reactive oxygen species in tissue. *Plant Physiology*, v.139, p.1806-1820.
- Unseld, M., Marienfeld, J. R., Brandt, P., e Brennicke, A. (1997). The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924. *Nat genet*, v.15, p.57-61.
- Upadhyaya, C. P., Akula, N., Kim, H. S., Jeon, J. H., Ho, O. M., Chun, S. C., e Park, S. W. (2011). Biochemical analysis of enhanced tolerance in transgenic potato plants overexpressing D-galacturonic acid reductase gene in response to various abiotic stresses. *Molecular Breeding*, v.28, p.105-115.
- Vacca, R. A.; Pinto, M. C.; Valenti, D.; Passarella, S.; Marra, E.; Gara, L. (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco brightlyyellow 2 cells. *Plant Physiology*, v.134, p. 1100–1112.
- Valkon, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v.39, p. 44-84.
- Van Dongen, J. T., Gupta, K. J., Ramírez-Aguilar, S. J., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. (2011). Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology*, v.168, p.1434-1443.
- Vanlerberghe, G. C., Robson, C. A., e Yip, J. Y. (2002). Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiology*, v.129, p.1829-1842.
- Vanlerberghe, G. C., Vanlerberghe, A. E., e McIntosh, L. (1997). Molecular genetic evidence of the ability of alternative oxidase to support respiratory carbon metabolism. *Plant physiology*, v.113, p.657-661.

- Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Yu, J. W., Hemavathi, A., Kim, D. H., Strasser, R. J., Park, S. W. (2012). Chlorophyll a fluorescence transient analysis of transgenic potato overexpressing D-galacturonic acid reductase gene for salinity stress tolerance. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, v.53, p.320-328.
- Vonck, J., e Schäfer, E. (2009). Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v.1793, p.117-124.
- Wang W., Vinocur B., Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, v. 218, p.1–14.
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., e Fuchigami, L. (2006). Transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) overexpressing cAPX exhibits enhanced tolerance to UV-B and heat stress. *Journal Applied Horticulturae*, v.8, p.87-90.
- Wang, Y., Wisniewski, M., Meilan, R., Cui, M., Webb, R., e Fuchigami, L. (2005). Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.130, p.167-173.
- Watanabe, K., Suzuki, K., e Kitamura, S. (2006). Characterization of a GDP-d-mannose 3", 5 "-epimerase from rice. *Phytochemistry*, v.67, p.338-346.
- Waugh, W. A., e King, C. G. (1932). Isolation and identification of vitamin C. *Journal Biology Chemical*, v.97, p.325-331.
- Wetermann, B.; Prokisc, H. (2002). Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal Genet Biology*, v. 36, p.91-97.
- Wheeler, G. L., Jones, M. A., e Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, v.393, p.365-369.
- Whelan, J., Millar, A. H., e Day, D. A. (1996). The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta*, v.198, p.197-201.
- Wolucka, B. A., e 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*, v.278, p.47483-47490.
- Wolucka, B. A., e Van Montagu, M. (2007). The VTC2 cycle and the de novo biosynthesis pathways for vitamin C in plants: an opinion. *Phytochemistry*, v.68, p.2602-2613.
- Wolucka, B. A., Goossens, A., e Inzé, D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, v. 56, p.2527-2538.

- Xu, F., Yuan, S., Zhang, D. W., Lv, X., e Lin, H. H. (2012). The role of alternative oxidase in tomato fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*, v.63, p.5705-5716.
- Yabuta, Y., Yoshimura, K., Takeda, T., e Shigeoka, S. (2000). Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant and Cell Physiology*, v.41, p.666-675.
- Yang, S. F. (1974). The biochemistry of ethylene: biogenesis and metabolism. *The Chemistry and Biochemistry of Plant Hormones. Recent Advances in Phytochemistry*, v.7, p.131-164.
- Zhang, C., Liu, J., Zhang, Y., Cai, X., Gong, P., Zhang, J., e Ye, Z. (2011). Overexpression of SIGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Reports*, v.30, p.389-398.
- Zhang, L., Wang, Z., Xia, Y., Kai, G., Chen, W., e Tang, K. (2007). Metabolic engineering of plant L-ascorbic acid biosynthesis: Recent trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.27, p.173-182.
- Zheng, Y., Lyons, T., Ollerenshaw, J. H., e Barnes, J. D. (2000). Ascorbate in the leaf apoplast is a factor mediating ozone resistance in *Plantago major*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.38, p.403-411.
- Zsigmond, L., Tomasskovics, B., Deák, V., Rigó, G., Szabados, L., Bánhegyi, G., e 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*, v.49, p.809-815.