

**METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SUA INTER-RELAÇÃO
COM A CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS
MITOCONDRIAIS EM PLANTAS**

ISABELLE FARIA MATOS

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2021**

**METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SUA INTER-RELAÇÃO
COM A CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS
MITOCONDRIAIS EM PLANTAS**

ISABELLE FARIA MATOS

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

Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M433 Matos, Isabelle Faria.

Metabolismo do ácido ascórbico e sua inter-relação com a cadeia transportadora de elétrons mitocondriais em plantas / Isabelle Faria Matos. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.

86 f. : il.
Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.
Orientador: Jurandi Goncalves de Oliveira.

1. Antioxidante. 2. Galactono-1,4-lactona desidrogenase. 3. Ascorbato Peroxidase. 4. ERO. 5. Respiração. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

METABOLISMO DO ÁCIDO ASCÓRBICO E SUA INTER-RELAÇÃO COM A CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS MITOCONDRIAIS EM PLANTAS

ISABELLE FARIA MATOS

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

Aprovada em 07 de Março de 2021

Comissão Examinadora:



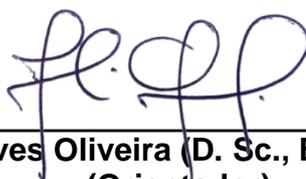
Dr^a. Mara de Menezes de Assis Gomes (D. Sc., Biologia Vegetal) – UENF



Dr^a. Maria Cristina Canela Gazotti (D. Sc., Ciência) – UENF



Dr. Diederson Bortolini Santana (D. Sc., Produção Vegetal)



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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense e ao programa de pós-graduação em Produção Vegetal pela oportunidade e toda a infraestrutura para que eu pudesse cursar o mestrado;

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa durante todo o período do curso;

Ao meu orientador Jurandi por todo o aprendizado, apoio, paciência, compreensão e confiança;

Aos meus familiares pelo apoio incondicional e incentivo para cursar uma pós-graduação;

Aos meus colegas de laboratório e de Universidade por toda a ajuda e apoio durante o meu mestrado;

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse concluir o meu trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. ÁCIDO ASCÓRBICO NO METABOLISMO VEGETAL	3
2.1 Descoberta do AA.....	3
2.2 Química da molécula do AA nas células vegetais.....	4
2.3 Papel do AA no metabolismo das células vegetais	6
2.3.1 Atividade antioxidante do AA em culturas de interesse.....	12
3. SÍNTESE, RECICLAGEM E TRANSPORTE DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM PLANTAS	15
3.1 Biossíntese do AA	15
3.1.1 Rota Principal	19
3.1.2 Outras Rotas de Biossíntese	22
3.2 Reciclagem de AA	23
3.3 Transporte de AA.....	26
4. RELAÇÃO ENTRE AA E A CTE _m EM PLANTAS.....	30
4.1 Respiração e a CTE _m	30
4.2 Componentes da CTE _m e estruturas acopladas à mesma	31

4.2.1 Complexo I	35
4.2.2 Complexo II	36
4.2.3 Complexo III	36
4.2.4 Complexo IV	36
4.2.5 Citocromo c	37
4.2.6 Vias alternativas na CTE _m	38
4.2.6.1 NADP(H) desidrogenases.....	38
4.2.6.2 Oxidase alternativa	39
4.2 O AA na CTE _m	40
4.2.1 Atividade da GalLDH e sua interação com a CTE _m	40
4.2.2 Produção de ERO e os mecanismos antioxidantes envolvendo AA.....	47
4.2.2.1 Detoxificação de ERO envolvendo AA na mitocôndria.....	50
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo com as estruturas químicas e reações químicas envolvendo o ácido ascórbico, ascorbato, ácido monodehidroascórbico e ácido dehidroascórbico com indicativo das perdas e ganhos de elétrons e prótons, bem como a hidrólise espontânea de DHA.....5

Figura 2: Possíveis rotas para a biossíntese de AA em plantas. Nas extremidades das setas se encontram as moléculas intermediárias durante o processo de síntese. Ao lado das setas, segue o nome de cada enzima responsável por determinada etapa, indicando ainda o seu precursor e produto final nas extremidades das setas. Sendo que para as enzimas, em preto se encontram as enzimas já conhecidas e em cinza as enzimas ainda a serem descobertas. Enzimas sublinhadas são consideradas pontos regulatórios da via de biossíntese. Reações reversíveis se apresentam em setas com pontas duplas. Cada cor de seta representa uma determinada rota proposta. Em verde, a via principal para a síntese de AA, ou chamada rota D-manose/L-galactose, ou ainda via Smirnoff-Wheller. Em vermelho, segue a via alternativa proposta de L-gulose. Em azul, a rota proposta para a síntese de AA a partir da molécula de mio-inosito. E, em laranja segue a via do ácido L-galacturonato.....18

Figura 3: Esquema do ciclo ascorbato-glutationa, indicando as etapas enzimáticas e transformações não enzimáticas, com indicações para os substratos

necessários para a reação enzimática acontecer. As setas indicam o sentido da reação. As enzimas estão representadas pelos balões com suas siglas. GR:Glutathione redutase; DHAR:Dehidroascorbato redutase; MDHAR:Monodehidroascorbato redutase; APX:Ascorbato peroxidase.....25

Figura 4: Esquema ilustrativo do transporte de elétrons e prótons na CTE. As setas pretas pontilhadas indicam os caminhos do transporte de elétrons dentro da cadeia transportadora, enquanto que as setas marrons representam o local do bombeamento de prótons que ocorre da matriz para o espaço intermembranar mitocondrial. No presente esquema a localização e a atuação da enzima GalLDH são indicadas pela forma enovelada em azul. Em verde estão os complexos da CTE indicados pelos números romanos correspondendo aos complexos I-IV. A AOX está representada em rosa, enquanto que pool de ubiquinona e o citocromo c estão representados em laranja e verde-água, respectivamente. I:NADH-ubiquinona oxidorreductase. II:succinato-ubiquinona oxidorreductase. III:ubiquinol-citocromo c oxidorreductase. IV:citocromo c oxidase (COX). V:ATP-sintase. AOX:oxidase alternativa; UQ:pool de ubiquinona. Cyt c:Citocromo C. H⁺:prótons. e:elétrons.....44

Figura 5: Reações químicas de geração de radicais ERO mais reativos: (i) Reação de Fenton que ocorre em duas etapas entre íons de ferro e ERO, levando a geração de radicais hidroxila. (ii) Reação Haber-Weiss, que ocorre em uma única etapa utilizando-se de dois tipos de ERO menos reativos para formar ERO mais reativos. Em preto se encontram as moléculas de ERO e em vermelho os íons metálicos necessários para a reação ocorrer. Enquanto que em azul está representado o produto não reativo, a molécula de oxigênio. O₂^{•-}: radical superóxido. H₂O₂: peróxido de hidrogênio. HO[•]:radical hidroxila ; OH⁻: hidroxila ; Fe³⁺: íon férrico; Fe²⁺: íon ferroso; O₂: oxigênio.....48

Figura 6: Reações químicas que acontecem entre ERO e o AA, de modo a formar peróxido de hidrogênio, ERO menos reativo, como nas reações (A) e (B). Na reação (C) se encontra a redução completa de H₂O₂ pelo AA. Em preto estão as moléculas de ERO, e em laranja estão as moléculas de AA, ou relacionada à mesma, como formas reduzidas e oxidadas. Em verde, os prótons necessários para a equação. E, em azul está representado a água que é formada como

subproduto. $O_2^{\cdot-}$: radical superóxido. AA: Ácido ascórbico. Asc: ascorbato.
H⁺:próton. H₂O₂:peróxido de hidrogênio. MDHA:ácido monodehidroascórbico.
DHA:ácido dehidroascórbico. H₂O:água.....50

LISTA DE ABREVIATURAS

AA: Ácido ascórbico

ABA: Ácido abscísico

ACC: Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano

ADP: Adenosina difosfato

AOX: Oxidase alternativa

APX: Ascorbato peroxidase

ATP: Adenosina trifosfato

CAT: Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

COX: Citocromo c oxidase ou Complexo IV

CTEm: Cadeia transportadora de elétrons mitocondriais

Cyt c: Citocromo c

DHA: Ácido dehidroascórbico

DHAR: Dehidroascorbato redutase

ERO: Espécies reativas de oxigênio

FAD: Flavina adenina dinucleotídeo

FADH₂: Forma reduzida da Flavina adenina dinucleotídeo

GA: Giberelina

GalDH: L-galactose desidrogenase

Gall: L-galactono-1,4-lactona

GalLDH: L-galactono-1,4-lactona desidrogenase

GulL: L-gulono-1,4-lactona

GGF: GDP-L-galactose fosforilase

GFF: GDP-L-galactose fosforilase

GME: GDP-D-manose-3'-5'-epimerase

GMP: GDP-D-manose pirofosforilase

GPP: L-galactose 1-fosfato fosfatase

GR: Glutationa redutase

GSH: Glutationa

GSSG: Glutationa reduzida

IAA: Ácido indolacético

MDHA: Ácido monodehidroascorbato

MDHAR: Monodehidroascorbato redutase

NAD: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH: Forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo

FMI: Fosfomanose isomerase

FMM: Fosfomanose mutase

UcP: Proteína desacopladora

UQ: Ubiquinona

UQH₂: Uniquinol

VAO: Álcool vanílico oxidases

VDE: Violaxantina de-epoxidase

RESUMO

MATOS, Isabelle Faria. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2021. Metabolismo do ácido ascórbico e sua inter-relação com a cadeia transportadora de elétrons mitocondriais em plantas. Orientador: Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

O ácido ascórbico (AA) é uma molécula muito importante para o metabolismo celular. Nas plantas, o mesmo se faz presente na maioria das etapas de desenvolvimento, sendo importante desde a germinação de sementes até o prolongamento da vida útil dos frutos. Devido à sua grande importância, diversos estudos foram realizados no intuito de revelar sua função e papel nos organismos vegetais, sendo estudado desde sua síntese, transporte e ciclagem a sua ação em diversas organelas e atividades metabólicas. Na biossíntese do AA a última etapa acontece no interior das mitocôndrias pela ação da enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) ligada à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (CTEm), parte fundamental do processo respiratório que acontece no interior das mitocôndrias. A enzima GalLDH está associada física e funcionalmente ao complexo I da CTEm participando da oxidação do galactono-1,4-lactono (GalL) a AA concomitantemente à redução do citocromo c. Assim sendo, a síntese de AA se correlaciona com o metabolismo respiratório nas plantas. Considerando as mitocôndrias como um centro gerador de energia, um

subproduto desta produção de ATP pela ação da CTE_m são as espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas moléculas que possuem um potencial danoso são capazes de oxidar aminoácidos, lipídios e interagir com diversas estruturas celulares. O AA como uma molécula antioxidante é capaz de impedir que ERO sejam formados em formas mais danosas, e até mesmo eliminar sua produção. Além disso, o AA atua como um cofator para enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidase (APX), que é uma das principais enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante e é capaz de reduzir H₂O₂ à água. Sabendo disso, é possível hipotetizar que o AA apresenta um papel muito mais relevante para o metabolismo respiratório do que se pode pensar em uma visão mais simplista. Impactando no fluxo de elétrons da CTE_m, na produção de H₂O₂ e na detoxificação deste, o AA apresenta-se como uma molécula essencial ao metabolismo vegetal. Apesar dessa hipótese, poucos artigos exploram essa inter-relação entre o AA e a CTE_m. Desse modo, foi elaborado uma revisão de literatura sobre o assunto, explicando o metabolismo do AA e também da CTE_m, bem como a ligação entre os mesmos. Assim, é explorada a ligação estrutural entre a GalLDH e o complexo I e o citocromo C, bem como o impacto que a oxidase alternativa (AOX) apresenta sobre a enzima. Por fim, o papel do AA na detoxificação de ERO produzidas pela CTE_m também foi comentado. Porém, estudos futuros são necessários para compreender melhor o papel da enzima GalLDH para a geração de H₂O₂ e qual a importância que esta enzima apresenta para o metabolismo vegetal.

ABSTRACT

MATOS, Isabelle Faria. State University of the North of Rio de Janeiro Darcy Ribeiro. March 2021. Ascorbic acid metabolism and its interrelation with a mitochondrial electron transport chain in plants. Advisor: Jurandi Gonçalves de Oliveira

Ascorbic acid (AA) is a very important molecule for cell metabolism. In plants, it is present in most stages of development, being important from the germination of seeds to the prolongation of the useful life of the fruits. Due to its great importance, several studies were carried out in order to reveal its function and role in plant organisms, being studied from its synthesis, transport and cycling to its action in various organelles and metabolic activities. In the AA biosynthesis, the last step takes place inside the mitochondria by the action of the enzyme L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) linked to the mitochondrial electron transport chain (ETC_m), a fundamental part of the respiratory process that takes place inside the mitochondria. The enzyme GalLDH is physically and functionally associated with CTE_m complex I participating in the oxidation of galactone-1,4-lactone (GalL) to AA concomitantly with the reduction of cytochrome c. Therefore, AA synthesis is correlated with respiratory metabolism in plants. Considering the mitochondria as an energy generating center, a by-product of this ATP production by the action of CTE_m is the reactive oxygen species (ROS). These molecules

that have a harmful potential are capable of oxidizing amino acids, lipids and interacting with different cell structures. AA as an antioxidant molecule is able to prevent ROS from being formed in more harmful forms, and even eliminate its production. In addition, AA acts as a cofactor for antioxidant enzymes such as ascorbate peroxidase (APX), which is one of the main enzymes involved in antioxidant metabolism and is capable of reducing H_2O_2 to water. Knowing this, it is possible to hypothesize that AA has a much more relevant role for respiratory metabolism than one can think of in a more simplistic view. Impacting the electron flow of CTE_m, the production of H_2O_2 and its detoxification, AA presents itself as an essential molecule for plant metabolism. Despite this hypothesis, few articles explore this interrelationship between AA and CTE_m. Thus, a literature review on the subject was prepared, explaining the metabolism of AA and also of CTE_m as well as the link between them. Thus, the structural link between GalLDH and complex I and cytochrome C is explored, as well as the impact that alternative oxidase (AOX) has on the enzyme. Finally, the role of AA in the detoxification of ROS produced by CTE_m was also commented. However, future studies are needed to better understand the role of the GalLDH enzyme in the generation of H_2O_2 and the importance that this enzyme has for plant metabolism.

1. INTRODUÇÃO

O L-ácido ascórbico (AA) é um importante antioxidante presente nas plantas. Com diversas funções além de capturar elétrons e proteger a célula das espécies reativas de oxigênio (ERO), ele também atua como cofator de diversas enzimas envolvidas em processos do metabolismo vegetal, como o ciclo celular, na assimilação de Fe, na proteção contra herbivoria em algumas espécies vegetais, assim como na atividade fotossintética (SMIRNOFF, 2018). Desse modo, no vegetal, o AA apresenta uma ampla influência e efeito (GALLIE, 2013a).

O AA se correlaciona com a síntese de giberelinas, de etileno, ativa outros antioxidantes, se relaciona com a respiração celular e atua protegendo a planta de danos provocados pela luz ao proteger o fotossistema II. Ele também é responsável pelo crescimento e alongamento celular, homeostase hormonal, florescimento e senescência, proteção contra fatores bióticos como ataque de insetos e fungos e ainda contra fatores abióticos como altas temperaturas, alta luminosidade, ozônio e radiação (BILSKA et al., 2019; SZARKA et al. 2013).

Com tantas funções, pode-se perceber que o AA é uma molécula essencial para o vegetal. Por isso, muitos estudos buscaram compreender melhor sobre o metabolismo da molécula, o que revelou que a síntese de AA acontece em parte no citosol e a etapa final nas mitocôndrias. Este último passo da síntese do AA que acontece dentro das mitocôndrias tem a participação de uma enzima intimamente associada ao complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTEm), utilizando o citocromo c como um acceptor de elétrons

durante a transformação final do precursor galactono-1,4-lactona (GalL) em AA (FENECH et al., 2019).

Essa enzima chamada L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) é a principal responsável pela síntese de AA no interior das mitocôndrias. Além de utilizar o citocromo C como acceptor de elétrons, a GalLDH se encontra estruturalmente ligada ao complexo I.

Assim, é possível inferir que o AA e a CTEM possuem uma ligação fundamental, desde a síntese do antioxidante e a atividade da CTEM. Além da participação na síntese do AA, a CTEM também se correlaciona com este antioxidante devido aos mecanismos de regeneração do AA. Outro ponto importante a ser considerado quando se discute a síntese e atividade do AA é de que a mitocôndria é um dos principais geradores de ERO sendo, portanto, um grande alvo para a atividade antioxidante do AA. Logo, a CTEM e o AA possuem uma interrelação intensa e conhecida (FOYER et al. 2020). Porém, mesmo com a produção de AA pela GalLDH na mitocôndria, apresentando o AA para a detoxificação de ERO, a mesma também produz H_2O_2 , tendo, portanto, um papel antagônico na detoxificação na mitocôndrias (SANTANA, 2019).

Apesar de tais informações, poucos trabalhos exploram mais aprofundamente sobre a ligação entre a CTEM e o AA. Esse trabalho através de uma revisão de literatura apresenta o estado da arte a respeito do AA em plantas, no que diz respeito a síntese, ação, transporte e ciclagem do AA, além das interações entre o metabolismo do AA e o metabolismo respiratório, com foco na CTEM.

2. ÁCIDO ASCÓRBICO NO METABOLISMO VEGETAL

2.1 Descoberta do AA

Isolado pela primeira vez em 1932, o AA ficou primeiramente conhecido devido ao seu uso para combater o escorbuto, doença muito comum na antiguidade, principalmente em viajantes e navegadores que não consumiam alimentos ricos neste composto, como, por exemplo, as frutas cítricas, em sua alimentação (SVIRBELY; SZENT-GYÖRGYI, 1932). O escorbuto é uma doença causada pela falta de vitamina C no organismo, os sintomas aparecem em questão de semanas e a doença pode levar até a morte do indivíduo. A vitamina C foi nomeada de ácido ascórbico pelo seu papel no tratamento da doença, sendo que a palavra ácido do seu nome é devido às características físico-químicas da molécula, e o nome ascórbico é derivado do prefixo “a” (no sentido de negação) e a palavra em latim scorbüticus (o que significa escorbuto).

Com o isolamento da molécula e posteriormente a descoberta da sua fórmula química, em 1933, foi possível sintetizar quimicamente o AA de modo a se utilizar na saúde humana (HAWORTH, 1933). Nos dias atuais, o AA sintético é produzido a partir do açúcar dextrose ($C_6H_{12}O_6$). Este, a partir de uma reação de oxidação que promove a perda de 4 moléculas de hidrogênio resulta na formação do AA sintético. O AA sintético apresenta pouca diferença do AA natural, porém sua

ação no metabolismo humano e animal pode apresentar diferenças, tendo em vista que o AA presente em frutas e vegetais vem acompanhado de outras moléculas importantes ao metabolismo que interagem com o AA, tornando mais prontamente absorvível (CARR; VISSERS, 2013).

Devido à necessidade humana de se adquirir a vitamina C através do consumo de alimentos de origem vegetal, diversos estudos buscaram estimular a produção de AA pelos tecidos vegetais, bem como compreender os mecanismos de regulação e fatores bióticos e abióticos que possam influenciar na síntese, degradação e transporte de AA nos tecidos vegetais (FIUTAK; MICHALCZYK, 2020; OZCELIK et al., 2020; FENECH et al., 2019; IQBAL et al., 2017).

2.2 Química da molécula do AA nas células vegetais

O AA, ou vitamina C, é uma molécula orgânica composta de 6 carbonos, com fórmula química $C_6H_8O_6$, sendo nomeada quimicamente como 2-oxi-L-treohexônio-1,4-lactona-2,3-enedio, ou como L-treo-hex-2-enono-1,4-lactona. A molécula é considerada solúvel em água, pouco solúvel em acetona ou etanol e insolúvel em solventes orgânicos como benzeno, sendo que quando se encontra em solução o AA é facilmente oxidado. Ele é classificado no grupo das lactonas, originário dos ácidos carboxílicos que se modificam em ésteres de cadeia fechada ao perderem uma molécula de H_2O

Em relação à estrutura química da molécula, o AA pode ser encontrado em sua forma ionizada, como ascorbato (Asc), ou em sua forma oxidada, L-ácido dehidroascórbico (DHA). Ele ainda possui uma forma instável, como ácido monodehidroascórbico (MDHA), forma intermediária no processo de oxidação do AA em DHA (Figura 1). O DHA também pode ser convertido através de uma reação irreversível com a perda de uma molécula de H_2O , em ácido 2,3-dicetogulônico.

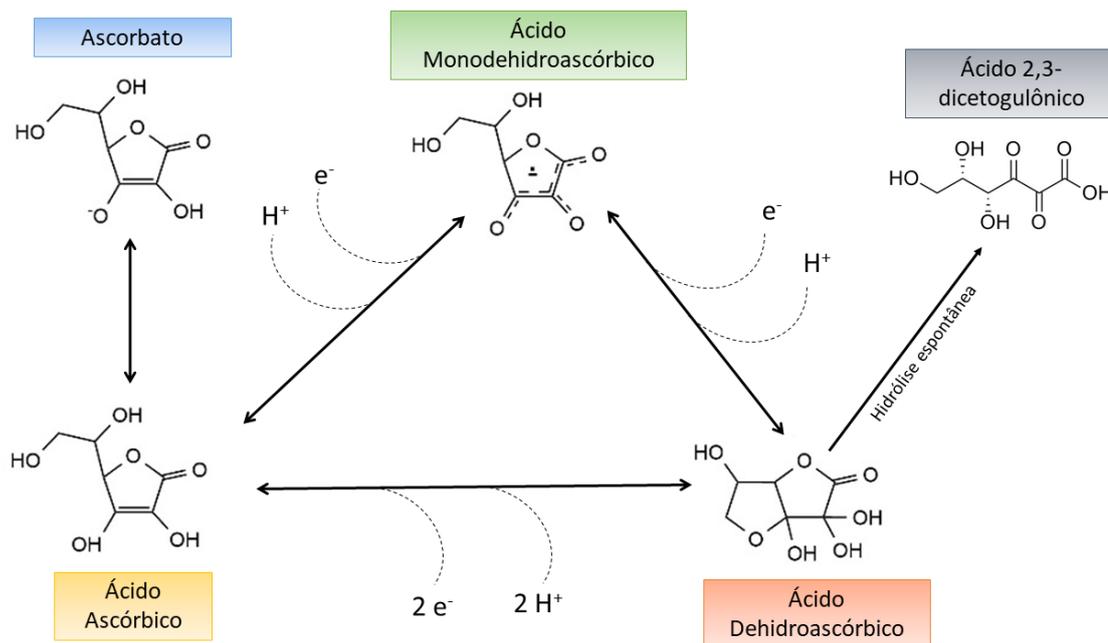


Figura 1: Esquema representativo com as estruturas químicas e reações químicas envolvendo o ácido ascórbico, ascorbato, ácido monodehidroascórbico e ácido dehidroascórbico com indicativo das perdas e ganhos de elétrons e prótons, bem como a hidrólise espontânea de DHA.

Para os níveis de atividade antioxidante das moléculas, o AA se apresenta como a forma totalmente ativa e o DHA possui entre 75-80% da capacidade antioxidante em comparação com o AA. As duas formas se encontram presentes no tecido vegetal, de modo que para a quantificação total do nível de vitamina C deve-se quantificar tanto o AA como o DHA, havendo a predominância da forma AA. Já o ácido 2,3-dicetogulônico não apresenta atividade oxidante, mas pode ser descarboxilada em substratos intermediários para a via pentose-fosfato caso seja necessário para o metabolismo vegetal (NJUS et al., 2020; SMIRNOFF et al. 2001; SVIRBELY; SZENT-GYÖRGYI, 1932).

O DHA é enzimaticamente convertido em AA, com a participação da glutatona reduzida e do NADPH ou ainda, a molécula pode ser metabolizada e convertida em outros substratos celulares como oxalato e treonato (TRUFFAULT et al., 2017), ou mesmo em CO_2 e H_2O_2 (SMIRNOFF, 2018). Por outro lado, o MDHA é a forma instável, pois apresenta um elétron a menos que o DHA, tendo assim um elétron desemparelhado na sua estrutura. O mesmo encontra-se no meio celular em menor quantidade, sendo uma molécula de baixa toxicidade e com alta reatividade devido ao seu radical livre. Logo, duas moléculas de MDHA podem

dar origem, espontaneamente, a uma molécula de DHA e uma de AA (HOSSAIN; ASADA, 1985).

2.3 Papel do AA no metabolismo das células vegetais

O AA é conhecido como um importante antioxidante na célula, sendo uma molécula capaz de doar elétrons e assim reduzir ERO e outras moléculas danosas ao metabolismo celular tais como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (HO^{\bullet}), protegendo membranas e diminuindo a peroxidação lipídica (NJUS et al., 2020; GUPTA et al., 2016; SZARKA et al., 2012). Devido à sua afinidade e atividade, o AA consegue reduzir ERO antes do metabolismo ser capaz de induzir a atividade das enzimas antioxidantes, como catalase ou superóxido dismutase, protegendo a célula de modo rápido e eficiente (PACIOLLA et al., 2019). Com uma alta atividade oxidante, o AA está, portanto, diretamente ligado à proteção da planta contra estresses bióticos e abióticos que geram um estresse oxidativo ao vegetal (AKRAM et al., 2017).

A relação entre AA e a luz já é conhecida e bastante estudada. O AA está envolvido com a atividade fotossintética, além de sua síntese ser estimulada em presença de uma maior intensidade luminosa (MASSOT et al., 2011; LI et al., 2010b; TABATA et al., 2002). O AA é capaz de doar elétrons para a cadeia transportadora de elétrons fotossintética, em condições de estresse para o vegetal, principalmente quando há a inibição do fotossistema II (PSII). Assim, nessas condições, o AA doa elétrons a cadeia dando suporte para o funcionamento da mesma e a produção de ATP (IVANOV, 2014; TÓTH et al., 2011).

Estudos preliminares em tilacoides isolados observaram a capacidade do AA como doador de elétrons quando o complexo de oxidação da água do PSII se encontrava destruído ou em tilacoides lavados com TRIS (MANO et al., 2004; YAMASHITA; BUTLER, 1968; YAMASHITA; HORIO, 1968). Já estudos com células de folhas de trigo determinaram que em condições normais, o mesmo apresenta uma maior afinidade em doar elétrons ao PSII em comparação ao fotossistema I (PSI) (IVANOV et al., 2007; IVANOV et al., 2005).

Utilizando de tilacoides isolados de folha de espinafre, foi demonstrado a doação de elétrons do AA para o PSI na presença do herbicida Diuron, o qual age inibindo a fotorredução de NADP⁺ (IVANOV, 2014). Já em plantas in vivo, o fenômeno foi observado em plantas selvagens e mutantes *vtc2* de *Arabidopsis*, as últimas sendo deficientes para AA. Em condições de altas temperaturas, foi demonstrado a ação do AA como um doador de elétrons para o PSII (TÓTH et al., 2011; 2009; 2007).

O AA atua ainda como cofator enzimático na atividade da enzima violaxantina de-epoxidase (VDE) do ciclo da violaxantina-zeaxantina (AWAD et al., 2015; ASADA, 1999). A enzima VDE participa da conversão de violaxantina em zeaxantina no complexo antena do fotossistema II do aparelho fotossintético. A zeaxantina é um pigmento acessório responsável por dissipar, de forma mais eficiente, o excesso de energia luminosa na forma de calor, evitando assim a fotoinibição causada pelo estresse luminoso (SAGA et al., 2010). Considerando a capacidade do AA em diminuir o dano causado por ERO nos cloroplastos, preservando o funcionamento dos fotossistemas e muitas vezes, retardando a senescência foliar, o papel do AA no metabolismo vegetal vai muito além da sua função antioxidante (BARTH et al., 2006; CHEN; GALLIE, 2006).

O AA é capaz de agir como cofator para várias enzimas importantes no metabolismo vegetal. Uma delas é a enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico oxidase (ACO) (VERVERIDIS; JOHN, 1991). A ACC faz parte da via de síntese do etileno, atuando na última etapa do processo de formação deste hormônio. Dessa forma, o AA se relaciona com o amadurecimento dos frutos e até a senescência foliar devido à sua participação na via de síntese do etileno (MURPHY et al., 2014).

O AA também age como cofator de uma classe de enzimas chamadas deoxigenases dependentes de 2-oxoglutarato. Essas enzimas se encontram espalhadas por todo o metabolismo e são responsáveis por catalisar a incorporação de oxigênio em substratos orgânicos (ARRIGONI; DE TULLIO, 2002). Entre as reações em que essas enzimas participam têm-se o catabolismo de auxina e a síntese de outros hormônios tais como giberelina (GA) e ácido abscísico (ABA) (SMIRNOFF, 2018).

O AA tem também um importante papel na proteção da planta contra a herbívora, através da sua participação na via de síntese do glicosinolato e antocianinas. Esses importantes compostos secundários estão envolvidos na proteção de algumas espécies vegetais (p.ex. espécies da família crucífera) contra ataques de herbívoros. Tendo em vista que a proteção contra patógenos necrotróficos é mediada pela ação de etileno e ácido jasmônico, a depender do tipo de patógeno, o AA também se correlaciona com o sistema defensivo da planta por estar envolvido com o metabolismo hormonal do etileno que desencadeia a resposta de proteção do vegetal (AKRAM et al., 2017; BORESTEIN, 2017).

Ainda sobre as diversas funções do AA, o mesmo apresenta uma importante função na atividade celular estando presente na fase G1 do ciclo celular, encurtando a fase G1 e estimulando a passagem da célula para a fase S do ciclo celular (DE PINTO et al., 1999). Desse modo, o AA é essencial para a divisão e multiplicação celular, bem como no alongamento e diferenciação das células. Além disso, os níveis de AA diminuem durante a diferenciação celular, estimulando a ação de peroxidases e a lignificação da parede celular (DE PINTO; DE GARA, 2004; PADU, 1999).

Estudo com embriões somáticos de pinheiro indicaram que os níveis de AA endógenos são fundamentais para ativação e germinação do tecido meristemático e ainda, altas doses de AA se fazem necessárias para induzir a inibição de peroxidases como o ácido ferúlico. Assim, com a ação do AA sobre as peroxidases responsáveis pela polimerização dos componentes da parede celular é possível que o relaxamento da parede ocorra, o que é necessário para a divisão celular das células meristemáticas (STASOLLA; YEUNG, 2007). Ainda no metabolismo celular, o AA se correlaciona com a morte celular programada, seja induzindo a senescência em plantas ou protegendo a célula de estresses que levariam a morte celular, como em ambientes com níveis tóxicos de cromo (VALANDRO et al., 2020; CAVAIUOLO et al., 2013).

Na presença de cobre, o AA é capaz de gerar H_2O_2 (FRY, 1998). Ao reduzir Cu^{2+} a Cu^+ , o AA induz a degradação dos polissacarídeos da parede celular com geração de HO^\bullet . Esses radicais são responsáveis, então, pelo afrouxamento da parede celular em cotilédones de trigo e hipocótilos de girassol, pepino e soja in

vitro. O mesmo estudo, ainda analisou a produção de hidroxila em plântulas de trigo in vivo, observando a tendência da formação de HO[•] pelo AA na presença de cobre nas plântulas induzidas ao crescimento com a adição de auxina no meio (SCHOPFER, 2001).

De modo geral, AA é capaz de doar elétrons e reduzir íons metálicos tais como ferro e cobre, onde nesse caso, o AA reduz Fe³⁺ em Fe²⁺ e Cu²⁺ em Cu⁺. Já a reoxidação de Fe²⁺ ou Cu⁺ pode gerar íons O₂^{•-} devido à reação de Featon levando a geração de outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio e HO[•]. Porém, a ação do AA na redução dos íons metálicos se faz necessária principalmente se tratando de proteger enzimas metalo-dependentes da inativação. Tais enzimas que contêm Fe²⁺ e Cu⁺ como cofator se tornam inativas quando o íon é reduzido (NJUS et al., 2020; PACIOLLA et al., 2019; MACKNIGHT et al., 2017; ZANCANI et al., 2007; BUETTNER; JURKIEWICZ, 1996).

Na embriogênese da semente, estudos consideram o AA um regulador da polaridade para a divisão celular. Assim, uma maior quantidade de AA promove a divisão transversal do embrião, enquanto um aumento na porção de DHA estimula a divisão longitudinal. Posteriormente, durante o alongamento celular das novas células é necessária uma redução do potencial redox do AA, assim o DHA predomina e favorece o alongamento. Já na etapa de maturação embrionária, a quantidade de AA é novamente o estimulador para progressão da divisão celular (CHEN; GALLIE, 2012; STASOLLA et al., 2008; BELMONTE; YEUNG, 2004; STASOLLA; YEUNG, 2001; TOMMASI et al., 2001;).

O AA ainda participa da etapa de germinação, tendo em vista que o processo de embebição das sementes para germinação leva a formação de metabólitos reativos, assim, é preciso que haja um balanço oxidativo para haver a germinação da semente. Logo, o controle desses ERO é atribuído ao AA (CHEN et al., 2014). Estudos observaram que durante a fase de germinação há um aumento na concentração de AA, bem como da enzima GalLDH, responsável pela última etapa da síntese de AA na mitocôndria, enquanto há uma redução no teor de DHA (DE GARA et al., 2000; TOMMASI et al., 1999).

Outro ponto importante para a germinação é a razão entre ABA e GA (FINKELSTEIN et al., 2008). Esse equilíbrio é influenciado pelo conteúdo de ERO e de AA, de modo que o AA consegue controlar a biossíntese de ABA e GA favorecendo a germinação da semente (YE et al., 2012). O AA também impacta na sensibilidade da ascorbato peroxidase (APX) ao ABA e à auxina (IAA), de modo que mutantes para a APX apresentam uma inibição da germinação, bem como alterações no conteúdo de ABA e IAA, além de uma acumulação de metabólitos do ciclo de Krebs. Isto porque tais mutantes apresentam uma supressão do fator transcricional ABI4, fator indutor de germinação e ativado em resposta a sinais providos por ERO, bem como por ABA e IAA (CHEN et al., 2014a; CHEN et al., 2014b).

O AA também correlaciona com a concentração de íons Fe em embriões. Estudo com embriões de ervilha e *Arabidopsis* demonstrou que o Fe é transportado em conjunto com citrato ou malato em complexos férricos não prontamente absorvíveis. Contudo, os embriões são capazes de reduzir os íons férricos desses complexos induzindo um efluxo de AA. Desse modo, o AA realiza a etapa fundamental para a aquisição de ferro ao reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , tendo em vista que o efluxo de AA pelo apoplasto atua na redução de quelatos de Fe^{3+} permitindo a assimilação de Fe pelas plantas (GRILLET et al., 2014).

Em raízes, o AA se relaciona com o crescimento e a arquitetura radicular além de estar ligado aos mecanismos que promovem o gravitropismo nos mesmos. O AA está no processo de crescimento e desenvolvimento da raiz em função da quantidade deste presente no apoplasto das células (OLMOS et al., 2006). Estudos com plantas de cebola observaram que o AA e o MDHA estimulam o alongamento das raízes e promovem um aumento no tamanho do vacúolo em células meristemáticas, influenciando na divisão e proliferação celular (GONZÁLEZ-REYES et al., 1994; HIDALGO et al., 1989). Já estudos com mutantes de *Arabidopsis* para o AA permitiram observar a ação do AA no comprimento da raiz principal, na quantidade de raízes laterais, e perda de gravitropismo, apresentando raízes curtas, numerosas. Tais características foram desenvolvidas pelo fato de que o AA se faz necessário para a síntese de etileno, o qual afeta a raiz e leva ao desenvolvimento desses sintomas apresentados (TYBURSKI et al., 2012; OLMOS et al., 2006).

Outro processo metabólico com a participação importante do AA é a aquisição de nutrientes. Foi observado que a atividade da enzima MDHA redutase (MDHAR) estimula a aquisição de metais de transição, principalmente cobre e ferro em *Arabidopsis* (GONZÁLEZ-REYES et al., 1994). Em solos com baixa disponibilidade de P, a ação do AA é capaz de promover o alongamento da raiz principal, expandindo a área de absorção de nutrientes. Já em solos com alta disponibilidade de P, a ação do AA é diferente, inibindo a formação de raízes laterais (TYBURSKI et al., 2012). O papel do AA nas raízes é, portanto, antagônico, com altos níveis de AA estimulando o alongamento da raiz principal enquanto a formação de raízes laterais é dependente da ação do estresse oxidativo com baixos níveis de AA (HOSSAIN et al., 2017).

Há relatos também da participação do AA no processo de florescimento através da relação do mesmo com ABA e GA, hormônios envolvidos e atuando como um indutor ou repressor do processo. O AA se faz presente na síntese de GA, impactando na floração. Já sua relação com o ABA e o florescimento ocorre devido à relação de ambos com fatores transcricionais que inibem o processo de florescimento (WENG et al., 2016). Considerando *Arabidopsis* como planta modelo, sabe-se que níveis baixos de AA afetam três das principais vias genéticas para a floração da planta. Em condições de dia longo com exposição à 16 horas de luz, baixos níveis de AA resultam em um florescimento precoce por meio de alterações no ritmo circadiano e pela produção de níveis altos de ácido salicílico. Já em condições de dia curto, com exposição de 10 horas de luz, uma deficiência nos níveis de AA atrasa o florescimento e a senescência (BARTH et al., 2006).

Estudos com mutantes de *Arabidopsis* deficientes e não produtores de AA, apresentaram um florescimento antecipado em comparação com o controle, sendo que após adição de AA exógeno, verificou-se que essas plantas obtiveram um atraso no processo de floração (KOTCHONI et al., 2009). Outra pesquisa observou que a adição de AA exógeno promoveu um atraso no crescimento e florescimento em plantas de *Arabidopsis* cultivadas com um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, após 12 dias, as plantas foram divididas em três grupos, sendo um controle, outro com adição de GalL e um último com adição exógena de GA para induzir um florescimento antecipado. Foi observado que

nessas condições um aumento no conteúdo de Asc, proveniente no tratamento com Gall não afetou o período vegetativo das plantas. Contudo, nesse mesmo tratamento houve um atraso de 5 dias para o aparecimento do primeiro botão floral e um atraso de 7 dias para a abertura do botão floral em comparação com os demais tratamentos (ATTOLICO; DE TULLIO, 2006). Outro estudo do mesmo grupo com o mesmo material vegetal, mas em plantas expostas à 10 horas de luz, o tratamento com a aplicação de AA exógeno, apresentou plantas com florescimento precoce (BARTH et al., 2006).

Considerando ainda, a ação do AA no florescimento, o mesmo influencia na expressão do gene *LEAFY*, relacionado com o processo de floração, sendo que a adição do precursor do AA, Gall retarda a expressão desse gene. Desse modo, observou-se que plantas de *Arabidopsis* em um fotoperíodo de 16 horas de luz apresentam uma menor expressão do gene quando na presença de altas concentrações de AA (ATTOLICO; DE TULLIO, 2006).

2.3.1 Atividade antioxidante do AA em culturas de interesse

Com tantos papéis no metabolismo das plantas, é possível afirmar que AA é capaz de se correlacionar com a adaptação dos vegetais aos estresses ambientais, principalmente devido à sua atividade como um antioxidante (GEST et al., 2013). Por isso, estudos tendem a preservar o conteúdo de AA para prolongar a vida útil de frutos ou hortaliças ou ainda utilizam de aplicação exógena de AA para melhorar plantas em condições de estresse.

Em condições de estresse salino a irrigação de cevada com solução de AA promove uma maior produção e confere tolerância ao estresse melhorando o crescimento vegetal, a absorção de nutrientes e a fotossíntese (NOREEN et al., 2021). Já em condições de estresse hídrico a aplicação de biomoduladores preserva o conteúdo de AA, que por sua vez aumenta a vida útil do brócolis cultivado sobre estresse (ZULFIQAR; ASHRAF, 2021). Em relação à proteção contra patógenos e herbivoria, o AA regula e estimula a ativação de mecanismos de proteção atuando como antioxidante e afetando os níveis de ERO, os quais

agem como sinalizadores nas plantas em situações de ataque de insetos e outros patógenos (BORESTEIN, 2017).

Em tomate, o AA é capaz de proteger o fruto em condições de alta intensidade luminosa (ZUSHI et al., 2020). Sabendo que para o desenvolvimento do fruto, uma grande quantidade de luz se faz necessária, esse estudo indicou que frutos em um ambiente luminoso apresentaram um maior conteúdo de AA, bem como um maior raio. Outro estudo com tomate verificou que a utilização de técnicas de pós-colheita que visam preservar o conteúdo do AA leva a um fruto com características organolépticas desejadas e uma maior vida de prateleira (LEONG et al., 2017; TSANIKLIDIS et al., 2014). Em estudos com brotos de feijão foi observado que a aplicação exógena de AA protege o mesmo contra o escurecimento enzimático devido à atividade antioxidante da molécula durante o período de armazenamento (SIKORA; ŚWIECA, 2018).

Já trabalhos com pimentão demonstram que tratamentos com aplicação de AA apresentaram frutos com maior firmeza, conteúdo de pigmentos, e com níveis de acidez desejados comercialmente (BARZEGAR et al., 2018). Na pós-colheita de folhas de espinafre, o corte assim como o refrigeração imediato do vegetal afeta o conteúdo de AA. Sendo que em folhas armazenadas a 4°C e sem cortes apresentam uma maior concentração de AA, aumentando a vida útil e o frescor das folhas em comparações à folhas de espinafre armazenadas a 8°C e cortadas em 6 partes (COCETTA et al., 2014). Em banana também foi observado que um maior conteúdo de AA protege o fruto contra danos causados pelo frio devido à sua ação antioxidante estimulada pela adição de progesterona exógena (HAO et al., 2019).

Na preservação de óleos comestíveis se observou que o acréscimo de AA e outros antioxidantes promove um atraso na degradação oxidativa, preservando as propriedades do material. Além disso, o mesmo trabalho apresentou que óleos comestíveis provenientes de vegetais ricos em AA apresentam uma maior estabilidade durante o processo de extração, de modo a preservar seus nutrientes (MISHRA et al., 2021). Em arroz, o AA se faz necessário para a preservação do grão contra o distúrbio fisiológico do gessamento, sendo importante para manter o valor agregado comercial ao produto (YU et al., 2017; 2015).

Outro estudo também demonstrou que devido à propriedade antioxidante do AA, tratamentos pós-colheita em flores ornamentais que preservam o conteúdo do mesmo apresentam um atraso na abscisão floral, além de aumentar a longevidade de *Petunia* (CAVAIUOLO et al., 2013). Ao adicionar AA em uvas, ou ainda uvas que apresentam um maior conteúdo de AA, resultam em vinhos com melhores características organolépticas. Parâmetros como odor e acidez são mais facilmente alcançados aos níveis desejados, independente do tipo de vinho a ser produzido, devido à grande concentração de antioxidantes presentes no mosto (BADEA et al., 2017; MAKHOTKINA et al., 2014; BRADSHAW et al., 2011).

Em folhas de maçã, folhas com maior conteúdo de AA mantêm uma maior atividade fotossintética, bem como uma maior vitalidade. Conforme existe o envelhecimento da folha, o conteúdo de AA decresce e as folhas entram em senescência (LI et al., 2010b). Desse modo, pode-se observar que a atividade antioxidante do AA apresenta diversos efeitos nos vegetais. Sendo influenciado por diferentes fatores como idade da folha, adição de hormônios externos, ataque de patógenos entre outros, o AA se faz essencial para atrasar os danos oxidativos causados pelo ERO, o qual aumenta em situações de estresse ou em resposta a alterações do ambiente e de técnicas de pós-colheita.

3. SÍNTESE, RECICLAGEM E TRANSPORTE DO ÁCIDO ASCÓRBICO EM PLANTAS

O AA encontra-se em diferentes concentrações nos tecidos vegetais, variando entre tipo e idade do tecido, além de variações decorrentes da espécie vegetal (BARZEGAR et al., 2018; FANG et al., 2017; ZARRILLO et al., 2017; PROIETTI et al., 2009). Essas variações acontecem devido à função do AA para as plantas, sendo assim o seu metabolismo pode ser considerado dinâmico e capaz de suprir as necessidades de determinado vegetal (AL-HUQAIL et al., 2020; ZHU et al., 2020). A demanda por AA nas plantas, de modo geral, é maior nos tecidos fotossinteticamente ativos, em especial nas folhas, agindo na proteção do aparelho fotossintético contra a fotoinibição. Desse modo, a planta é capaz de regular as rotas de síntese, reciclagem e transporte do AA em caso de necessidade (HOSSAIN et al., 2017).

3.1 Biossíntese do AA

Estudos relacionados à síntese de AA iniciaram após a descoberta que o AA possui um esqueleto carbônico derivado de um açúcar de 6 carbonos (SVIRBELY; SZENT-GYÖRGYI, 1932). Diferentes rotas foram pensadas e analisadas tanto para a biossíntese em plantas quanto em mamíferos (HANCOCK; VIOLA, 2005).

Considerando o organismo vegetal, os estudos ocorridos até o momento propõem quatro rotas para a síntese de AA. Entre estas, uma rota principal denominada de “via Smirnof-Wheeler” está melhor elucidada, com todas as etapas conhecidas, bem definidas e estudadas. As outras três rotas, a saber: “via do L-gulose”, “via do D-galacturonato” e “via do mio-inositol” foram menos exploradas ou ainda possuem etapas que precisam ser melhor compreendidas em seu conjunto para uma confirmação definitiva dentro da síntese do AA (SZARKA et al., 2013; SMIRNOFF et al., 2001; HOSSAIN; ASADA, 1985).

A primeira rota de síntese a ser considerada foi a “via D-galacturonado”, inicialmente descoberta em 1961, nos Estados Unidos (LOEWLS; KELLY, 1961). Utilizando-se de frutos de morango, os pesquisadores descobriram que o ácido D-galacturônico poderia ser convertido a AA, quando o mesmo é convertido até dar origem à GalL, precursor do AA (LI et al., 2010a, 2010b; LOEWLS; KELLY, 1961). Já em 2003, tal rota para a produção de AA através da degradação das pectinas, parede celular que ocorre durante o amadurecimento de frutos foi confirmada (AGIUS et al., 2003).

A próxima rota descoberta foi na década de 90, e é hoje chamada de “via Smirnof-Wheeler”. Na Universidade de Exeter, no Reino Unido, três pesquisadores descobriram a via de síntese de AA a partir de moléculas de glicose que posteriormente dão origem ao precursor GalL (WHEELER et al., 1998). Em seguida, em 2000, na Universidade A&M no Texas, Estados Unidos, a “via L-gulose” surgiu. A mesma é considerada uma rota alternativa que culmina em um precursor alternativo para a formação de AA, o L-gulono-1,4-lactona (GulL) (JAIN; NESSLER, 2000).

Por fim, em 2004, na Universidade Estadual e Instituto Politécnico da Virginia, nos Estados Unidos, Lorence et al. (2004) hipotetizaram um caminho para a produção de AA semelhante ao que ocorre nos animais, o qual utiliza-se de mio-inositol para a produção de GulL, e em seguida AA. Esse caminho porém, gerou controvérsias, tendo em vista que novos estudos em *Arabidopsis* demonstraram que o mio-inositol não é capaz de gerar AA através de uma via semelhante ao ser humano mesmo quando somente esse caminho está disponível na planta (IVANOV et al., 2019). Porém, essa via de síntese não pode ser completamente descartada tendo em vista que pouco se sabe sobre a mesma

nas plantas, tendo a possibilidade de haver um caminho ainda desconhecido que se utiliza do mio-inositol para a produção de AA (LI et al., 2020; NTAGKAS et al., 2018).

Apesar de serem apresentadas na literatura quatro rotas para a produção de AA, as mesmas culminam na produção somente de dois precursores diferentes, GulL e GalL (Figura 2). Com a “via Smirnoff-Wheller” e a “via D-galacturonato” produzindo GalL e a “via do L-gulose” e a “via do mio-inositol” levando a geração de GulL. Apesar de diferentes quanto ao ponto de início para a síntese de AA, as vias se encontram no final, sendo que ambos os precursores podem ser utilizados por uma mesma enzima, a GalLDH.

Leferink et al. (2008) descobriram que a GalLDH é capaz de utilizar os dois precursores para a formação de AA, apesar de que a enzima apresente uma afinidade maior pelo GalL. Sabendo dessa ligação entre as rotas, fica claro que os vegetais não possuem uma rota única para a síntese de AA, podendo assim recorrer aos diferentes processos a serem conhecidos a seguir.

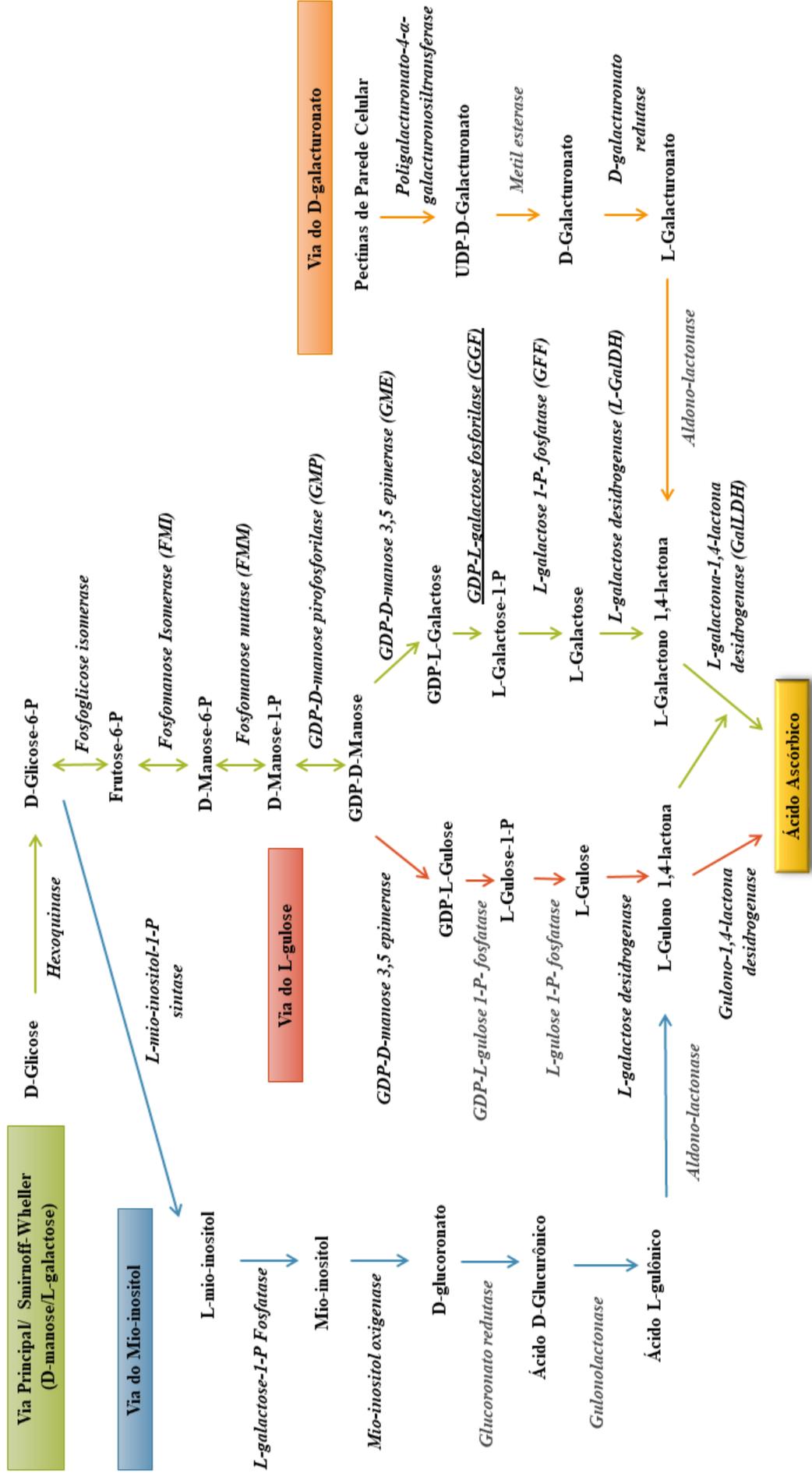


Figura 2: Possíveis rotas para a biossíntese de AA em plantas. Nas extremidades das setas se encontram as moléculas intermediárias durante o processo de síntese. Ao lado das setas, segue o nome de cada enzima responsável por determinada etapa, indicando ainda o seu precursor e produto final nas extremidades das setas. Sendo que para as enzimas, em preto se encontram as enzimas já conhecidas e em cinza as enzimas ainda a serem descobertas. Enzimas sublinhadas são consideradas pontos regulatórios da via de biossíntese. Reações reversíveis se apresentam em setas com pontas duplas. Cada cor de seta representa uma determinada rota proposta. Em verde, a via principal para a síntese de AA, ou chamada rota D-manose/L-galactose, ou ainda via Smirnof-Wheller. Em vermelho, segue a via alternativa proposta de L-gulose. Em azul, a rota proposta para a síntese de AA a partir da molécula de mio-inosito. E, em laranja segue a via do ácido L-galacturonato.

3.1.1 Rota Principal

A principal rota de biossíntese de AA em plantas foi proposta em 1998, sendo chamada de rota “Smirnof-Wheeler” ou rota D-manose/L-galactose (WHEELER et al., 1998). Essa rota é descrita em oito etapas, ocorrendo em dois locais distintos na célula, sendo eles no citosol e no interior das mitocôndrias. As primeiras etapas da rota D-manose/L-galactose não são exclusivas da via de síntese do AA, sendo as mesmas comuns para a produção de açúcares nucleosídeos, como GDP-manose que tem função estrutural na composição da parede celular. Com exceção da última etapa da rota D-manose/L-galactose, todas as demais ocorrem no citosol da célula.

A rota D-manose/L-galactose inicia com a transformação de D-frutose-6-fosfato em D-manose-6-fosfato pela ação da enzima fosfomanose isomerase (FMI) que catalisa uma isomerização reversível entre as duas moléculas (DOWDLE et al., 2007). Essa enzima se apresenta em duas isoformas na planta, FMI1 e FMI2, sendo que a FMI1 é responsável por 70% de toda a isomerização. Se considerar a rota D-manose/L-galactose atuando apenas na síntese de AA, a isoforma mais efetiva na formação da D-manose-6-fosfato é a FMI1, de acordo com estudos usando mutantes de *Arabidopsis* (MARUTA et al., 2008).

A segunda etapa da via D-manose/L-galactose é catalisada pela enzima fosfomanose mutase (FMM) que converte D-manose-6-fosfato em D-manose-1-fosfato através de outra isomerização reversível. Na terceira etapa, tem-se a conversão reversível de D-manose-1-fosfato em GDP-D-manose, além da liberação de uma molécula de pirofosfato. Nesta etapa há a demanda de uma molécula de GDP e a participação da enzima GDP-D-manose pirofosforilase

(GMP). O pirofosfato resultante desta etapa pode ser hidrolisado por uma fosfatase para a formação de duas moléculas de ortofosfato.

Na próxima etapa da via D-manose/L-galactose, o GDP-D-mannose será epimerizado em GDP-L-galactose pela ação da enzima GDP-D-mannose-3'-5' epimerase (GME). A reação de epimerização produz ainda um intermediário, o GDP-L-gulose. Nesta etapa, os três metabólitos em questão se encontram em um equilíbrio na célula, prevalecendo a formação do GDP-D-mannose (WOLUCKA; VAN MONTAGU, 2003).

A etapa a seguir tem início as reações que são específicas da formação do AA. A GDP-L-galactose é convertida em L-galactose-1-fosfato por ação da enzima GDP-L-galactose fosforilase (GGF). Essa etapa é considerada um “ponto-chave” na regulação da biossíntese do AA. Posteriormente, a enzima L-galactose-1-fosfato fosfatase (GFF) catalisa a reação de conversão da L-galactose-1-fosfato em L-galactose, com a liberação de fosfato inorgânico através de uma reação de desfosforilação.

Na próxima etapa, a última que acontece no citosol, a L-galactose é oxidada formando GalL por ação da enzima L-galactose desidrogenase (L-GalDH) paralelamente à redução de NAD^+ a NADH. O GalL é, portanto, considerado o precursor imediato do AA e após formado é transportado para o interior das mitocôndrias onde, pela ação da enzima GalLDH será transformado em AA. Esta última etapa da síntese de AA que acontece dentro das mitocôndrias será descrita detalhadamente no item 4.2 a seguir.

Para uma melhor compreensão da via principal de biossíntese de AA, o uso de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes para AA foi essencial (SMIRNOFF et al., 2001). Primeiramente, o mutante *vtc1-1* foi identificado, o qual acumula de 25-30% da concentração de AA presente em plantas *wt* (CONKLIN et al., 1996). Os mutantes *vtc1-1* são deficientes na conversão de D-glicose e D-mannose em AA, de modo que a mutação induzida afeta o chamado locus *VTC1*, o qual genes codificantes estruturais para a enzima GMP se encontram (CONKLIN et al., 2000; 1999; 1997).

Como características fenotípicas, portanto, os *vtc1-1* apresentam uma alta sensibilidade para condições ambientais que levam a geração de ERO, como em

situações em que a planta se encontra em ambientes com altas salinidades ou alta luminosidade, por exemplo (CONKLIN et al., 1996). Os mesmos ainda apresentam uma atividade da enzima violaxantina-de-epoxidase limitada, afetando assim o quenching fotoquímico (CONKLIN et al., 2000; SMIRNOFF; CRITCHLEY, 2000). Ainda com enfoque no locus *VTC1*, foi desenvolvido o mutante *cyt1-2*. Porém, este apresenta-se como um mutante letal, tendo em vista que para sua mutação foi inserido um códon de parada prematuro impossibilitando a transcrição dos genes codificantes da enzima GMP. Apesar de letal, alelos embrionários foram analisados e foi possível perceber que os mutantes *cyt1-2* apresentam defeitos na parede celular, problemas na glicolização de proteínas e a ausência completa de AA. Contudo, não foi possível identificar apenas uma causa de letalidade (NICKLE; MEINKE, 1998).

Considerando uma 2ª geração dos mutantes *vtc1-1*, outras 6 linhagens que herdaram a deficiência de AA foram descobertas, sendo que todas as linhagens apresentavam características monogênicas, afetando 4 diferentes tipos de locus *VTC* (CONKLIN et al., 2000). Logo, nesse estudo foi identificado um segundo mutante para o alelo *VTC1* nomeado *vtc1-2*, mais dois mutantes para o locus *VTC2*, *vtc2-2* e *vtc2-3*. E, ainda os mutantes *vtc3-1* e *vtc3-2* com mutações em um novo locus, o *VTC3*. Por fim, um outro mutante do locus *VTC4*, até então desconhecido, que foi nomeado *vtc4-1* também foi descoberto.

Os mutantes *vtc2-2* e *vtc2-3* apresentam dificuldades na conversão de GDP-L-galactose em L-galactose-1-fosfato, ação feita pela enzima GGF, em um ponto-chave de regulação da via de biossíntese. Assim sendo, os mutantes *vtc2* necessitam de suplementação de AA para se desenvolver (LAING et al., 2007; LINSTER et al., 2007). Para os mutantes *vtc3* existe uma dificuldade na conversão de manose em AA (CONKLIN et al., 2000). E, os mutantes *vtc4-1* apresentam baixa atividade da enzima GFF, que converte L-galactose-1-fosfato em L-galactose. Tais mutantes apresentam uma concentração de 40% do conteúdo de AA de uma planta de *Arabidopsis wt*, e ainda possuem uma atividade residual da enzima GFF, de modo que o autor pressupõe que a conversão de L-galactose-1-fosfato em L-galactose ocorre por mais de um caminho na síntese de AA (CONKLIN et al., 2006).

Posteriormente, foi ainda elaborado um novo mutante, o chamado *vtc5*, que também necessita de suplementação externa de AA para seu desenvolvimento. Esse mutante apresenta dificuldade na transcrição do gene *VTC5/At5g55120*, o qual está relacionado com a enzima GGF, assim como os mutantes *vtc2* (DOWDLE et al., 2007). Dessa forma, foi confirmado que a enzima GGF faz parte de uma reação essencial, sendo considerada o ponto regulatório dessa via de síntese de AA.

3.1.2 Outras Rotas de Biossíntese

Foi proposta uma via alternativa para a síntese de AA onde o GDP-L-gulose produzido na via D-manose/L-galactose, por ação da enzima GME, seria usado diretamente para a produção de AA (JAIN; NESSLER, 2000). Essa via, denominada de “via do L-gulose”, se inicia com a conversão do GDP-L-gulose em L-gulose, o qual por ação da enzima L-galactose desidrogenase irá formar o Gull. Este, por sua vez, será oxidado pela ação da Gull oxidase, ou da GalLDH, formando assim o AA. É preciso afirmar, entretanto, que essa via ainda não está confirmada, uma vez que não foi identificada até o momento a enzima específica responsável pela síntese do L-gulose a partir do GDP-L-gulose (SZARKA et al., 2013; LEFERINK et al., 2008; WOLUCKA; VAN MONTAGU, 2003).

Outra via proposta para a síntese do AA é a “via do D-galacturonato”, identificada inicialmente em morango (LOEWLS; KELLY, 1961). Segundo essa via, a síntese do AA se dá utilizando produtos da degradação de pectinas da parede celular por ação da enzima poligalacturonato-4- α -galacturonosiltransferase para formar o UDP-D-galacturonato (BADEJO et al., 2012; DI MATTEO et al., 2010). Posteriormente, pela ação de enzimas ainda não identificadas, o UDP-D-galacturonato é transformado em ácido D-galacturônico, que por sua vez seria convertido em L-galacturonato pela ação da enzima ácido D-galacturônico redutase. Na etapa seguinte, o L-galacturonato seria transformado em Gall pela ação de uma aldonolactonase, ainda não identificada. Por fim, o Gall será usado para formar o AA, por ação da GalLDH. Considera-se que essa rota tenha maior atividade durante o amadurecimento de frutos, sendo um mecanismo de reciclagem de esqueletos carbônicos após a degradação da parede celular que

ocorre durante o período de maturação, principalmente em frutos carnosos. Assim, a “via D-galacturonato” se relaciona com os níveis de AA no amadurecimento, sendo mais importante na fase de amadurecimento dos frutos (TRUFFAULT et al., 2014; GEST et al., 2013; BADEJO et al., 2012; MELINO et al., 2009).

A quarta via proposta para a biossíntese de AA é a “via do mio-inositol” (LORENCE et al., 2004). Nessa via, a D-glicose-6-fosfato é convertida em L-mio-inositol pela ação da enzima L-mio-inositol-1-fosfato sintase. A seguir, o L-mio-inositol será transformado em mio-inositol por ação da enzima L-galactose-1-fosfato fosfatase. Posteriormente, o mio-inositol deve ser convertido em D-glucoronato pela enzima mio-inositol oxigenase. O D-glucoronato será convertido em ácido L-gulônico por ação de uma glucuronato reductase ainda não totalmente caracterizada, para depois ser convertido em Gull por ação de uma enzima gulonolactonase. Posteriormente, esse precursor alternativo, Gull, é convertido em AA pela Gull oxidase ou pela GalLDH (SZARKA et al., 2013; LEFERINK et al., 2008). Apesar de ser uma rota, considerada alternativa para a produção de AA, estudos mais recentes demonstram que mesmo com estímulo e uma maior produção de mio-inositol, nenhum mio-inositol produzido é transformado em AA em plantas (IVANOV et al., 2019). Porém, outros artigos ainda relacionam uma maior disponibilidade de mio-inositol acompanhado com aumento no conteúdo de AA (LI et al., 2020; NTAGKAS et al., 2018). Assim, devido ao pouco conhecimento descrito na literatura sobre essa via, não é possível descartar que o mio-inositol seja capaz de ser transformado em AA.

3.2 Reciclagem de AA

No metabolismo celular, existem duas enzimas que são responsáveis pelo processo de reciclagem do AA, a MDHAR e a dehidroascorbato redutase (DHAR). Assim, essas duas enzimas são as principais responsáveis pelo balanço entre as formas de DHA, MDHA e AA na célula (BROAD et al., 2020).

Com a oxidação de uma molécula de AA é formado o MDHA, uma molécula radicalar instável que tende a espontaneamente ser convertida a DHA e

posteriormente a AA. Apesar de instável, o MDHA não reage imediatamente com o oxigênio ou outras moléculas que levariam a produção de radicais com alto nível de toxicidade. Apesar de espontaneamente convertido a DHA, através da enzima MDHAR e com a participação do NADPH atuando como um agente redutor, MDHA pode ser convertido diretamente a AA (GEST et al., 2013). Além dessa via, também há outra forma de reciclagem do MDHA sem a ação enzimática. Neste caso duas moléculas de MDHA livre se unem resultando em uma molécula de DHA e uma AA (SMIRNOFF, 2018). O DHA pode ser convertido em AA a partir da ação da enzima DHAR, com a participação da glutatona reduzida (GSH) atuando como agente redutor, o que irá resultar na forma oxidada da glutatona (GSSG) além do AA. Porém, ao contrário do MDHA que espontaneamente pode ser convertido em DHA, caso o mesmo não seja convertido pela ação enzimática, este se transforma irreversivelmente em ácido-2,3-dicetogulônico (GALLIE, 2013b).

Na reciclagem do AA em plantas existe um sistema cíclico conhecido como ciclo ascorbato-glutationa ou ainda ciclo “Asada-Haliwell”, que é considerado o principal mecanismo de defesa antioxidante, capaz de desintoxicar a célula do H_2O_2 (HASANUZZAMAN et al., 2019; FOYER; HALLIWELL, 1976). O ciclo integra as enzimas MDHAR e DHAR que em conjunto com as enzimas glutatona redutase (GR) e APX formam um sistema antioxidante que permite a reciclagem de AA e de GSH, além de transformar o H_2O_2 em H_2O (BROAD et al., 2020; SMIRNOFF, 2018; BARTOLI et al., 2017; WHEELER; LOEWUS, 2000). O ciclo ascorbato-glutationa ocorre em diversos locais na célula, onde é possível encontrar todas as enzimas requeridas para tal sistema, como em mitocôndrias, cloroplastos, peroxissomos, no citosol e até mesmo em associação à membrana plasmática (ZECHMANN, 2018; 2014; JIMÉNEZ et al., 1998).

Através do ciclo ascorbato-glutationa o H_2O_2 é reduzido à água pela ação da enzima APX que utiliza duas moléculas de AA, as quais são oxidadas a MDHA. Este pode ser então utilizado como substrato pela enzima MDHAR para regenerar o AA com a participação do NADPH como doador de elétrons. Ainda, o MDHA pode seguir em um caminho alternativo e não enzimático, sendo espontaneamente convertido em DHA. O DHA, por sua vez, também pode seguir dois caminhos: i) ser espontaneamente e irreversivelmente convertido em ácido-

2,3-dicetogulônico ou ii) ser transformado em AA pela ação da enzima DHAR que utiliza GSH como um doador de elétrons, obtendo por fim o AA e a GSSG. Por fim, com a ação da enzima GR e o consumo de NADPH, a GSH pode ser regenerada (Figura 3) (BROAD et al., 2020; BARTOLI et al., 2017; GALLIE, 2013b; FOYER; NOCTOR, 2011; SMIRNOFF et al. 2000).

Como visto, o ciclo ascorbato-glutationa é muito importante para o estado redox da célula, controlando as relações entre AA/DHA, GSH/GSSG e ainda NADP⁺/NADPH (NOCTOR, 2006). Por fim, o mesmo relaciona dois importantes antioxidantes das plantas, AA e GSH, que podem reagir de modo a garantir um alto potencial redutor, doando ou reduzindo elétrons, para a proteção do organismo vegetal contra espécies reativas de oxigênio (FOYER; NOCTOR, 2011).

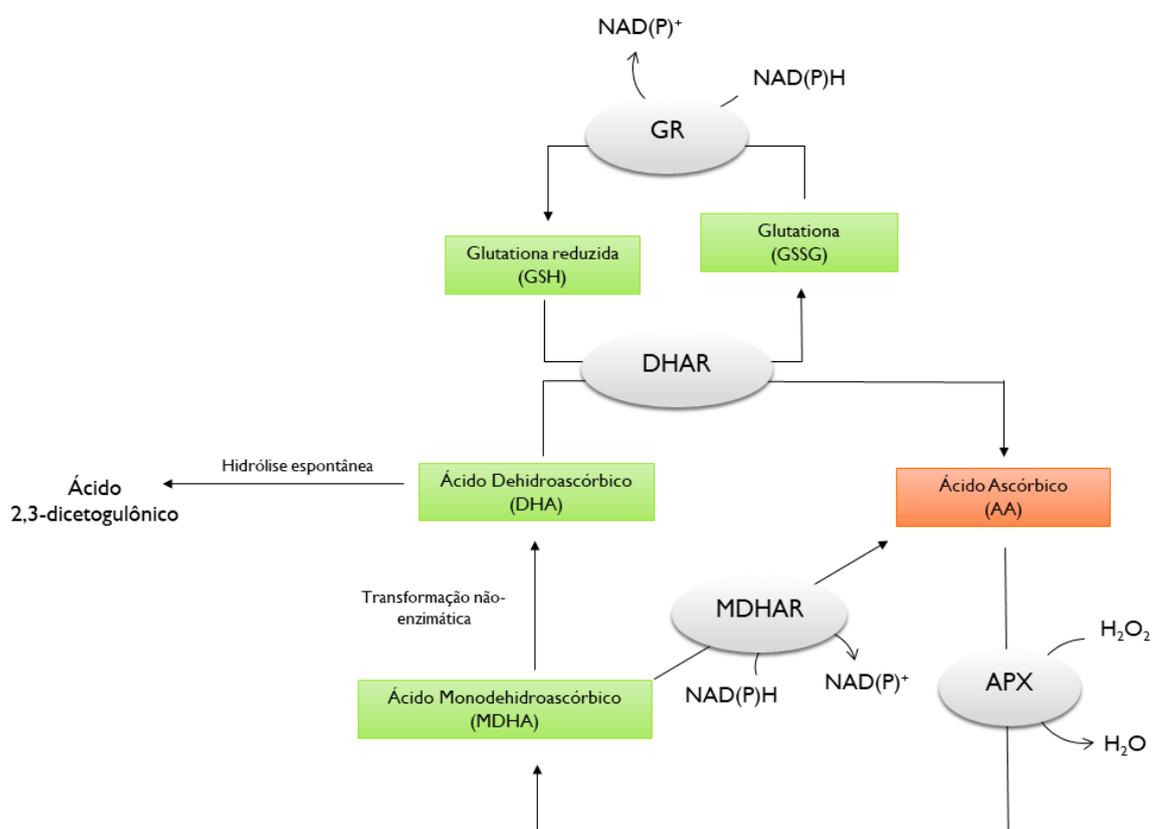


Figura 3: Esquema do ciclo ascorbato-glutationa, indicando as etapas enzimáticas e transformações não enzimáticas, com indicações para os substratos necessários para a reação enzimática acontecer. As setas indicam o sentido da reação. As enzimas estão representadas pelos balões com suas siglas. GR:Glutationa redutase; DHAR:Dehidroascorbato redutase; MDHAR: Monodehidroascobarto redutase; APX:Ascorbato peroxidase.

Muitos estudos correlacionam o ciclo do ascorbato-glutationa e seu papel na planta em condições de estresse (HASANUZZAMAN et al., 2019; LOCATO et al., 2017; SZARKA et al., 2013; TOMASSKOVICS; BÁNHEGYI, 2012; ZSIGMOND et al., 2011). Estes estudos mostram que a depender da condição ambiente, o estado redox da planta é ajustado e o ciclo de ascorbato-glutationa é modulado no sentido de priorizar a regeneração do AA, ou da GSH ou outro intermediário do ciclo, permitindo a planta ajustar seu metabolismo para melhor sobrevivência sob condições adversas (HASANUZZAMAN et al., 2019; BARTOLI et al., 2017; KUZNIAK et al., 2017).

No cloroplasto, o MDHA pode ser reduzido em DHA pela ação da ferredoxina, o que por sua vez impediria a redução do NADP⁺ em NADPH, pois, neste caso, haveria uma competição pelos elétrons fotossintéticos para a formação de NADPH, tal ação ocorre em plantas sob alta intensidade luminosa e em condições ideais de CO₂ e Pi, em que os cloroplastos se encontram em um estado reduzido (DANNA et al., 2003; BACKHAUSEN et al., 2000; MIYAKE et al., 1993). A ação da GSH no ciclo ascorbato-glutationa pode sofrer alterações. Em cloroplastos com pH > 6, a GSH é capaz de transformar de modo não enzimático o DHA em oxalato. Tal fato foi comprovado em experimentos utilizando cloroplastos isolados de folhas de espinafre a qual apresentavam pH 7.0 e uma alta concentração de GSH em resposta à exposição à alta luminosidade (SHARMA et al., 2012; FOYER; HALLIWELL, 1976).

Desse modo, ao considerar o tempo necessário para alterações na síntese de AA e GSH, as regulações no ciclo do ascorbato-glutationa são uma alternativa para aumentar os níveis de antioxidantes nas plantas. Essas alterações permitem uma rápida resposta, em questão de horas, garantindo a planta uma adaptação rápida e eficiente ao ambiente de modo a proteger o meio celular em condições de estresse ou ao longo do seu ciclo de vida (GALLIE, 2013b).

3.3 Transporte de AA

Sabe-se que as concentrações de AA não estão uniformemente distribuídas nos compartimentos celulares dos vegetais (FOYER et al., 2020). Um estudo

recente apresentou a distribuição da concentração de AA nas células de plantas de *Arabidopsis* com seis semanas de idade crescendo sob um fotoperíodo de 16 horas e densidade de fluxo de fótons entre 120 e 140 $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ZECHMANN, 2018). Essas plantas foram então expostas a diferentes níveis de intensidade luminosa (50, 150, 300, 700 e 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e foram avaliados os níveis de AA em diferentes compartimentos celulares (FOYER et al., 2020; ZECHMANN, 2018). Os resultados mostram que o AA é acumulado diferentemente no tecido vegetal a depender do local e das condições ambientais a qual o organismo vegetal se encontra. Verificaram-se níveis diferentes de AA no citosol, núcleo, peroxissomo e cloroplasto (ZECHMANN, 2018). Outros trabalhos, também verificaram diferenças na concentração de AA em diferentes tecidos vegetais em plantas sob diferentes condições ambientais (SZECOWKA et al., 2013; ZECHMANN et al. 2011; FRANCESCHI; TARLYN, 2002; VAN HOVE et al., 2001; VANACKER et al., 1998).

O transporte de AA nas plantas a longa distância se dá pelo sistema vascular do vegetal, mais especificamente através do floema, para posteriormente ser distribuído nos diferentes tecidos, partindo de tecidos fotossinteticamente ativos para órgãos dreno como gemas e raízes (HANCOCK et al., 2003; FRANCESCHI; TARLYN, 2002). Já o transporte específico intracelular do AA ainda precisa ser melhor estudado para esclarecer muitas dúvidas que ainda pairam sobre o processo (FOYER et al., 2020; SMIRNOFF; ARNAUD, 2019).

Em relação ao transporte de AA na mitocôndria, a molécula de AA é capaz de passar através das membranas, interna e externa, de modo passivo. Assim, o transporte de AA desde as mitocôndrias até o apoplasto utiliza o potencial de membrana para o transporte do ânion de AA (SHAROVA et al., 2020; MAKAVITSKAYA et al., 2018).

De modo mais específico ao se investigar sobre os transportadores de AA nas células vegetais, foram descobertos 12 genes em *Arabidopsis* que codificam para 12 transportadores nucleobase-ascorbato (NAT) (MAURINO et al., 2006). Os transportadores caracterizados como NAT pertencem à família dos simportadores nucleotídeos:cátion (NCS2), se assemelhando aos transportadores presentes em mamíferos e fungos que alternam entre o transporte de nucleotídeos e AA (DE KONING; DIALLINAS, 2000).

Os NAT, porém, não se apresentam em uma mesma localização, de modo que o AtNAT7, AtNAT8 e AtNAT12 foram localizados na membrana plasmática. Também foi sugerido que ao menos um transportador NAT se encontra na membrana dos tilacoides, devido à alta demanda de AA pelo cloroplasto, tendo em vista que, mutantes silenciados para o gene de AtNAT7 apresentaram uma mudança morfológica nos tilacoides e outras anormalidades nos cloroplastos (MAURINO et al., 2006).

NAT também foram identificados em arroz, tomate e milho (CHAI et al., 2018; ZECHMANN, 2018; CAI et al., 2014; MAURINO et al., 2006). Buscando uma localização específica para os transportadores, Maurino et al. (2006) localizaram OsNAT10 e OsNAT11 nos plastídeos em arroz. Já em tomate, foram encontrados 12 genes codificantes para NAT, sendo chamados de SINATs. A partir de uma análise do sequenciamento do material genético, estipulou-se a localização destes transportadores na membrana plasmática, na membrana do retículo endoplasmático, na membrana dos tilacoides e no complexo de Golgi (CAI et al., 2014). Já em milho, foram encontrados 21 genes codificantes para NACS2/NAT de duas subfamílias diferentes, porém mais estudos ainda são necessários para identificar quais dos genes e transportadores participam ativamente do transporte de AA (CHAI et al., 2018).

Por fim, em *Arabidopsis* também foi identificado outro transportador para AA, o AtPHT4, pertencente à família de transportadores de fosfato (MIYAJI et al., 2015). Esse transportador se encontra na membrana externa dos cloroplastos e está diretamente relacionado com o potencial de membrana e o transporte de cloro, sendo ambos fatores importantes para sua atividade. O AtPHT4 transporta AA somente na forma de oxidada, sendo insensível a DHA, além disso, o mesmo requer uma maior concentração de AA no citosol para realizar sua função. Fato peculiar, mutantes sem a presença de AtPHT4 ainda apresentam AA no interior dos tilacoides, mas em menor concentração, além disso, essas plantas apresentam um comprometimento no *quenching* não-fotoquímico, que corresponde à dissipação do excedente da energia luminosa absorvida a ser liberada na forma de calor.

Esse mecanismo de dissipação se relacionam ao ciclo das violaxantinas, de modo que os mutante sem o transportador AtPHT4 apresentam uma menor

atividade de violaxantina-de-epoxidase, enzima do ciclo em que o AA age como um cofator enzimático, após a exposição das plantas a situações de alta-luminosidade por 2 minutos. Logo após a exposição os mutantes apresentaram uma queda nos níveis de zeaxantina e anteraxantina, enquanto os níveis de zeaxantina aumentaram. Ainda sobre a influência do AtPHT4 sobre os pigmentos, os mesmos mutantes apresentaram níveis 30% mais baixos de β -caroteno nas mesmas condições (FERNIE; TÓTH, 2015; MIYAJI et al., 2015).

Para o transporte de AA assim como DHA, hipotetizou-se que estes seriam transportados em conjunto com a molécula de glicose dentro da célula vegetal, podendo até mesmo competir pelo mesmo transportador (FOYER; LELANDAIS, 1996). Descobriu-se que o transporte de DHA se faz por um mecanismo único nas membranas plasmáticas em comparação com as células de animais, já que nas mesmas o transporte de DHA é realizado por um transportador de glicose (HOREMANS et al., 2008). Em relação ao transporte de DHA para as mitocôndrias, ainda se faz presente o pressuposto de que o mesmo é incorporado na organela por intermédio de um transportador que incorpora moléculas de glicose (FERNIE; TÓTH, 2015; SZARKA et al., 2004).

4. RELAÇÃO ENTRE AA E A CTE_m EM PLANTAS

4.1 Respiração e a CTE_m

Um dos mais importantes processos metabólicos celulares é a respiração. A respiração, um processo que pode ser apresentado em 3 etapas, leva a formação de ATP, a molécula energética da célula e também de várias estruturas orgânicas “esqueletos carbônicos” necessárias para o crescimento e sobrevivência do vegetal (MILLAR et al., 2011).

A respiração pode ser resumidamente apresentada pela etapa da glicólise, ciclo dos ácidos tricarbólicos (CAT) e pela fosforilação oxidativa que ocorre pela atividade da CTE_m. A primeira etapa, a glicólise, ocorre no citoplasma celular e transforma uma molécula de glicose (C₆H₁₂O₆) em duas moléculas de piruvato (C₃H₄O₃). Durante a glicólise haverá a formação de moléculas ATP e NADH. Posteriormente, o piruvato será transportado para dentro das mitocôndrias onde o mesmo será metabolizado no CAT, e por meio de diversas reações consecutivas de descarboxilação, há a produção de NADH e FADH₂, os quais são os substratos oxidativos para a produção de ATP. Logo, o NADH e FADH₂ dentro da mitocôndria irão participar do sistema de fosforilação oxidativa, a qual ocorre na membrana interna da mitocôndria, levando a um transporte de elétrons e conseqüentemente a geração de ATP por atividade da ATP-sintase, complexo responsável pela síntese do ATP.

O primeiro passo da fosforilação oxidativa é a transferência de elétrons das moléculas (NADH e FADH₂) com alto potencial redox para o O₂ na CTE_m. Essa transferência de elétrons acontece paralelamente a um transporte de prótons que resulta na formação de um gradiente eletroquímico no interior da mitocôndria. Posteriormente, esse gradiente de prótons será usado pela ATP sintase para catalisar a fosforilação da ADP produzindo o ATP. Assim, pode-se perceber que a CTE_m possui um papel muito importante durante o processo respiratório .

O processo respiratório em plantas é responsável não só pela produção de moléculas energéticas, mas também pela produção de moléculas orgânicas (MILLAR et al., 2011). Essas moléculas são fundamentais em várias rotas de biossíntese e para a manutenção do potencial redox nas células (VANLERBERGHE et al., 2020). Deste modo, mecanismos que protegem o processo respiratório, desde condições estruturais até mecanismos regulatórios são extremamente importantes para a sobrevivência da planta (O'LEARY et al., 2019).

Além desse mecanismos é importante saber que as mitocôndrias apresentam uma grande adaptabilidade ao estresse, tendo a habilidade de reconhecer diversos tipos de sinais e responder a eles (AHMAD; WANI, 2014). Porém, alterações na funcionalidade das mitocôndrias levam a perturbações na homeostase energética celular, o que leva à morte celular (LI et al., 2013).

4.2 Componentes da CTE_m e estruturas acopladas à mesma

A cadeia é formada por 4 complexos principais: complexo I (NADH-ubiquinona oxidorreductase), complexo II (succinato-ubiquinona oxidorreductase), complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductase) e o complexo IV (citocromo c oxidase – COX), os quais interagem entre si através de uma molécula lipofílica inserida na membrana interna da mitocôndria, que é chamada de ubiquinona (UQ). A interação entre os complexos também ocorre via uma proteína periférica presente na membrana interna da mitocôndria, a proteína citocromo c. Acoplado à CTE_m, encontra-se ainda o chamado complexo V (ATP-sintase), que apesar da sua importância não é uma parte considerada constituinte da CTE_m, pois não

participa do transporte de elétrons. Existem ainda a presença de vias alternativas na CTE_m como a oxidase alternativa e a NAD(P)H desidrogenases interna e externa (BRAUN, 2020; TAIZ et al., 2017; MILLAR et al., 2011; AFFOURTIT et al., 2001).

Cada complexo dentro da cadeia possui um determinado papel, porém sua participação é parte de um conjunto de atividades de modo que caso os complexos sejam bloqueados ou inibidos, pode paralisar o funcionamento de toda a CTE_m. O complexo I catalisa a transferência de elétrons do NADH para a UQ, enquanto que o complexo II é responsável por transferir os elétrons do succinato para a UQ. Já o complexo III catalisa a transferência de elétrons do ubiquinol (UQH₂), forma reduzida da UQ, para o citocromo c. Logo, a COX catalisa a passagem de elétrons do citocromo c para o O₂ (SUNDERHAUS et al., 2010).

Considerando a formação do gradiente de prótons na membrana mitocondrial, os complexos I, III e IV acoplam ao transporte de elétrons o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranar, sendo este usado pelo complexo V para catalisar a formação de ATP a partir de ADP, como citado anteriormente (AHMAD; WANI, 2014).

Começando a etapa de fosforilação oxidativa no complexo I ocorre a oxidação de NADH em NAD⁺ e bombeia prótons ao espaço intermembranar. Seguindo um caminho alternativo as duas NAD(P)H (interna e externa) oxidam NAD(P)H encaminhando os elétrons resultantes da reação a UQ. Ainda considerando os elétrons que se encaminham a UQ, no complexo II, FADH₂ é oxidado liberando elétrons que também se encaminham a UQ. No complexo II também há a transformação de succinato em fumarato, substratos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Os elétrons presentes na UQH₂ (a forma totalmente reduzida da UQ) possuem dois caminhos a seguir. Estes podem ser encaminhados ao complexo III, ou, alternativamente, a AOX, onde sua energia é usada para reduzir O₂ a H₂O. Ao ser reduzido, o complexo III bombeia prótons ao espaço intermembranar e os elétrons se encaminham para o citocromo c. O citocromo c reduzido encaminha os elétrons por fim ao complexo IV que utiliza do mesmo para reduzir O₂ a H₂O e bombear mais prótons ao espaço intermembranar.

O complexo V então utiliza do gradiente de prótons gerado através da membrana interna da mitocôndria, a partir dos prótons encaminhados ao espaço intermembranar pelos complexos I, III e IV, para catalisar a reação de síntese de ATP a partir de ADP e Pi.

Nas mitocôndrias de plantas é possível encontrar, ainda, na CTE_m a presença de complexos proteicos que constituem vias alternativas à via do citocromo c oxidase, como é o caso da AOX. A via AOX catalisa a oxidação de UQH₂ e a redução de O₂ a H₂O, constituindo uma via a mais na cadeia respiratória e mais uma oxidase terminal para o recebimento de elétrons (MANSILLA et al., 2019). Outra via alternativa encontrada em mitocôndrias vegetais é a proteína desacopladora (UcP) que corrobora para uma menor produção de ERO, além de estar envolvida na regulação da produção de ATP, pois afeta diretamente o gradiente eletroquímico de prótons, essencial à geração de ATP (MAILLOUX; HARPER, 2011). Esta, quando ativa, é capaz de translocar prótons do espaço intermembranar de volta para a matriz mitocondrial, sem passar pelo complexo V, logo, sem a síntese de ATP (SMITH et al., 2004). A UcP se difere da AOX, pois não age como um meio alternativo ao transporte de elétrons, mas impactando diretamente na formação do potencial de membrana e na capacidade de síntese de ATP da mitocôndria (VANLERBERGHE et al., 2016; MAILLOUX; HARPER, 2011).

A fosforilação oxidativa mediada pela CTE_m, não se correlaciona apenas pelo processo respiratório, estando correlacionada também com o processo fotossintético nas plantas. Isso porque uma ampla quantidade de NADH é formada pela ação fotossintética nos cloroplastos, porém indiretamente tais moléculas podem se encontrar em outros compartimentos celulares. E, assim, para evitar que a célula se encontre em um estado superreduzido em condições de alta luminosidade, a CTE_m tem por função reoxidar o NADH sem a formação de um gradiente de prótons. Tal fato ocorre pela ação da AOX e NAD(P)H desidrogenases (BRAUN, 2020).

A capacidade de fosforilação da CTE_m é variável ao longo do dia, pois em períodos de incidência de luz o CAT é afetado. Durante o dia o CAT não funciona em toda sua plenitude, ou seja, não há a sequência de oxidação em forma cíclica, tendo em vista a necessidade do vegetal pelas moléculas orgânicas produzidas

pelo CAT em outras vias metabólicas de síntese em outras organelas, tais como a assimilação de N que ocorre nos cloroplastos. Assim, a formação de NADH e $FADH_2$ pode ser severamente diminuída, impactando na atividade da CTE_m e, por conseguinte, na geração de ATP (SWEETLOVE et al., 2010; NUNES-NESI et al., 2007).

Nesse sentido, considerando a atividade dos cloroplastos, o processo de fotorrespiração influenciará a fosforilação oxidativa. Isso ocorre, pois a liberação de CO_2 para a formação de serina a partir de uma molécula de glicina ocorre paralelamente com a formação de NADH. Assim, durante o período diurno, presume-se que a maior parte do NADH utilizado na CTE_m é proveniente do cloroplasto resultante da fotorrespiração (RASMUSSON et al., 2020; 2008a; 2008b).

Sabe-se que o processo fotossintético também gera grandes quantidades de NAD(P)H, assim na presença de alta intensidade luminosa essa produção pode exceder a necessidade que a planta possui de poder redutor, o que pode não ser benéfico para a célula, pois altera o balanço redox necessário para os processos metabólicos. Assim, a atividade da via alternativa AOX auxiliaria na capacidade de re-oxidar NAD(P)H sem aumento na formação do gradiente de prótons nem alteração no estado redox da mitocôndria (VISHWAKARMA et al., 2015; YOSHIDA et al., 2011). A atividade AOX é capaz de reduzir a produção mitocondrial de ATP em até 60%, tal perda enfatiza a importância dessa via alternativa no rendimento energético final do processo respiratório (SCHEIBE, 2019).

Além da AOX, as NAD(P)H desidrogenases acompladas à CTE_m também são capazes de re-oxidar NAD(P)H protegendo o balanço redox das mitocôndrias (BRAUN, 2020; VANLERBERGHE et al., 2020; SELINSKI et al., 2018; MARTYN; DAHAL, 2016). Sendo que o balanço também é preservado devido à ação de moléculas antioxidantes, tal como o AA (BARTOLI et al., 2000).

4.2.1 Complexo I

Aprofundando um pouco em cada complexo, o complexo I, NADH-ubiquinona oxidoredutase, é o primeiro componente da CTE_m, sendo considerado o maior complexo enzimático e o local proeminente para a inserção de elétrons na cadeia (WIRTH et al., 2016). Nas plantas, o complexo I apresenta uma estrutura em forma de “L” com um segundo domínio esférico ligado à membrana do primeiro domínio, formando um braço periférico voltado para o espaço intermembranar. E, dessa forma, o complexo se compõe de 49 subunidades (SENKLER et al., 2017).

O NADH se liga ao complexo I dando início à transferência de elétrons para a UQ e a translocação de prótons para o espaço intermembranar. De acordo com os modelos mais aceitos e de ocorrência em outros organismos, é proposto que em plantas a redução da UQ acontece com a participação do domínio periférico do complexo I. Ocorre uma mudança conformacional no complexo, abrindo e fechando os canais de prótons nas faces da matriz e do espaço intermembranar do domínio intermembranar da proteína, o que permite o translocamento dos H⁺ (BRAUN, 2020; SAZANOV, 2015).

Em *Arabidopsis thaliana* são descritas 40 subunidades no complexo I bem conservadas (SENKLER et al., 2017; CARDOL, 2011). Entre essas subunidades encontra-se a enzima GalLDH, responsável pela etapa final da formação do AA (SCHIMMEYER et al., 2016; SCHERTL et al., 2012). Mais informações sobre a GalLDH serão discutidas posteriormente. Outras subunidades do complexo I também exercem importantes atividades enzimáticas junto ao metabolismo global da planta, como a anidrase carbônica e proteínas de translocação (BRAUN, 2020).

Além de sua ligação com a respiração, o complexo I também se correlaciona com os processos de fotorrespiração e fotossíntese (BRAUN, 2020; BRAUN et al., 2014). Pressupõe-se, então, que as anidrases carbônicas acopladas ao complexo I fazem parte do mecanismo celular de transferência de CO₂, o qual sai das mitocôndrias para os cloroplastos. Dessa forma, o excesso de CO₂ mitocondrial é fornecido para a assimilação de carbono que ocorre no ciclo de Calvin nos cloroplastos (ZABALETA et al., 2012; BRAUN; ZABALETA, 2007).

4.2.2 Complexo II

Envolvido diretamente na fosforilação oxidativa e no CAT, o complexo II, succinato desidrogenase, converte succinato a fumarato como parte da atividade do CAT, sendo os elétrons transferidos para a redução do FAD a FADH₂. A reoxidação do FADH₂ acontece também no complexo II, quando os elétrons serão utilizados para a redução da UQ através da CTE_m (HUANG et al., 2019; HUANG; MILLAR, 2013).

O complexo II por si só não transfere prótons para a matriz mitocondrial, mas é capaz de afetar o potencial de membrana. Nesse caso, o complexo atua sobre o ubiquinol, permitindo que a ubiquinona possa ser re-oxidada pelo complexo III ou a AOX. Dessa forma, ele induz a entrada de elétrons na CTE_m, o que posteriormente influencia o transporte de H⁺ pelos complexos III e IV (BRAUN, 2020). A estrutura do complexo II em mitocôndrias de plantas é formada pelo dobro de subunidades presentes em outros organismos, assim, com 8 subunidades presentes a formação do complexo nos vegetais é complexa e segue rotas particulares a serem descobertas (HUANG et al., 2019; MILLAR et al., 2004).

4.2.3 Complexo III

O complexo III apresenta um importante papel na CTE_m conduzindo os elétrons do ubiquinol para o citocromo c sendo responsável, portanto, pelo estado redox da ubiquinona (BRANDT; TRUMPOWER, 1994). Em plantas, o complexo III apresenta-se com duas subunidades centrais cada uma contendo 10 peptídeos (BRAUN; SCHMITZ, 1995). O complexo III ao contrário dos demais complexos pode ser considerado uma enzima bifuncional tendo em vista que apresenta uma atividade in vivo de peptidase mesmo quando desacoplado da mitocôndria devido à presença de duas subunidades específicas (BRAUN, 2020; BRAUN; SCHMITZ, 1995; 1992).

4.2.4 Complexo IV

Finalizando a sequência de complexos transportadores de elétrons na CTE_m, tem-se o complexo IV que também transfere prótons para o espaço intermembranar (WIKSTRÖM; SHARMA, 2018). A COX, ou complexo IV, se

encontra preservada em mitocôndrias e outros eucariotos sugerindo que esta enzima teve uma origem endossimbiótica (GRAY, 1999). Ao contrário da COX presente nos procariotos, em eucariotos o complexo é formado de três subunidades centrais (COX1, COX2 e COX3) cada uma formada por 13 a 17 subunidades (MANSILLA et al., 2018; SOTO; BARRIENTOS, 2016).

A ação do complexo IV catalisando a oxidação do citocromo c e redução do O₂ a H₂O está associada à translocação de H⁺ para o espaço intermembranar contribuindo com o processo de fosforilação oxidativa. A atividade do complexo IV demanda alguns cofatores para ocorrer tais como um centro di-cobre e proteínas do grupo “heme” além de outras proteínas bem conservadas evolutivamente (MANSILLA et al., 2018; SOTO; BARRIENTOS, 2016; ATTALLAH et al., 2011; POYTON; MCEWEN, 1996).

O processo de composição e estruturação do complexo IV é regulado por fatores internos e externos, porém o mecanismo por si só não está muito elucidado devido ao fato de que plantas mutantes com perdas de componentes do complexo IV apresentam uma alta letalidade embrionária tornando difícil o estudo sobre a estrutura e montagem da COX em plantas (GARCIA et al., 2016; MANSILLA et al., 2015; STEINEBRUNNER et al., 2014; 2011). Contudo, sabe-se que o complexo IV apresenta isoformas de suas subunidades de modo que a composição estrutural do complexo pode variar de acordo com a célula e o tipo de tecido, assim como o estágio de desenvolvimento do vegetal (MANSILLA et al., 2018). Assim, o complexo IV consegue ajustar sua função de acordo com a demanda energética celular. O complexo é regulado de modo transcripcional, considerando a atividade mitocondrial respiratória e a demanda energética da célula, o complexo apresenta diferentes valores de atividade de acordo com a presença de luz ou de nutrientes no ambiente (PASZKIEWICZ et al., 2017; SHI et al., 2016; HOWELL; COLAS DES FRANCS-SMALL; SMALL, 2014; DES FRANCS-SMALL et al., 2012; LAW et al., 2012; MILLAR; WHELAN, 2006).

4.2.5 Citocromo c

Presente ainda na CTE_m, encontra-se o citocromo c, uma pequena proteína do tipo heme que se associa à membrana interna da mitocôndria na face voltada para o espaço intermembranar. Em mitocôndrias de plantas, o citocromo c

além de aceitar os elétrons provenientes do complexo III, pode receber elétrons a partir de outros doadores. Entre estas vias alternativas, pode-se citar a GaLDH em sua atividade de síntese de AA (WELCHEN et al., 2016; WELCHEN; GONZALEZ, 2016; BARTOLI et al. 2000). E, ainda, a enzima D-lactato desidrogenase que utiliza o citocromo c como acceptor de elétrons durante o processo de conversão de D-lactato em piruvato (ENGQVIST et al., 2009).

Nos vegetais existem duas isoformas do citocromo c e sabe-se que plantas com o silenciamento dos genes codificantes para o citocromo c não são viáveis, uma vez que com níveis reduzidos desta proteína, elas apresentam problemas no complexo IV, o que demonstra que o citocromo c é fundamental para o estabelecimento e montagem do complexo IV nas mitocôndrias de plantas (WELCHEN et al., 2012).

4.2.6 Vias alternativas na CTE_m

Consideradas como vias alternativas para o transporte de elétrons em mitocôndrias de plantas, existem algumas proteínas associadas à CTE_m que não participam da fosforilação oxidativa, são elas a AOX e as NAD(P)H desidrogenases, interna e externa (BRAUN, 2020; AFFOURTIT et al., 2001).

4.2.6.1 NAD(P)H desidrogenases

As NAD(P)H se apresentam na membrana interna da mitocôndria em quatro unidades, duas voltadas para a matriz mitocondrial e duas voltadas para o espaço intermembranar (TAIZ et al., 2017). Quando ativas, as NAD(P)H desidrogenases são capazes de oxidar NADH e NADPH transferindo elétrons diretamente para a ubiquinona de modo que o complexo I não participará da reação, portanto não bombeará H⁺ para o espaço intermembranar (RASMUSSEN et al., 2008).

A ação das NAD(P)H desidrogenases, bem como a ação simultânea da AOX implica que a CTE_m transportará elétrons sem que haja a transferência de prótons para o espaço intermembranar tendo em vista que o caminho que o elétron faz desde a UQH₂, passando pela AOX, até o O₂, não seguirá para os complexos III e IV. Sendo estes complexos (III e IV) os outros responsáveis pelo bombeamento de prótons, a oxidação de NAD(P)H, neste caso, seria

completamente desacoplada da formação do potencial de membrana e da síntese de ATP (VANLERBERGHE et al., 2020). Há evidências que sugerem que existe a co-expressão dos genes ligados à AOX e às NAD(P)H desidrogenases, o que confirma a hipótese de que estas vias alternativas são capazes de agir juntas em determinadas circunstâncias quando a síntese de ATP é menos importante que o fluxo de elétrons na CTE_m (WANNIARACHCHI et al., 2018; RASMUSSEN; MØLLER, 2011; CLIFTON et al., 2005).

4.2.6.2 Oxidase alternativa

A AOX é um complexo proteico, integral, na forma de um homodímero que se encontra ligado à membrana interna das mitocôndrias e é formada por quatro hélices e um centro binuclear de ferro que é o responsável pelo acesso do O₂ à AOX (VANLERBERGHE et al., 2020; MAY et al., 2017; VANLERBERGHE et al., 2016; MOORE et al., 2013). Nas plantas, a AOX é codificada por uma família de genes nucleares, sendo que em plantas monocotiledôneas a mesma se apresenta na isoforma AOX1, enquanto que em plantas não-monocotiledôneas existem duas isoformas da proteína, a AOX1 e a AOX2 (SELINSKI et al., 2018; COSTA et al., 2017; CONSIDINE et al., 2002).

A AOX é muito importante para os organismos vegetais, tendo em vista que a mesma é capaz de equilibrar os desbalanços metabólicos que ocorrem na CTE_m em vista de uma grande disponibilidade de NADH ou um desequilíbrio na razão ATP/ADP (VANLERBERGHE et al., 2020). Sua atividade é importante quando há uma grande disponibilidade de NADH na matriz, devido a uma baixa atividade de CTE_m. Com a participação da AOX aumenta-se a velocidade na CTE_m, favorecendo o funcionamento do CAT necessário para a manutenção de outros processos, impedindo assim a diminuindo da atividade do CAT devido ao acúmulo de NADH, bem como a formação de intermediários desta via, os quais são metabólitos fundamentais para várias rotas biossintéticas (TOVAR-MÉNDEZ et al., 2003; PASCAL et al., 1990). Por outro lado, uma alta razão ATP/ADP retarda o fluxo de elétrons na CTE_m, resultando em um estado de redução excessivo dos componentes da cadeia. Assim, em um estado de ADP limitado, a CTE_m se torna uma fonte significativa de ERO, o que pode levar a danos irreversíveis na mitocôndria (RASMUSSEN; MØLLER, 2011; MØLLER, 2001).

Desse modo, a atividade da AOX é capaz de proteger a CTE_m reduzindo sua capacidade de produzir ERO (CVETKOVSKA; VANLERBERGHE, 2013; 2012; SMITH et al., 2009; PARSONS et al, 1999; PURVIS, 1997; PURVIS; SHEWFELT, 1993).

4.2 O AA na CTE_m

4.2.1 Atividade da GalLDH e sua interação com a CTE_m

A enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH, EC 1.3.2.3) é uma aldonolactona oxirredutase dependente de flavina responsável pela transformação de uma molécula aldonolactona, como a GalL, em AA (LEFERINK; VAN BERKEL, 2014).

As aldonolactonas oxirredutases pertencem à família das álcool vanílico oxidases (VAO) (LEFERINK et al., 2008; FRAAIJE et al., 1998). Essas enzimas se caracterizam por possuir dois domínios, sendo um com uma ligação FAD N-terminal conservada e o outro, um domínio C-terminal menos conservado que irá determinar a especificidade do substrato.

Aldonolactonas oxirredutases podem ser distinguidas em dois grupos: as oxidases e as desidrogenases. As oxidases oxidam a molécula e utilizam o O₂ como aceptor final de elétrons tendo o H₂O₂ como subproduto da reação. Já as enzimas classificadas como desidrogenases apresentam aceptores de elétrons alternativos como o 2,6-dicloroindofenol, o citocromo c, a benzoquinona e o metassulfato de fenazina (ABOUBUCKER; LORENCE, 2016). No caso da GalLDH os elétrons provenientes da oxidação da GalL são diretamente transferidos para o citocromo c da CTE_m (HERVÁS et al., 2013). A GalLDH ainda é irreversivelmente oxidada na presença de O₂ em situações de estresse oxidativo (LEFERINK et al., 2009).

A GalLDH foi primeiramente indentificada em 1954 em mitocôndrias de ervilha e feijão (MAPSON et al., 1954). Em 1958 foi realizado a primeira purificação e caracterização da enzima a partir de mitocôndrias de couve-flor (MAPSON; BRESLOW, 1958). Posteriormente, a GalLDH foi isolada de outros

tecidos vegetais como folhas de tabaco e espinafre, raízes de batata, milho, melão, tomate, blueberry, *A. thaliana* entre muitos outros (LIU et al., 2015; ALHAGDOW et al., 2007; PATERAKI et al., 2004; YABUTA et al., 2000; ARRIGONI et al., 1997; MUTSUDA et al., 1995; ÔBA et al., 1995).

A GalDH é uma enzima monomérica com 598 resíduos de aminoácidos, pesando 57 kDa e sendo expressa por um único gene (PATERAKI et al., 2004). Esta enzima é composta de três regiões transmembranares permitindo o seu acoplamento à membrana interna da mitocôndria (RODRÍGUEZ-RUIZ et al., 2017). A enzima pode ser encontrada em três complexos de proteínas distintos, os quais incluem subunidades do complexo I (SCHERTL et al., 2012).

Primeiramente, esta enzima foi descrita como uma proteína integral da membrana interna da mitocôndria (BARTOLI et al., 2000). Posteriormente, a GalLDH foi considerada associada ao complexo I da CTE_m em *Arabidopsis*, onde a sua função no metabolismo vegetal também estaria ligada à montagem do complexo I, além de doar elétrons para a cadeia quando está atuando como catalisadora na síntese de AA (BARTOLI et al., 2016; SCHIMMEYER et al., 2016). Em 2017, um estudo utilizando pimenta mostrou que a proteína se encontra ligada à membrana mitocondrial através de pelo menos um domínio transmembranar curto de 20 aminoácidos, sendo que o resto da estrutura está voltado para a periferia da membrana, voltado para a face intermembranar. A partir deste modelo é possível supor que a GalLDH interage com as oxidases terminais (COX e AOX) da CTE_m (RODRÍGUEZ-RUIZ et al., 2017).

O nível de atividade da GalLDH é influenciado pelo tipo de tecido vegetal, assim como pelos níveis de luminosidade e pelo estágio de desenvolvimento do órgão em que esta enzima está presente (PATERAKI et al., 2004; BARTOLI et al., 2016). Em folhas de batata, foi observado que a atividade da GalLDH decresce de acordo com a idade da folha, sendo menor nas folhas em estágio de senescência. Acompanhado da redução da atividade da enzima, uma menor concentração de AA também foi verificada (BARTOLI et al., 2000). Pateraki et al. (2004) verificaram diferença entre o nível de AA e a atividade da GalLDH entre duas cultivares de melão. Também foi verificado que a variação da relação vermelho/vermelho distante altera a atividade da GalLDH e o conteúdo de AA em folhas de espinafre (*Spinacia oleracea* L. cv Bison) (GERGOFF et al., 2010).

Ainda sobre a influência da luz, estudos observaram que a enzima apresenta elementos responsivos à irradiância, de modo que a atividade da GalLDH aumenta durante o dia e reduz quando a luminosidade diminui, apresentando o menor nível de atividade durante a noite (BARTOLI et al., 2016; FUKUNAGA et al., 2010; TAMAOKI et al., 2003). Em pimenta, existe uma diferença na expressão e atividade da GalLDH, sendo que em folhas e flores existe uma grande expressão dos genes relacionados a GalLDH, porém uma baixa atividade da enzima propriamente dita, com maiores níveis de atividade encontrados nos frutos verdes e maduros (RODRÍGUEZ-RUIZ et al., 2017). Rodríguez-Ruiz et al. (2016) ainda observaram uma variação na atividade da GalLDH na presença de glutathione, havendo uma baixa de até 60%.

Apesar de ser a enzima responsável pela última etapa na formação de AA, existem dados contraditórios sobre a influência da GalLDH no conteúdo final de AA. Alhag Dow et al. (2007) não observaram diferença no conteúdo final de AA em plantas mutantes de tomate com o silenciamento do gene da GalLDH em comparação a plantas controle. Em outro trabalho com folhas de plantas mutantes de tabaco com superexpressão da GalLDH não foi verificada diferença nos níveis de AA em relação ao controle (IMAI et al., 2009). Porém, em plantas de arroz foi observado que uma superexpressão da GalLDH proporcionou maiores níveis de AA nas folhas, assim como verificou-se uma redução do conteúdo de AA em plantas mutantes onde o gene da GalLDH havia sido silenciado (YU et al., 2020; 2017).

A GalLDH apresenta uma ligação funcional e estrutural com a CTE_m, de modo que a mesma se conecta com o complexo I e o citocromo c da cadeia (BRAUN, 2020). Estruturalmente, a GalLDH encontra-se associada ao complexo I, contudo, a mesma não é inibida por rotenona, um inibidor conhecido para o complexo (MILLAR et al., 2003). O mesmo estudo porém, demonstrou que a síntese de AA é completamente inibida na presença de cianeto de potássio, o qual bloqueia a oxidação do citocromo c, indicando que o citocromo é essencial para a atividade da enzima.

Inicialmente, a GalLDH foi considerada uma pequena forma do complexo I, sendo até mesmo denominada de “complexo I*” (HEAZLEWOOD et al., 2003). Além disso, a GalLDH é necessária para a montagem do complexo I, tendo em

vista que em mutantes de *Arabidopsis* com inserção de T-DNA no gene para GalLDH, não há formação do complexo I. Esses mutantes além de não expressarem a GalLDH e o complexo I, não se desenvolvem além da fase cotiledonar (PINEAU et al., 2008). Nesse mesmo trabalho, os autores hipotetizaram que a GalLDH deve se destacar do complexo I quando o mesmo se encontra completamente formado, tendo em vista que a enzima não é observada na presença do complexo I maduro. Contudo, mais recentemente experimentos também utilizando *Arabidopsis* constatou-se a presença de frações da GalLDH no complexo I plenamente maduro (SCHIMMEYER et al., 2016).

Schertl et al. (2012) verificaram a presença e atividade da GalLDH em três diferentes intermediários durante a montagem do complexo I. Posteriormente, Schimmeyer et al. (2016) confirmaram a presença da enzima nas frações intermediárias de 400 e 450 KDa além do “complexo I*”, sendo verificado que durante a montagem do complexo, a GalLDH se incorpora ao mesmo ficando ligada no complexo no domínio membranal durante a transição do intermediário de 200 para 400 KDa. Os autores ainda observaram que a GalLDH estabiliza o processo de montagem do complexo I, tendo em vista que mutantes de *Arabidopsis* que não apresentavam atividade da enzima GalLDH possuíam apenas partes dos intermediários do complexo I, mas não um complexo inteiro e maduro.

Há que se destacar, porém, que a ação da GalLDH sobre a montagem do complexo I não está diretamente ligada ao metabolismo do AA. Isso foi confirmado com o uso de plantas de *Arabidopsis* mutantes, com o silenciamento do gene *VTC2*, responsável por codificar a enzima GDP-L-galactose fosforilase, e que mesmo assim são capazes de produzir 10% do conteúdo de AA de uma planta controle. Nas plantas mutantes para a via de síntese do AA, apesar da baixa produção de AA, as mitocôndrias apresentam um complexo I maduro e funcional.

Funcionalmente, a GalLDH se conecta com o citocromo c. Segundo Bartoli et al. (2000), a GalLDH tem a capacidade de transferir elétrons provenientes do Gal ao citocromo c, alimentando assim o fluxo de elétrons na CTEM e o processo respiratório. Também foi observado que mitocôndrias intactas não são capazes de sintetizar AA quando o citocromo c se encontra completamente reduzido

(MILLAR et al., 2003; BARTOLI et al., 2000). Em outro trabalho com mutantes de *Arabidopsis* com ausência do citocromo c na CTE_m verificou-se uma redução de 60% na atividade da GalLDH, porém não houve diferença nos níveis finais de AA apesar da redução na atividade da enzima (WELCHEN et al., 2012).

Logo, é possível supor que a GalLDH influencia diretamente na atividade respiratória, mais especificamente na CTE_m (Figura 4). De modo geral, a respiração via GalLDH requer a presença de GalL e apresenta uma taxa de consumo de oxigênio menor, tendo em vista que o transporte de elétrons ocorre somente via citocromo c e posteriormente via complexo IV, com o transporte de prótons e a redução de O₂ a H₂O (LEFERINK et al., 2008; BARTOLI et al., 2000; WHEELER et al., 1998).

Na fosforilação oxidativa apresentada na Figura 4, o transporte de elétrons inicia-se no complexo I com a oxidação de NADH que gera elétrons transportados à ubiquinona que se reduz a UQH₂. O complexo I ainda bombeia prótons ao espaço intermembranar. A GalLDH oxida o GalL em AA com a liberação de 2 elétrons que serão usados para a redução do citocromo c.

Assim sendo, a atividade da GalLDH depende da disponibilidade do citocromo no estado oxidado. Nas mitocôndrias de plantas há um caminho alternativo para a oxidação de NAD(P)H através de quatro NAD(P)H alternativas, sendo duas voltadas para o espaço intermembranar e outras duas voltadas para a matriz, capazes de oxidar o NAD(P)H encaminhando os elétrons à UQ. Ainda considerando os elétrons que se encaminham a UQ, o complexo II oxida FADH₂ que doa elétrons para a UQ. O complexo II é responsável pela oxidação do succinato a fumarato, como parte do ciclo dos ácidos tricarboxílicos que ocorre na matriz mitocondrial.

Para a oxidação da UQH₂ os elétrons podem seguir duas vias fundamentalmente. A via principal com a transferência para o complexo III, ou para uma via alternativa quando a oxidação da UQH₂ é usada para reduzir O₂ a H₂O com a participação da AOX. Ao ser reduzido, o complexo III bombeia prótons ao espaço intermembranar, sendo os elétrons transferidos para o citocromo c, que os encaminha ao complexo IV para a redução também do O₂ a H₂O paralelamente ao bombeamento de prótons ao espaço intermembranar.

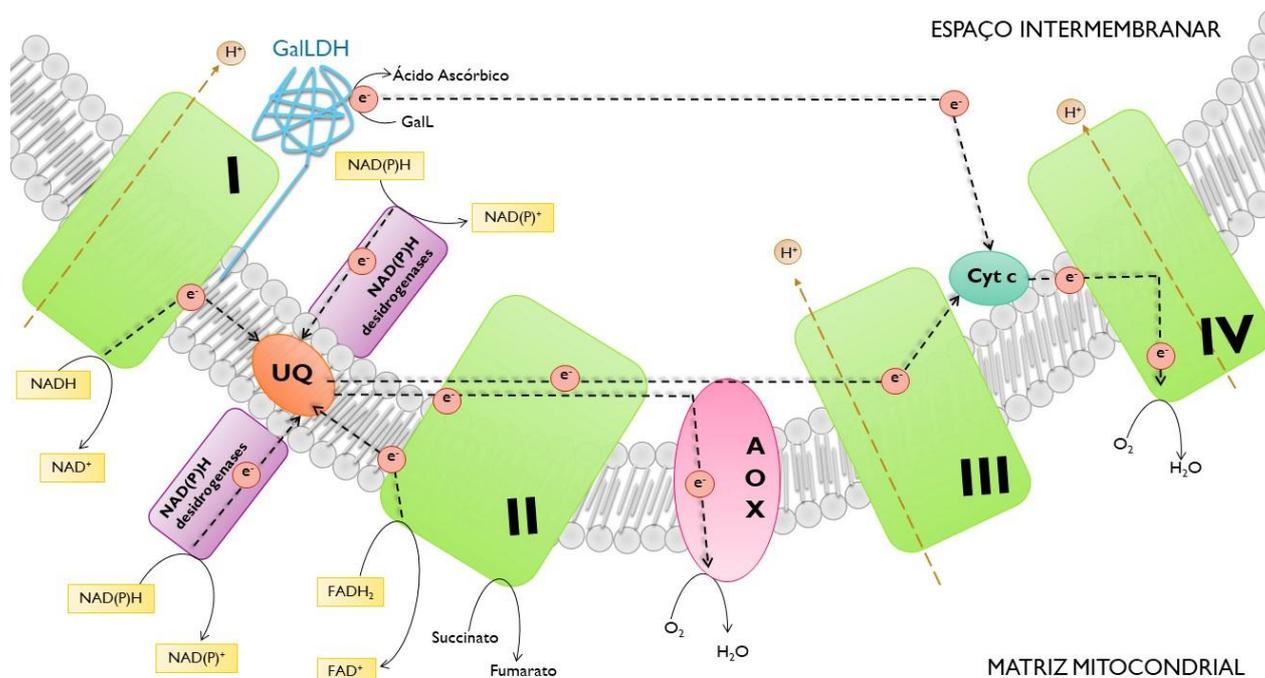


Figura 4: Esquema ilustrativo do transporte de elétrons e prótons na CTE_m. As linhas pretas pontilhadas indicam os caminhos do transporte de elétrons dentro da cadeia transportadora, enquanto que as linhas marrons representam o local do bombeamento de prótons que ocorre da matriz para o espaço intermembranar mitocondrial. No presente esquema a localização e atuação da enzima GalLDH são indicadas pela forma enovelada em azul. Em verde estão os complexos da CTE_m indicados pelos números romanos correspondendo aos complexos I-IV. A AOX está representada em rosa, enquanto que pool de ubiquinona e o citocromo c estão representados em laranja e verde-água, respectivamente. I : NADH-ubiquinona oxidorreductase. II: succinato-ubiquinona oxidorreductase. III: ubiquinol-citocromo c oxidorreductase. IV: citocromo c oxidase (COX). V: ATP-sintase. AOX: oxidase alternativa; UQ: pool de ubiquinona. Cyt c: Citocromo c. H⁺: prótons. e⁻: elétrons.

Em mitocôndrias isoladas de mamão e tomate, Santana (2019) analisou o consumo de O₂ tendo como substratos NADH ou GalL, sendo posteriormente adicionado ADP para quantificar a fosforilação oxidativa. A seguir, foi adicionado um inibidor da via AOX, e com esta via inibida finalizou-se com a adição de um inibidor do complexo IV. Estes estudos indicaram que mesmo com a inibição das duas vias, a da AOX e do complexo IV, o consumo de O₂ permaneceu quando a via GalLDH estava ativa a partir da adição de GalL, indicando assim que a atividade GalLDH altera significativamente a atividade da CTE_m (SANTANA, 2019). Desse modo, pode-se hipotetizar que a GalLDH influencia o processo respiratório mitocondrial.

Santana (2019) observou ainda que a GalLDH interage com os diferentes complexos da CTE_m, podendo ser estimulada ou inibida indiretamente a partir da ação de estimuladores e inibidores dos complexos da CTE_m. Segundo o mesmo autor a GalLDH é estimulada quando os complexos I, III e IV estão inibidos, enquanto que a AOX interfere com a atividade da GalLDH quando esta se encontra ativa ou inativa. A inibição da AOX afetou severamente a atividade da GalLDH resultando na redução significativa ou até mesmo total inibição na produção de AA nos isolados de mitocôndrias de frutos de tomate-cereja e de frutos de mamão. Enquanto que ao se acrescentar DTT, um estimulador da AOX, os níveis de atividade da GalLDH aumentaram significativamente nas mitôndrias isoladas de tomate.

Considerando então a importância que a GalLDH apresenta na síntese de AA e na respiração mitocondrial é possível supor que a mesma interfere no metabolismo da planta. Mutantes de tomate com o gene da enzima silenciado são mais sensíveis ao estresse abiótico, apresentam um crescimento menor, produzem frutos com tamanho reduzido, mesmo quando se sabe que a atividade da enzima não afeta a concentração final de AA nestas plantas (ALHAGDOW et al., 2007). Já a superexpressão da GalLDH em plantas de arroz mostrou uma redução nos níveis de gessamento do grão, um distúrbio fisiológico que afeta a qualidade do mesmo (YU et al., 2015). Esses mesmos autores verificaram que em plantas com menor expressão da enzima apresentam um maior nível de grãos com o distúrbio do gessamento. Estudos com trigo relacionaram a GalLDH com mecanismos estomáticos de tolerância à seca, de modo que alelos que expressavam uma maior atividade da enzima apresentavam uma maior tolerância ao estresse (ZHANG et al., 2016).

Verifica-se, assim que a GalLDH é uma importante enzima para o metabolismo das plantas, muito além da produção apenas de AA, sendo a mesma essencial para o melhor desempenho da CTE_m, assim como apresenta um importante papel no combate a ERO. Contudo, a GalLDH também apresenta um papel antagônico ao considerar o seu papel na produção de AA.

De acordo com Santana (2019), mitocôndrias isoladas de tomate, em presença de GalL no meio, produzem H₂O₂. Com o uso de mutantes de tomate silenciados para a GalLDH, o autor comprovou que a geração dessas ERO se dá

devido à atividade da GalLDH, sendo que a geração de H_2O_2 se correlaciona com o consumo de oxigênio na mitocôndria. Ainda segundo o autor, há forte influência da AOX sobre a atividade GalLDH e produção de H_2O_2 pela enzima, sendo verificada uma inibição na produção de H_2O_2 com a inibição da AOX. No mesmo estudo também observou-se que com a inibição dos complexos I, III e IV houve um estímulo à produção de H_2O_2 pela GalLDH, associado a uma menor produção de AA.

Para compreender melhor sobre a ação antagônica da GalLDH será explicado como a CTE_m gera ERO, assim como a ação que as ERO apresentam sobre as células e por fim como os mecanismos antioxidantes combatem as ERO e como o AA se correlaciona com esses mecanismos.

4.2.2 Produção de ERO e os mecanismos antioxidantes envolvendo AA

De todo o oxigênio consumido pela mitocôndria, cerca de 2-5% são usados para a formação de ERO (GUPTA et al., 2015). Estes são estruturas radicalares ou não radicalares formadas a partir da redução parcial de O_2 . Essas moléculas se apresentam em diferentes formas tais como $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , radical peroxí (RCOO $^{\bullet}$) e radical alcóxi (RCO $^{\bullet}$). As ERO também são encontradas nas formas de H_2O_2 , ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL, 2006).

A produção de ERO pelas mitocôndrias foi descoberta pela primeira vez na década de 60, sendo observada a formação de H_2O_2 pela organela (HINKLE et al., 1967). Anos depois, foi demonstrada a formação de $O_2^{\bullet-}$ pelos complexos da CTE_m. Além disso, o mesmo estudo indicou a atividade da enzima superóxido desmutase (SOD) na mitocôndria, confirmando assim que a forma de ERO produzida pela CTE_m seria o $O_2^{\bullet-}$. Isso porque a SOD catalisa a reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ e a formação de H_2O_2 (LOSHEN; AZZI, 1975).

Assim, mitocôndrias se apresentam como um importante gerador de ERO para as células, nas formas de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Os principais locais de geração de $O_2^{\bullet-}$ na CTE_m são os complexos I e III (GUPTA; IGAMBERDIEV, 2015;

SWEETLOVE; FOYER, 2004; MØLLER, 2001). Estes autores utilizaram inibidores conhecidos específicos para cada complexo, sendo usado rotenona para inibir o complexo I, e a antimicina A para inibir o complexo III, onde percebeu-se que sem a transferência de elétrons pelos complexos havia uma menor produção de ERO na CTEM. Estudos posteriores confirmaram que a UQH₂ é o principal redutor do O₂, de modo que os complexos I e III são os principais geradores de O₂^{•-} devido à sua interação com a UQH₂ (GONCALVES et al., 2015; PATTERSON et al., 2015). Sendo importante ressaltar que, quanto mais UQH₂ formada, maior será a geração de ERO, de modo que ao inibir o complexo III em células musculares de mamíferos foi observado maior produção de H₂O₂ (PEREVOSHCHIKOVA et al., 2013).

Considerando a presença de O₂^{•-} no meio celular, sabe-se que este é capaz de oxidar enzimas que apresentam em sua estrutura ligações ferro-enxofre (4Fe-4S) como as aconitases e desidratases, ou ainda é capaz de reduzir o citocromo c diretamente (IMLAY, 2003). Ao receber um elétron e dois H⁺, o O₂^{•-} é dismutado a H₂O₂. O H₂O₂ não apresenta elétrons desemparelhados, sendo capaz de atravessar as membranas interagindo com aquaporinas (BIENERT et al., 2007). Sabendo que a H₂O₂ é uma molécula relativamente estável e capaz de se locomover livremente nos compartimentos celulares, a mesma tem sido considerada também como uma molécula sinalizadora para o metabolismo quando em baixas concentrações (YAN et al., 2007; NEILL et al., 2002; TORRES et al., 2002). Na mitocôndria, o conteúdo de H₂O₂ aumenta em resposta a diferentes situações e tipos de estresse, tais como alta luminosidade, calor, seca e até mesmo lesões ou ataque de patógenos (SMIRNOFF; ARNAUD, 2019; ZANDALINAS; MITTLER, 2018; WUJESKA et al., 2013; DE GARA et al., 2010).

Como sinalizador, o H₂O₂ consegue influenciar a expressão gênica e modificar os fatores transcricionais ao induzir oxidação de cisteínas e metioninas em proteínas-alvo específicas, ajudando assim na adaptação da planta a estresses bióticos e abióticos (JACQUES et al., 2015). Porém, o H₂O₂ também pode agir como uma molécula danosa, oxidando aminoácidos ou grupos tióis, levando a inativação de proteínas importantes como SOD ou ainda enzimas do Ciclo de Calvin (SMIRNOFF; ARNAUD, 2019). Além disso, o H₂O₂ também pode

levar a inativação de enzimas quinases e fosfatases, ou mesmo fatores de transcrição que contêm tiolato e por fim, o H_2O_2 pode induzir a morte programada da célula (SMIRNOFF; ARNAUD, 2019; DAT et al., 2000; LEEGOOD; WALKER, 1982; KAISER, 1979).

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 são considerados reativos, sendo ambos necessários para a geração de outras formas radicalares com maior potencial de reação, como o HO^{\bullet} , que é considerado a ERO mais deletéria (SHARMA et al., 2012). A geração de HO^{\bullet} pode se dar por meio de dois tipos de reações: *i*) a reação de “Fenton” que através de duas etapas leva à geração de HO^{\bullet} , utilizando de um catalisador metálico, ou *ii*) existe a formação através da reação de “Haber-Weiss” a qual em uma etapa utiliza-se de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 para gerar HO^{\bullet} (Figura 5) (RIGO et al., 1977).

Ao contrário das ERO anteriores, o HO^{\bullet} é extremamente reativo, podendo levar a peroxidação lipídica, além de danos nas membranas e nas proteínas (FOYER et al., 1997). Além disso, na célula não existe um mecanismo para eliminação de HO^{\bullet} , de modo que uma grande concentração do mesmo pode levar à morte celular (SHARMA et al., 2012; PINTO et al., 2003).

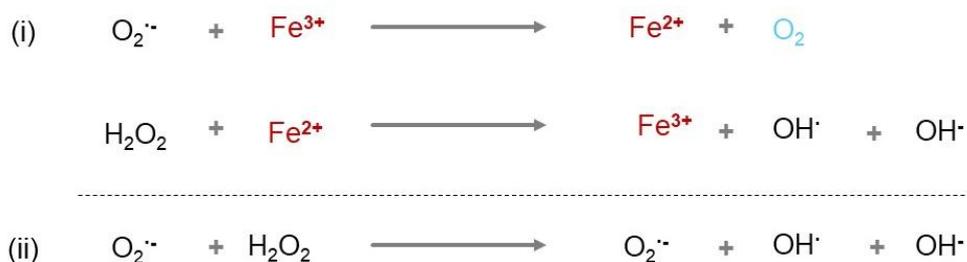


Figura 5: Reações químicas de geração de radicais ERO mais reativos: (i) Reação de Fenton que ocorre em duas etapas entre íons de ferro e ERO, levando a geração de radicais hidroxila. (ii) Reação Haber-Weiss, que ocorre em uma única etapa utilizando-se de dois tipos de ERO menos reativos para formar ERO mais reativos. Em preto se encontram as moléculas de ERO e em vermelho os íons metálicos necessários para a reação ocorre. Enquanto que em azul está representado o produto não reativo, a molécula de oxigênio. $\text{O}_2^{\bullet-}$: radical superóxido. H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. OH^{\bullet} : radical hidroxila ; OH^{\bullet} : hidroxila; Fe^{3+} : íon férrico; Fe^{2+} : íon ferroso; O_2 : oxigênio.

Considerando a formação de ERO nas mitocôndrias devido à atividade da CTE_m, as plantas possuem algumas linhas de defesa contra a produção e acumulação das mesmas. Para se evitar a produção de ERO é necessário que a CTE_m esteja adequadamente oxidada. Sendo que alguns desses mecanismos já foram discutidos anteriormente, como a ativação da AOX, das NAD(P)H desidrogenases alternativas e a atividade UCP. A partir destes mecanismos é possível evitar a superredução da UQ e o aumento do potencial de membrana nas mitocôndrias (MØLLER, 2001). A ação desses mecanismos precisa estar em sintonia com a necessidade de produção de ATP e a quantidade de substratos respiratórios oxidados em função da atividade da CTE_m, de modo a não haver uma redução excessiva de determinado complexo na CTE_m, interrompendo o transporte de elétrons pela mesma.

Além de minimizar a produção de ERO, Møller (2001) considerou que a segunda linha de defesa das plantas contra o acúmulo de ERO, no interior das mitocôndrias, seria a utilização de formas de detoxificação de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . Entre esses mecanismos estão a SOD cuja ação leva a produção de H_2O_2 , além da ação de outras enzimas como a catalase, o ciclo da glutathione peroxidase e ciclo da tioredoxina. Além desses, existem outros mecanismos detoxificadores de ERO que envolvem a presença de AA a serem discutidos a seguir.

4.2.2.1 Detoxificação de ERO envolvendo AA na mitocôndria

Muito se falou sobre a importância da molécula de AA dentro das células. O envolvimento do AA como antioxidante na detoxificação de ERO nas mitocôndrias se dá por duas maneiras principais: oxidação direta da ERO ou através do ciclo ascorbato-glutathione.

O AA é capaz de reduzir H_2O_2 diretamente, de modo que o AA é convertido a MDHA. Ainda, o AA também é capaz de reagir com íons $O_2^{\bullet-}$ e HO^{\bullet} . Contudo, a afinidade dessa reação é muito mais baixa, de modo que o AA age por meio da enzima APX. Assim, indiretamente e agindo como um doador de elétrons para a APX, a enzima que apresenta uma alta afinidade como H_2O_2 , o AA é reduzido

(GUPTA et al., 2016). Logo, de modo direto o AA elimina os radicais livres, enquanto que indiretamente o mesmo é capaz de ajustar outros mecanismos antioxidantes enzimáticos como a APX ou não enzimáticos (ciclo ascorbato-glutationa).

A oxidação direta do $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 pelo AA ocorre como demonstrado na Figura 6 (DEUTSCH, 1998; NISHIKIMI, 1975). A oxidação de $O_2^{\bullet-}$ pode ser realizada pelo AA, levando a formação de H_2O_2 e as formas de AA oxidado: (A) a forma de MDHA ou (B) forma totalmente oxidada, DHA, partindo de uma molécula de AA reduzido (ascorbato) (NISHIKIMI, 1975). Já a oxidação de H_2O_2 pelo AA leva a formação de água e DHA (DEUTSCH, 1998).



Figura 6: Reações químicas que acontecem entre ERO e o AA, de modo a formar peróxido de hidrogênio, ERO menos reativo, como nas reações (A) e (B). Na reação (C) se encontra a redução completa de H_2O_2 pelo AA. Em preto estão as moléculas de ERO, e em laranja estão as moléculas de AA, ou relacionada à mesma, como formas reduzidas e oxidadas. Em verde, os prótons necessários para a equação. E, em azul está representado a água que é formada como subproduto. $O_2^{\bullet-}$: radical superóxido. AA: ácido ascórbico. Asc: ascorbato. H^+ : próton. H_2O_2 : peróxido de hidrogênio. MDHA: ácido monodehidroascórbico. DHA: ácido dehidroascórbico. H_2O : água.

Além da oxidação direta de ERO, o AA também protege a CTE da mitocôndria pela ação do ciclo ascorbato-glutationa, uma vez que o AA é um cofator enzimático para a enzima APX que converte H_2O_2 em água (NOCTOR et al, 2018; NOCTOR, 2006; JIMÉNEZ et al., 1998). Anteriormente foi mencionado a importância do ciclo ascorbato-glutationa como uma fonte de regeneração da molécula do AA, a partir dos intermediários MDHA e DHA que são continuamente interconvertidos em uma forma de ciclagem do AA pelas enzimas MDHAR e DHAR. Além dessas enzimas, o ciclo envolve a enzima GR que converte GSSG

em GSH, sendo que a GSH é então utilizada pela DHAR para converter DHA em AA. As enzimas MDHAR, DHAR e APX são dependentes de AA, sendo que a ação da enzima APX também é muito importante para o ciclo, sendo responsável por transformar AA em MDHA ao mesmo tempo em que converte H_2O_2 em água. Considerando que o AA apresenta baixa afinidade com H_2O_2 , a ação da APX é um passo importante na integração do AA no metabolismo do H_2O_2 (MARUTA; ISHIKAWA, 2017).

Presente somente nos organismos vegetais e em alguns protistas, a APX é uma importante heme-peroxidase (PASSARDI et al., 2007; WELINDER, 1992). Na mitocôndria a APX se apresenta em duas isoformas, localizando-se na membrana externa, sendo uma isoforma voltada para o espaço intermembranar e a outra, voltada para o lado do citosol (CHEW et al., 2003). Desse modo, a APX é capaz de proteger a mitocôndria contra ERO e ainda impedir que o H_2O_2 produzido na organela cause dano a outras organelas, protegendo a célula contra o estresse oxidativo (MARUTA; ISHIKAWA, 2017; JIMÉNEZ et al., 1998). Sendo então possível observar a importância que o AA tem no metabolismo do ERO e como o mesmo é capaz de agir dentro das mitocôndrias, interagindo na proteção e produção de ROS através da enzima GalLDH e sua inter-relação com a CTEM.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O AA é uma molécula muito importante para o metabolismo celular. Nas plantas, o mesmo se faz presente na maioria das etapas do desenvolvimento, sendo importante desde a germinação de sementes até a longevidade dos frutos.

Devido à sua grande importância, diversos estudos foram realizados de modo a compreender sobre seu papel nos organismos vegetais, sendo observado desde sua síntese, transporte e ciclagem a sua ação em diversas organelas. Em sua síntese, a molécula do AA é formada no interior das mitocôndrias pela enzima GalLDH, associada à CTE_m, influenciando no fluxo de elétrons da CTE_m. Essa enzima acoplada ao complexo I da CTE_m, além de participar da síntese do AA também é muito importante para a formação e funcionamento da cadeia. A enzima se relaciona com o processo de transporte de elétrons na CTE_m reduzindo o citocromo c a partir da oxidação do GalL a AA. Desse modo, a síntese de AA se correlaciona com o metabolismo respiratório nas plantas.

Devido à complexa interação da GalLDH à estruturação da CTE_m, mais estudos ainda precisam ser desenvolvidos para entender melhor o papel da GalLDH na montagem e funcionalidade do complexo I e como tudo isso se associa com o funcionamento da CTE_m e a síntese de AA nas plantas. Tendo em vista que poucos estudos exploram a relação entre a AOX e a GalLDH, relação que apresenta um importante impacto na CTE_m, pois a AOX é capaz de estimular

o transporte de elétrons liberando o citocromo c para receber os elétrons provenientes da GalLDH, mais conhecimento nessa área necessita ser gerado. Além disso, é preciso explorar mais a fundo o papel antagônico da enzima na detoxificação de ERO na cadeia tendo em vista que a GalLDH, apesar de produzir um importante antioxidante, também pode gerar ERO dentro da mitocôndria.

Considerando que as mitocôndrias funcionam como centro gerador de energia, um subproduto da produção de ATP pela ação da CTE_m são as ERO. Essas moléculas são altamente reativas podendo oxidar aminoácidos, lipídios e interagir com diversas estruturas celulares. O AA como uma molécula antioxidante é capaz de impedir que ERO sejam formadas em grande quantidade e nas formas mais danosas, podendo até mesmo eliminar a sua produção. Além disso, o AA atua como um cofator para a enzima APX que é uma das principais enzimas envolvidas no metabolismo antioxidante, ao reduzir H₂O₂ a água.

Sabendo disso, é possível afirmar que o AA apresenta um papel muito mais relevante para o metabolismo respiratório do que foi sugerido. Impactando no fluxo de elétrons da CTE_m, na produção de H₂O₂ e na detoxificação do mesmo, confirmando que o AA apresenta-se como uma molécula essencial ao metabolismo vegetal.

Assim sendo, essa revisão de literatura se faz importante, pois reúne os diversos papéis e interações que o AA apresenta no metabolismo respiratório com enfoque na CTE_m, esclarecendo o papel do AA no metabolismo vegetal, bem como sua síntese, transporte e reciclagem. Além disso, também foi explorado o papel do AA na detoxificação de ERO produzida na CTE_m, bem como a relação que a principal enzima formadora de AA tem com a cadeia.

Contudo, apesar dos grandes avanços nos estudos sobre AA que ocorreram nas últimas décadas, ainda pouco se sabe sobre os mecanismos de transporte que se fazem presentes nas mitocôndrias vegetais, uma vez que as mesmas são as fontes geradoras de AA. Além disso, estudos futuros são necessários para compreender melhor o papel da enzima GalLDH na geração de H₂O₂ e qual a importância que a mesma apresenta para o metabolismo vegetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboobucker, S. I.; Lorence, A. (2016) Recent progress on the characterization of aldonolactone oxidoreductases. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 98, p. 171–185.
- Affourtit, C.; Krab, K.; Moore, A. L. (2001) Control of plant mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1504, n. 1, p. 58–69.
- Agius, F.; González-Lamothe, R.; Caballero, J. L.; Muñoz-Blanco, J.; Botella, M. A.; Valpuesta, V. (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology*, v. 21, n. 2, p. 177–181.
- Ahmad, P.; Wani, M. R. (2014) *Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment*. 1. ed. New York: Springer International Publishing.
- Akram, N. A.; Shafiq, F.; Ashraf, M. (2017) Ascorbic acid-a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. April, p. 1-17.
- Al-Huqail, A. A.; Ali, H. M.; Kushwaha, B. K.; Al-Huqail, A. A.; Singh, V. P.; Siddiqui, M. H. (2020) Ascorbic acid is essential for inducing chromium (VI)

toxicity tolerance in tomato roots. *Journal of Biotechnology*, v. 322, n. Vi, p. 66–73.

Alhaghdow, M.; Mounet, F.; Gilbert, L.; Nunes-Nesi, A.; Garcia, V.; Just, D.; Petit, J.; Beauvoit, B.; Fernie, A. R.; Rothan, C.; Baldet, P. (2007) Silencing of the mitochondrial ascorbate synthesizing enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase affects plant and fruit development in tomato. *Plant Physiology*, v. 145, n. 4, p. 1408–1422.

Arrigoni, O.; De Gara, L.; Paciolla, C.; Evidente, A.; De Pinto, M. C.; Liso, R. (1997) Lycorine: A powerful inhibitor of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase activity. *Journal of Plant Physiology*, v. 150, n. 3, p. 362–364.

Arrigoni, O.; De Tullio, M. C. (2002) Ascorbic acid: Much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1569, n. 1–3, p. 1–9.

Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, v. 50, p. 601–639.

Attallah, C. V.; Welchen, E.; Martin, A. P.; Spinelli, S. V.; Bonnard, G.; Palatnik, J. F.; Gonzalez, D. H. (2011) Plants contain two SCO proteins that are differentially involved in cytochrome c oxidase function and copper and redox homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 12, p. 4281–4294.

Attolico, A. D.; De Tullio, M. C. (2006) Increased ascorbate content delays flowering in long-day grown *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 44, n. 7–9, p. 462–466.

Awad, J.; Stotz, H. U.; Fekete, A.; Krischke, M.; Engert, C.; Havaux, M.; Berger, S.; Mueller, M. J. (2015) 2-Cysteine peroxiredoxins and thylakoid ascorbate peroxidase create a water-water cycle that is essential to protect the photosynthetic apparatus under high light stress conditions. *Plant Physiology*, v. 167, n. 4, p. 1592–1603.

Backhausen, J. E.; Kitzmann, C.; Horton, P.; Scheibe, R. (2000) Electron acceptors in isolated intact spinach chloroplasts act hierarchically to prevent

over-reduction and competition for electrons. *Photosynthesis Research*, v. 64, n. 1, p. 1–13.

Badea, G. A.; Tudor, V.; Teodorescu, R. I. (2017) Effects of adding glutathione and ascorbic acid before the alcoholic fermentation of the musts on the sensory profile of the white wines. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, v. LXI, p. 185–194.

Badejo, A. A.; Wada, K.; Gao, Y.; Maruta, T.; Sawa, Y.; Shigeoka, S.; Ishikawa, T. (2012) Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 1, p. 229–239.

Barth, C.; De Tullio, M.; 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, n. 8, p. 1657–1665.

Bartoli, C. G.; Buet, A.; Grozeff, G. G.; Galatro, A.; Simontacchi, M. (2017) Ascorbate-glutathione cycle and abiotic stress tolerance in plants. *In: Hossain, M. A.; Munné-Bosch, S.; Burritt, D. J.; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (Orgs.). Ascorbic Acid In Plant Growth, Development And Stress Tolerance*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, p. 177–200.

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, n. 1, p. 335–343.

Bartoli, C. G.; Senn, M. E.; Gergoff Grozeff, G. E. (2016) Physiological processes contributing to the synthesis of ascorbic acid in plants. *In: Gupta, D. K.; Palma, J.M.; Corpas, F. J. (orgs.). Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*, p. 71–92.

Barzegar, T.; Fateh, M.; Razavi, F. (2018) Enhancement of postharvest sensory quality and antioxidant capacity of sweet pepper fruits by foliar applying calcium lactate and ascorbic acid. *Scientia Horticulturae*, v. 241, n. March, p. 293–303.

Belmonte, M. F.; Yeung, E. C. (2004) The effects of reduced and oxidized

glutathione on white spruce somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, v. 40, n. 1, p. 61–66.

Bienert, G. P.; Møller, A. L.B.; Kristiansen, K. A.; Schulz, A.; Møller, I. M.; Schjoerring, J. K.; Jahn, T. P. (2007) Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 2, p. 1183–1192.

Bilska, K.; Wojciechowska, N.; Alipour, S.; Kalemba, E. M. (2019) Ascorbic acid—the little-known antioxidant in woody plants. *Antioxidants*, v. 8, n. 12, p. 1–23.

Borestein, B. (2017) The Role Of Ascorbic Acid In Plant-Pathogen Interaction. *In: Hossain, M. A.; Munné-Bosch, S. B. D. J; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (orgs.). Ascorbic Acid in Plant Growth, Development and Stress Tolerance*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, p. 255–271.

Bradshaw, M.P.; Barril, C.; Clark, A. C.; Prenzler, P.D.; Scollary, G. R. (2011) Ascorbic acid: A review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 6, p. 479–498.

Brandt, U.; Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 29, n. 3, p. 165–197.

Braun, H.P. (2020) The Oxidative Phosphorylation system of the mitochondria in plants. *Mitochondrion*, v. 53, n. January, p. 66–75.

Braun, H.P.; Binder, S.; Brennicke, A.; Eubel, H.; Fernie, A.R.; Finkemeier, I.; Klodmann, J.; König, A.C.; Kühn, K.; Meyer, E.; Obata, T.; Schwarzländer, M.; Takenaka, M.; Zehrmann, A. (2014) The life of plant mitochondrial complex I. *Mitochondrion*, v. 19, p. 295–313.

Braun, H.P.; Schmitz, U.K. (1992) Affinity purification of cytochrome. *European Journal of Biochemistry*, v. 767, p. 761–767.

Braun, H.P.; Schmitz, U.K. (1995) The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v. 27, n. 4, p. 423–436.

- Braun, H.P.; Zabaleta, E. (2007) Carbonic anhydrase subunits of the mitochondrial NADH dehydrogenase complex (complex I) in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 129, n. 1, p. 114–122.
- Broad, R.C.; Bonneau, J. P.; Hellens, R. P.; Johnson, A. A.T. (2020) Manipulation of ascorbate biosynthetic, recycling, and regulatory pathways for improved abiotic stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 5, p. 1970-1816.
- Buettner, G.R.; Jurkiewicz, B.A. (1996) Catalytic metals, ascorbate and free radicals: Combinations to avoid. *Radiation Research*, v. 145, n. 5, p. 532–541.
- Cai, X.; Ye, J.; Hu, T.; Zhang, Y.; Ye, Z.; Li, H. (2014) Genome-wide classification and expression analysis of nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in tomato. *Plant Growth Regulation*, v. 73, n. 1, p. 19–30.
- Cardol, P. (2011) Mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I) in eukaryotes: A highly conserved subunit composition highlighted by mining of protein databases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1807, n. 11, p. 1390–1397.
- Carr, A. C.; Vissers, M.C.M. (2013) Synthetic or food-derived vitamin C - Are they equally bioavailable? *Nutrients*, v. 5, n. 11, p. 4284–4304.
- Cavaiuolo, M.; Cocetta, G.; Ferrante, A. (2013) The antioxidants changes in ornamental flowers during development and senescence. *Antioxidants*, v. 2, n. 3, p. 132–155.
- Chai, W.; Peng, X.; Liu, B.; Wang, J.; Zhu, Z.; Liu, Y.; Zhao, K.; Cheng, B.; Si, W.; Jiang, H. (2018) Comparative genomics, whole-genome re-sequencing and expression profile analysis of nucleobase:Cation symporter 2 (NCS2) genes in maize. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. June, p. 1–17.
- Chen, C.; Letnik, I.; Hacham, Y.; Dobrev, P.; Ben-Daniel, B.H.; Vanková, R.; Amir, R.; Miller, G. (2014) Ascorbate peroxidase 6 protects arabidopsis desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiology*, v. 166, n. 1, p. 370–383.

- Chen, C.; Twito, S.; Miller, G. (2014) New cross talk between ROS, ABA and auxin controlling seed maturation and germination unraveled in APX6 deficient Arabidopsis seeds. *Plant Signaling and Behavior*, v. 9, n. 12, p. e976489-1-e976489-4.
- Chen, Z.; Gallie, D.R. (2012) Induction of monozygotic twinning by ascorbic acid in Tobacco. *PLoS ONE*, v. 7, n. 6, p. 1–12.
- Chew, O.; Whelan, J.; 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, n. 47, p. 46869–46877.
- Clifton, R.; Lister, R.; Parker, K.L.; Sappl, P.G.; Elhafez, D.; Millar, A. H.; Day, D.A.; Whelan, J. (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, v. 578, p. 193–212.
- Cocetta, G.; Baldassarre, V.; Spinardi, A.; Ferrante, A. (2014) Effect of cutting on ascorbic acid oxidation and recycling in fresh-cut baby spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Postharvest Biology and Technology*, v. 88, p. 8–16.
- Colas Des Francs-Small, C.; Small, I. (2014) Surrogate mutants for studying mitochondrially encoded functions. *Biochimie*, v. 100, n. 1, p. 234–242.
- Conklin, P.L.; Gatzek, S.; Wheeler, G. L.; Dowdle, J.; Raymond, M. J.; Rolinski, S.; Isupov, M.; Littlechild, J. A.; Smirnoff, N. (2006) Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 23, p. 15662–15670.
- Conklin, P. L.; Norris, S. R.; Wheeler, G. L.; Williams, E. H.; Smirnoff, N.; 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 of the United States of America*, v. 96, n. 7, p. 4198–4203.
- Conklin, P.L.; Pallanca, J.E.; Last, R.L.; Smirnoff, N. (1997) L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient Arabidopsis mutant vtc1. *Plant Physiology*, v. 115, n. 3, p. 1277–1285.

- Conklin, P.L.; Saracco, S.A.; Norris, S.R.; Last, R.L. (2000) Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. *Genetics*, v. 154, n. 1, p. 847–856.
- Conklin, P.L.; Williams, E. H.; Last, R. L. (1996) Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient arabidopsis mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 93, n. 18, p. 9970–9974.
- Considine, M.J.; Holtzapffel, R.C.; Day, D.A.; Whelan, J.; Millar, A.H. (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiology*, v. 129, n. 3, p. 949–953.
- Costa, J.H.; Santos, C.P.D.; De Sousa e Lima, B.; Moreira Netto, A.N.; Saraiva, K.D.C.; Arnholdt-Schmitt, B. (2017) In silico identification of alternative oxidase 2 (AOX2) in monocots: A new evolutionary scenario. *Journal of Plant Physiology*, v. 210, p. 58–63.
- Cvetkovska, M.; Vanlerberghe, G.C. (2013) Alternative oxidase impacts the plant response to biotic stress by influencing the mitochondrial generation of reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment*, v. 36, n. 3, p. 721–732.
- Cvetkovska, M.; Vanlerberghe, G.C. (2012) Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide. *New Phytologist*, v. 195, n. 1, p. 32–39.
- Danna, C.H.; Bartoli, C.G.; Sacco, F.; Ingala, L.R.; Santa-María, G.E.; Guiamet, J.J.; Ugalde, R.A. (2003) Thylakoid-bound ascorbate peroxidase mutant exhibits impaired electron transport and photosynthetic activity. *Plant Physiology*, v. 132, n. 4, p. 2116–2125.
- Dat, J.; Vandenabeele, S.; Vranová, E.; Van Montagu, M.; Inzé, D.; Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 57, n. 5, p. 779–795.
- De Gara, L.; Locato, V.; Dipierro, S.; De Pinto, M.C. (2010) Redox homeostasis in plants. The challenge of living with endogenous oxygen production. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, v. 173, n. SUPPL., p.13–19.

- De Gara, L.; Paciolla, C.; De Tullio, M.C.; Motto, M.; Arrigoni, O. (2000) Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of an improved detoxification mechanism against reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, v. 109, n. 1, p. 7–13, 2000.
- De Koning, H.; Diallinas, G. (2000) Nucleobase transporters. *Molecular Membrane Biology*, v. 17, n. 2, p. 75–94.
- De Pinto, M.C.; Francis, D.; De Gara, L. (1999) The redox state of the ascorbate-dehydroascorbate pair as a specific sensor of cell division in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma*, v. 209, n. 1–2, p. 90–97.
- De Pinto, M.C.; De Gara, L. (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 408, p. 2559–2569.
- Des Francs-Small, C.C.; Kroeger, T.; Zmudjak, M.; Ostersetzer-Biran, O.; Rahimi, N.; Small, I.; Barkan, A. (2012) A PORR domain protein required for rpl2 and ccmF C intron splicing and for the biogenesis of c-type cytochromes in Arabidopsis mitochondria. *Plant Journal*, v. 69, n. 6, p. 996–1005.
- Deutsch, J.C. (1998) Ascorbic acid oxidation by hydrogen peroxide. *Analytical Biochemistry*, v. 255, n. 1, p. 1–7.
- Di Matteo, A.; Sacco, A.; Anacleria, M.; Pezzotti, M.; Delledonne, M.; Ferrarini, A.; Frusciante, L.; Barone, A. (2010) The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology*, v. 10, p. 163.
- Dowdle, J.; Ishikawa, T.; Gatzek, S.; Rolinski, S.; Smirnoff, N. (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant Journal*, v. 52, n. 4, p. 673–689.
- Engqvist, M.; Drincovich, M.F.; Flügge, U.I.; Maurino, V.G. (2009) Two D-2-hydroxy-acid dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* with catalytic capacities to participate in the last reactions of the methylglyoxal and β -oxidation

pathways. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 37, p. 25026–25037.

Fang, T.; Zhen, Q.; Liao, L.; Owiti, A.; Zhao, L.; Korban, S. S.; Han, Y. (2017) Variation of ascorbic acid concentration in fruits of cultivated and wild apples. *Food Chemistry*, v. 225, p. 132–137.

Fenech, M.; Amaya, I.; Valpuesta, V.; Botella, M.A. (2019) Vitamin C content in fruits: Biosynthesis and regulation. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 2006.

Fernie, A.R.; Tóth, S.Z. (2015) Identification of the elusive chloroplast ascorbate transporter extends the substrate specificity of the PHT family. *Molecular Plant*, v. 8, n. 5, p. 674–676.

Finkelstein, R.; Reeves, W.; Ariizumi, T.; Steber, C. (2008) Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 387–415.

Fiutak, G.; Michalczyk, M. (2020) Effect of artificial light source on pigments, thiocyanates and ascorbic acid content in kale sprouts (*Brassica oleracea* L. var. Sabellica L.). *Food Chemistry*, v. 330, n. May, p. 127189.

Foyer, C.H.; Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, v. 133, n. 1, p. 21–25.

Foyer, C. H.; Kyndt, T.; Hancock, R.D. (2020) Vitamin C in plants: novel concepts, new perspectives, and outstanding issues. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 32, n. 7, p. 463–485.

Foyer, C.H.; 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, n. 3–4, p. 391–398.

Foyer, C.H.; Lopez-Delgado, H.; Dat, J.F.; Scott, I.M. (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, v. 100, n. 2, p. 241–254, 1997.

Foyer, C.H.; Noctor, G. (2011) Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, v. 155, n. 1, p. 2–18.

- Fraaije, M.W.; Van Berkel, W.J.H.; Benen, J.A.E.; Visser, J.; Mattevi, A. (1998) A novel oxidoreductase family sharing a conserved. *TIBS*, v. 4, n. 98, p. 206–207.
- Franceschi, V.R.; Tarlyn, N.M. (2002) L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology*, v. 130, n. 2, p. 649–656.
- Fry, S.C. (1998) Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal*, v. 332, n. 2, p. 507–515.
- Fukunaga, K.; Fujikawa, Y.; Esaka, M. (2010) Light regulation of ascorbic acid biosynthesis in rice via light responsive cis-elements in genes encoding ascorbic acid biosynthetic enzymes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 74, n. 4, p. 888–891.
- Gallie, D.R. (2013a) L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. *Scientifica*, v. 2013, p. 1–24.
- Gallie, D.R. (2013b) The role of l-ascorbic acid recycling in responding to methylation and chromatin patterning environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 2, p. 433–443.
- Garcia, L.; Welchen, E.; Gey, U.; Arce, A.L.; Steinebrunner, I.; Gonzalez, D.H. (2016) The cytochrome c oxidase biogenesis factor AtCOX17 modulates stress responses in Arabidopsis. *Plant Cell and Environment*, v. 39, n. 3, p. 628–644.
- Gergoff, G.; Chaves, A.; Bartoli, C.G. (2010) Ethylene regulates ascorbic acid content during dark-induced leaf senescence. *Plant Science*, v. 178, n. 2, p. 207–212.
- Gest, N.; Gautier, H.; Stevens, R. (2013) Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule. *Journal of Experimental Botany*, v. 64, n. 1, p. 33–53.
- Goncalves, R.L.S.; Quinlan, C.L.; Perevoshchikova, I.V.; Hey-Mogensen, M.; Brand, M.D. (2015) Sites of superoxide and hydrogen peroxide production by muscle mitochondria assessed ex vivo under conditions mimicking rest and exercise. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 1, p. 209–227.

- González-Reyes, J.A.; Alcaín, F.J.; Caler, J.A.; Serrano, A.; Córdoba, F.; Navas, P. (1994) Relationship between apoplastic ascorbate regeneration and the stimulation of root growth in *Allium cepa* L. *Plant Science*, v. 100, n. 1, p. 23–29.
- Gray, M.W. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, v. 4, n. 9. p. 1476-1481
- Grillet, L.; Ouerdane, L.; Flis, P.; Hoang, M. T.T.; Isaure, M.P.; Lobinski, R.; Curie, C.; Mari, S. (2014) Ascorbate efflux as a new strategy for iron reduction and transport in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 5, p. 2515–2525.
- Gupta, D.K.; Palma, J.M.; Corpas, F.J. (2015) *Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress*. 1. ed. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland.
- Gupta, D.K.; Palma, J.M.; Corpas, F. J. (2016) *Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses*. 1. ed. Switzerland: Springer International Publishing Switzerland.
- Gupta, K.J.; Igamberdiev, A.U. (2015) Compartmentalization of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Production in Plant Cells: An Overview. *In: Gupta, K.J.; Igamberdiev, A.U. (orgs.). Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants*. Switzerland: Springer International Publishing, p. 1–14.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, v. 141, n. June, p. 312–322.
- Hancock, R.D.; Mcrae, D.; Haupt, S.; Viola, R. (2003) Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology*, v. 3, p. 1–13.
- Hancock, R.D.; Viola, R. (2005) Biosynthesis and catabolism of L-ascorbic acid in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 24, n. 3, p. 167–188.
- Hao, J.; Li, X.; Xu, G.; Huo, Y.; Yang, H. (2019) Exogenous progesterone treatment alleviates chilling injury in postharvest banana fruit associated with induction of alternative oxidase and antioxidant defense. *Food Chemistry*, v. 286, n. January, p. 329–337.

- Hasanuzzaman, M.; Borhannuddin Bhuyan, M.H.M.; Anee, T. I.; Parvin, K.; Nahar, K.; Al Mahmud, J.; Fujita, M. (2019) Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, v. 8, n. 9, p. 384-393.
- Haworth, W.N. (1993) The constitution of ascorbic acid. *Journal of the Society of Chemical Industry*, v. 52, n. 23, p. 482–455.
- Heazlewood, J.L.; Howell, K.A.; Millar, A. Harvey. (2003) Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: Orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1604, n. 3, p. 159–169.
- Hervás, M.; Bashir, Q.; Leferink, N.G.H.; Ferreira, P.; Moreno-Beltrán, B.; Westphal, A. H.; Díaz-Moreno, I.; Medina, M.; De La Rosa, M. A.; Ubbink, M.; Navarro, J. A.; Van Berkel, W. J.H. (2013) Communication between L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase and cytochrome c. *FEBS Journal*, v. 280, n. 8, p. 1830–1840.
- Hidalgo, A; Gonzalez-Reyes, J.A.; Navas, P. (1989) Ascorbate free radical enhances vacuolization in onion root meristems. *Plant, Cell & Environment*, v. 12, n. 4, p. 455–460.
- Hinkle, P.C.; Butow, R.A.; Rackers, E. (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 242, n. 22, p. 5169–5173.
- Horemans, N; Szarka, A; De Bock, M; Raeymaekers, T; Potters, G; Levine, M; Banhéggyi, G; Guisez, Y. (2008) Dehydroascorbate and glucose are taken up into Arabidopsis thaliana cell cultures by two distinct mechanisms. *FEBS Journal*, v. 582(18), p. 2714–2718.
- Hossain, M.A.; Asada, K. (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 24, p. 12920–12926.
- Hossain, M.A.; Burritt, D.J; Fujita, M.; Munné-Bosch, S.; Diaz-Vivancos, P.; Lorence, A. (2017). *Ascorbic acid in plant growth, development and stress*.

Springer International Publishing.

- Howell, K.A.; Millar, A.H.; Whelan, J. (2006) Ordered assembly of mitochondria during rice germination begins with promitochondrial structures rich in components of the protein import apparatus. *Plant Molecular Biology*, v. 60, n. 2, p. 201–223
- Huang, S.; Braun, H.P.; Gawryluk, R.M.R.; Millar, A.H. (2019) Mitochondrial complex II of plants: subunit composition, assembly, and function in respiration and signaling. *Plant Journal*, v. 98, n. 3, p. 405–417.
- Huang, S.; Millar, A.H. (2013) Succinate dehydrogenase: The complex roles of a simple enzyme. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 16, n. 3, p. 344–349.
- Imai, T.; Niwa, M.; Ban, Y.; Hirai, M.; Ôba, K.; Moriguchi, T. (2009) Importance of the L-galactonolactone pool for enhancing the ascorbate content revealed by L-galactonolactone dehydrogenase-overexpressing tobacco plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 96, n. 1, p. 105–112.
- Imlay, J. A. (2003) Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology*, v. 57, p. 395–418.
- Iqbal, S.; Inam, A.; Inam, A.; Ashfaq, F.; Sahay, S. (2017) Potassium and waste water interaction in the regulation of photosynthetic capacity, ascorbic acid and capsaicin in chilli (*Capsicum annum* L.) plant. *Agricultural Water Management*, v. 184, p. 201–210.
- Ivanov Kavkova, E.; Blöchl, C.; Tenhaken, R. (2019) The Myo-inositol pathway does not contribute to ascorbic acid synthesis. *Plant Biology*, v. 21, p. 95–102.
- Jacques, S.; Ghesquière, B.; Bock, P.; Demol, H.; Wahni, K.; Willems, P.; Messens, J.; Breusegem, F. V.; Gevaert, K. (2015) Protein methionine sulfoxide dynamics in *Arabidopsis thaliana* under oxidative stress. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 18, p. 1217-1229.
- Jain, A.K.; Nessler, C.L. (2000) Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Molecular Breeding*, v. 6, n. 1, p. 73–78, 2000.

- Jiménez, A.; Hernández, J.A.; Pastori, G.; Del Rio, L. A.; Sevilla, F. (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiology*, v. 118, n. 4, p. 1327–1335.
- Kaiser, W.M. (1979) Reversible inhibition of the calvin cycle and activation of oxidative pentose phosphate cycle in isolated intact chloroplasts by hydrogen peroxide. *Planta*, v. 145, n. 4, p. 377–382.
- Kotchoni, S.O.; Larrimore, K.E.; Mukherjee, M.; Kempinski, C.F.; Barth, C. (2009) Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 149, n. 2, p. 803–815.
- Kuzniak, E.; Kopczewski, T.; Chojak-Kozniewska, J. (2017) Ascorbate-Glutathione Cycle And Biotic Stress Tolerance In Plants. *In*: Hossain, M.A.; Munné-Bosch, S.; Burritt, D.J.; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (Orgs.). *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, p. 201–231.
- Laing, W.A.; Wright, M.A.; Cooney, J.; Bulley, S.M. (2007) The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanyltransferase, increases leaf ascorbate content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 22, p. 9534–9539.
- Law, S.R.; Narsai, R.; Taylor, N.L.; Delannoy, E.; Carrie, C.; Giraud, E.; Harvey M. A.; Small, I.; Whelan, J. (2012) Nucleotide and RNA metabolism prime translational initiation in the earliest events of mitochondrial biogenesis during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiology*, v. 158, n. 4, p. 1610–1627.
- Leegood, R.C.; Walker, D.A. (1982) Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity in leaves. *Planta*, v. 156, n. 5, p. 449–456.
- Leferink, N.G.H.; Van Berkel, W.J.H. (2014) Aldonolactone Oxidoreductases. *In*: Weber, S.; Schleicher, E. (orgs.). *Flavins and flavoproteins: methods and protocols*. Springer Science Business Media: New York, 2014. v. 1146, p. 111.
- Leferink, N.G.H.; Van Den Berg, W.A.M.; Van Berkel, W.J.H. (2008) L-Galactono- γ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in

vitamin C biosynthesis. *FEBS Journal*, v. 275, n. 4, p. 713–726.

- Leferink, N.G.H.; Van Duijn, E.; Barendregt, A.; Heck, A.J.R.; Van Berkel, W.J.H. (2009) Galactonolactone dehydrogenase requires a redox-sensitive thiol for optimal production of vitamin C1. *Plant Physiology*, v. 150, n. 2, p. 596–605.
- Leong, S.Y.; Liu, T.; Oey, I.; Burritt, D.J. (2017) Ascorbic acid in processed plant-based foods. *In: Hossain, M. A.; Munné-Bosch, S.; Burritt, D.J.; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (Orgs.). Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, p. 431–469.
- Li, C.R.; Liang, D.D.; Li, J.; Duan, Y.B.; Li, H.; Yang, Y.C.; Qin, R.Y.; Li, L.; Wei, P.C.; Yang, J.B. (2013) Unravelling mitochondrial retrograde regulation in the abiotic stress induction of rice alternative oxidase genes. *Plant, Cell and Environment*, v. 36, n. 4, p. 775–788.
- Li, M.; Ma, F.; Guo, C.; Liu, J. (2010) Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in apple leaves of different ages. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 4, p. 216–224.
- Li, M.; Ma, F.; Liang, D.; Li, J.; Wang, Y. (2010) Ascorbate biosynthesis during early fruit development is the main reason for its accumulation in kiwi. *PLoS ONE*, v. 5, n. 12, p.14281-14295.
- Li, Z.; Fu, J.; Shi, D.; Peng, Y. (2020) Myo-inositol enhances drought tolerance in creeping bentgrass through alteration of osmotic adjustment, photosynthesis, and antioxidant defense. *Crop Science*, v. 60, n. 4, p. 2149–2158.
- Linster, C.L.; Gomez, T.A.; Christensen, K.C.; Adler, L.N.; Young, B.D.; Brenner, C.; Clarke, S.G. (2007) Arabidopsis VTC2 encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 26, p. 18879–18885.
- Liu, F.; Wang, L.; Gu, L.; Zhao, W.; Su, H.; Cheng, X. (2015) Higher transcription levels in ascorbic acid biosynthetic and recycling genes were associated with higher ascorbic acid accumulation in blueberry. *Food Chemistry*, v. 188, p. 399–

405.

- Locato, V.; Cimini, S.; De Gara, L. (2017) Glutathione as a key player in plant abiotic stress responses and tolerance. *In*: Hossain, M. A.; Munné-Bosch, S.; Burritt, D.J.; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (Orgs.). *Glutathione in plant growth, development, and stress tolerance*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, p. 127–145.
- Loewls, F.A.; Kelly, S. (1961) The metabolism of D-galacturonic ripening and its methyl ester in the detached strawberry. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.95, p.483-493.
- Lorence, A; Chevone, B; Mendes, P; Nessler, C.L. (2004) myo-Inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology*, v. 134, p. 1200–1205.
- Loshen, G; Azzi, A. (1975) On the formation of hydrogen peroxide and oxygen radicals in heart mitochondria. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism*. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/179119/>. Acesso em: 14 dez. 2020.
- Macknight, R.C.; Laing, W.A.; Bulley, S.M.; Broad, R.C.; Johnson, A.; Hellens, R.P. (2017) Increasing ascorbate levels in crops to enhance human nutrition and plant abiotic stress tolerance. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 44, p. 153–160.
- 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, n. 6, p. 1106–1115.
- Makavitskaya, M.; Svistunenko, D.; Navaselsky, I.; Hryvusevich, P.; Mackievic, V.; Rabadanova, C.; Tyutereva, E.; Samokhina, V.; Straltsova, D.; Sokolik, A.; Voitsekhovskaja, O.; Demidchik, V. (2018) Novel roles of ascorbate in plants: induction of cytosolic Ca²⁺ signals and efflux from cells via anion channels. *Journal of Experimental Botany*, v. 69, p. 3477–3489.
- Makhotkina, O.; Araujo, L.D.; Olejar, K.; Herbst-Johnstone, M.; Fedrizzi, B.; Kilmartin, P.A. (2014) Aroma impact of ascorbic acid and glutathione additions

to Sauvignon Blanc at harvest to supplement sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 65, n. 3, p. 388–393.

Mansilla, N.; Garcia, L.; Gonzalez, D.H.; Welchen, E. (2015) AtCOX10, a protein involved in haem o synthesis during cytochrome c oxidase biogenesis, is essential for plant embryogenesis and modulates the progression of senescence. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 21, p. 6761–6775.

Mansilla, N.; Racca, S.; Gras, D.E.; Gonzalez, D.H.; Welchen, E. (2018) The complexity of mitochondrial complex iv: An update of cytochrome c oxidase biogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p.1-34.

Mansilla, N.; Welchen, E.; Gonzalez, D.H. (2019) Arabidopsis SCO proteins oppositely influence cytochrome c oxidase levels and gene expression during salinity stress. *Plant and Cell Physiology*, v. 60, n. 12, p. 2769–2784.

Mapson, L.W.; Breslow, E. (1958) Biological synthesis of ascorbic acid: L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase. *The Biochemical Journal*, v. 68, n. 3, p. 395–406.

Mapson, L.W.; Isherwood, F.A.; Chen, Y.T. (1954) Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of L-galactono-gamma-lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria. *The Biochemical Journal*, v. 56, n. 1, p. 21–28.

Maruta, T.; Ishikawa, T. (2017) Ascorbate peroxidases: Crucial roles of antioxidant enzymes in plant stress responses. *In: Hossain, M.A.; Munné-Bosch, S.; Burritt, D.J.; Diaz-Vivancos, P.; Fujita, M.; Lorence, A. (orgs.). Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, p. 111–127.

Maruta, T.; Yonemitsu, M.; Yabuta, Y.; Tamoi, M.; Ishikawa, T.; Shigeoka, S. (2008) Arabidopsis phosphomannose isomerase 1, but not phosphomannose isomerase 2, is essential for ascorbic acid biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 43, p. 28842–28851.

Massot, C.; Stevens, R.; Génard, M.; Longuenesse, J. J.; Gautier, H. (2011) Light affects ascorbate content and ascorbate-related gene expression in tomato

leaves more than in fruits. *Planta*, v. 234, n. 1, p. 153–163.

- Maurino, V. G.; Grube, E.; Zielinski, J.; Schild, A.r; Fischer, K.; 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, n. 10, p. 1381–1393.
- May, B.; Young, L.; Moore, A. L. (2017) Structural insights into the alternative oxidases: Are all oxidases made equal? *Biochemical Society Transactions*, v. 45, n. 3, p. 731–740.
- Melino, V.J.; Soole, K.L.; 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. 1–14.
- Millar, A. H.; Eubel, H.; Jänsch, L.R.; Kruft, V.; Heazlewood, J. L.; Braun, H. P. (2004) Mitochondrial cytochrome c oxidase and succinate dehydrogenase complexes contain plant specific subunits. *Plant Molecular Biology*, v. 56, n. 1, p. 77–90.
- 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.
- 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 response. *Plant Physiology*, v. 133, p. 443–447.
- Mishra, S.K.; Belur, P.D.; Iyyaswami, R. (2021) Use of antioxidants for enhancing oxidative stability of bulk edible oils: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 56, n. 1, p. 1–12.
- Miyaji, T.; Kuromori, T.; Takeuchi, Y.; Yamaji, N.; Yokosho, K.; Shimazawa, A.i; Sugimoto, E.; Omote, H.; Ma, J. F.; Shinozaki, K.; Moriyama, Y. (2015) AtPHT4;4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, v. 6, p.1-11.
- Miyake, C.; Cao, W.H.; Asada, K. (1993) Purification and molecular properties of the thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and*

Cell Physiology, v. 34, n. 6, p. 881–889.

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.

Moore, A.L.; Shiba, T.; Young, L.; Harada, S.; Kita, K.; Ito, K. (2013) Unraveling the heater: new insights into the structure of the alternative oxidase. *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, p. 637–663.

Murphy, L.J.; Robertson, K.N.; Harroun, S.G.; Brosseau, C.L.; Werner-Zwanziger, U.; Moilanen, J.; Tuononen, H.M.; Clyburne, J.A.C. (2014) A simple complex on the verge of breakdown: Isolation of the elusive cyanofolate ion. *Science*, v. 344, n. 6179, p. 75–78.

Mutsuda, M.; Ishikawa, T.; Takeda, T.; Shigeoka, S. (1995) Subcellular localization and properties of l-galactono- γ -lactone dehydrogenase in spinach leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 59, n. 10, p. 1983–1984.

Neill, S.; Desikan, R.; Hancock, J. (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 5, n. 5, p. 388–395.

Nickle, T.C.; Meinke, D.W. (1998) A cytokinesis-defective mutant of *Arabidopsis* (*cyt1*) characterized by embryonic lethality, incomplete cell walls, and excessive callose accumulation. *Plant Journal*, v. 15, n. 3, p. 321–332.

Nishikimi, M. (1975) Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 63, n. 2, p. 463–468.

Njus, D.; Kelley, P.M.; Tu, Y.J.; Schlegel, H.B. (2020) Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 159, n. May, p. 37–43.

Noctor, G. (2006) Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell and Environment*, v. 29, n. 3, p. 409–425.

Noctor, G.; Reichheld, J. P.; Foyer, C. H. (2018) ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 80, p. 3–12.

- Noreen, S.; Sultan, M.; Akhter, M.S.; Shah, K.H.; Ummara, U.; Manzoor, H.; Ulfat, M.; Alyemeni, M.N.; Ahmad, P. (2021) Foliar fertigation of ascorbic acid and zinc improves growth, antioxidant enzyme activity and harvest index in barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 158, p. 244–254.
- Ntagkas, N.; Woltering, E. J.; Marcelis, L.F.M. (2018) Light regulates ascorbate in plants: An integrated view on physiology and biochemistry. *Environmental and Experimental Botany*, v. 147, n. October 2018, p. 271–280.
- Nunes-Nesi, A.; Sweetlove, L.J.; Fernie, A.R. (2007) Operation and function of the tricarboxylic acid cycle in the illuminated leaf. *Physiologia Plantarum*, v. 129, n. 1, p. 45–56.
- O’leary, B.M.; Asao, S.; Millar, A.H.; Atkin, O.K. (2019) Core principles which explain variation in respiration across biological scales. *New Phytologist*, v. 222, n. 2, p. 670–686.
- Ôba, 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 Biochemistry*, v. 117, p. 120–124.
- Olmos, E.; Kiddle, G.; Pellny, T.K.; Kumar, S.; Foyer, C.H. (2006) Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 8, p. 1645–1655.
- Ozcelik, M.; Ambros, S.; Morais, S.; Kulozik, U. (2020) Storage stability of dried raspberry foam as a snack product: Effect of foam structure and microwave-assisted freeze drying on the stability of plant bioactives and ascorbic acid. *Journal of Food Engineering*, v. 270, n. July, p. 109779.
- Paciolla, C.; Fortunato, S.; Dipierro, N.; Paradiso, A.; De Leonardis, S.; Mastropasqua, L.; De Pinto, M. C. (2019) Vitamin C in plants: from functions to biofortification. *Antioxidants*, v. 8, n. 11, p. 1-26.
- Padu, E. (1999) Apoplastic peroxidases, ascorbate and lignification in relation to nitrate supply in wheat stem. *Journal of Plant Physiology*, v. 154, n. 5–6, p.

576–583.

- Parsons, H.L.; Yip, J.Y.H.; Vanlerberghe, G.C. (1999) Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. *Plant Physiology*, v. 121, n. 4, p. 1309–1320.
- Pascal, N.; Dumas, R.; Douce, R. (1990) Comparison of the kinetic behavior toward pyridine nucleotides of NAD⁺-linked dehydrogenases from plant mitochondria. *Plant Physiology*, v. 94, n. 1, p. 189–193.
- Passardi, F.; Bakalovic, N.; Teixeira, F.K.; Margis-Pinheiro, M.; Penel, C.; Dunand, C. (2007) Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics*, v. 89, n. 5, p. 567–579.
- Paszkiwicz, G.; Gualberto, J.M.; Benamar, A.; Macherel, D.; Logan, D.C. (2017) Arabidopsis seed mitochondria are bioenergetically active immediately upon imbibition and specialize via biogenesis in preparation for autotrophic growth. *Plant Cell*, v. 29, n. 1, p. 109–128.
- Pateraki, I.; Sanmartin, M.; Kalamaki, M.S.; Gerasopoulos, D.; 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, n. 403, p. 1623–1633.
- Patterson, H.C.; Gerbeth, C.; Thiru, P.; Vögtle, N.F.; Knoll, M.; Shahsafaei, A.; Samocha, K.E.; Huang, C.X.; Harden, M.M.; Song, R.; Chen, C.; Kao, J.; Shi, J.; Salmon, W.; Shaul, Y.D.; Stokes, M.P.; Silva, J.C.; Bell, G.W.; Macarthur, D.G.; Lodish, H.F. (2015) A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 112, n. 42, p. E5679–E5688.
- Perevoshchikova, I.V.; Quinlan, C.L.; Orr, A.L.; Gerencser, A.A.; Brand, M.D. (2013) Sites of superoxide and hydrogen peroxide production during fatty acid oxidation in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 1, p. 298–309.

- Pineau, B.; Layoune, O.; Danon, A.; De Paepe, R. (2008) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 47, p. 32500–32505.
- Pinto, E.; Sigaud-Kutner, T.C.S.; Leitão, M.A.S.; Okamoto, O.K.; Morse, D.; Colepicolo, P. (2003) Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *Journal of Phycology*, v. 39, n. 6, p. 1008–1018.
- Poyton, R. O.; Mcewen, J. E. (1996) Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annual Review of Biochemistry*, v. 65, p. 563–607.
- Proietti, S.; Moscatello, S.; Famiani, F.; Battistelli, A. (2009) Increase of ascorbic acid content and nutritional quality in spinach leaves during physiological acclimation to low temperature. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 47, n. 8, p. 717–723.
- Purvis, A.C. (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, v. 100, n. 1, p. 165–170.
- Purvis, A.C.; Shewfelt, R. L. (1993) Does the alternative pathway ameliorate chilling injury in sensitive plant tissues? *Physiologia Plantarum*, v. 88, n. 4, p. 712–718.
- Rasmusson, A.G.; Escobar, M.A.; Hao, M.; Podgórska, A.; Szal, B. (2020) Mitochondrial NAD(P)H oxidation pathways and nitrate/ammonium redox balancing in plants. *Mitochondrion*, v. 53, n. January, p. 158–165.
- Rasmusson, A.G.; Geisler, D.A.; Møller, I.M. (2008) The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion*, v. 8, n. 1, p. 47–60.
- Rasmusson, A.G.; Handa, H.; Møller, I.M. (2008) Plant mitochondria, more unique than ever. *Mitochondrion*, v. 8, n. 1, p. 1–4.
- Rasmusson, A.G.; Møller, I.M. (2011) Mitochondrial electron transport and plant stress. *Plant Mitochondria*. v.1, p. 357–381.
- Rigo, A.; Stevanato, R.; Finazzi-Agro, A.; Rotilio, G. (1977) An attempt to evaluate

the rate of the haber-weiss reaction by using ·OH radical scavengers. *FEBS Letters*, v. 80, n. 1, p. 130–132.

Rodríguez-Ruiz, M.; Mateos, R.M.; Codesido, V.; Corpas, F. J.; Palma, J. M. (2017) Characterization of the galactono-1,4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis: Role of nitric oxide. *Redox Biology*, v. 12, n. Agosto 2017, p. 171–181.

Saga, G; Giorgetti, A.; Fufezan, C.; Giacometti, G.M.; Bassi, R.; Morosinotto, T. (2010) Mutation analysis of violaxanthin de-epoxidase identifies substrate-binding sites and residues involved in catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 31, p. 23763–23770.

Santana, D.B. (2019) *Transporte de elétrons via l-galactono-1,4-lactona respiração mitocondrial em frutos*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Campos dos Goytacazes - RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, 83p.

Sazanov, L. A. (2015) A giant molecular proton pump: Structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 16, n. 6, p. 375–388.

Scheibe, R. (2019) Maintaining homeostasis by controlled alternatives for energy distribution in plant cells under changing conditions of supply and demand. *Photosynthesis Research*, v. 139, n. 1–3, p. 81–91.

Schertl, P.; Sunderhaus, S.; Klodmann, J.; Gergoff Grozeff, G. E.; Bartoli, C. G.; Braun, H. P. (2012) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of three subcomplexes of mitochondrial complex I in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 18, p. 14412–14419.

Schimmeyer, J.; Bock, R.; Meyer, E.H. (2016) L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, v. 90, n. 1–2, p. 117–126.

Schopfer, P. (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: Implications for the control of elongation growth. *Plant Journal*, v. 28, n. 6, p. 679–688.

- Selinski, J.; Scheibe, R.; Day, D. A.; Whelan, J. (2018) Alternative oxidase is positive for plant performance. *Trends in Plant Science*, v. 23, n. 7, p. 588–597.
- Senkler, J.; Senkler, M.; Braun, H.P. (2017) Structure and function of complex I in animals and plants – a comparative view. *Physiologia Plantarum*, v. 161, n. 1, p. 6–15.
- Sharma, P.; Jha, A.B.; Dubey, R.S.; Pessarakli, M. (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, v. 2012, p. 1–26.
- Sharova, E. I.; Medvedev, S. S.; Demidchik, V. V. (2020) Ascorbate in the apoplast: metabolism and functions. *Russian Journal of Plant Physiology*, v. 67, n. 2, p. 207–220.
- Shi, X.; Germain, A.; Hanson, M. R.; Bentolila, S. (2016) RNA recognition motif-containing protein ORRM4 broadly affects mitochondrial RNA editing and impacts plant development and flowering. *Plant Physiology*, v. 170, n. 1, p. 294–309.
- Sikora, M.; Świeca, M. (2018) Effect of ascorbic acid postharvest treatment on enzymatic browning, phenolics and antioxidant capacity of stored mung bean sprouts. *Food Chemistry*, v. 239, p. 1160–1166.
- Smirnoff, N.; Critchley, C. (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 355, n. 1402, p. 1455–1464.
- Smirnoff, N. (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 116–129.
- Smirnoff, N.; Arnaud, D. (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, v. 221, n. 3, p. 1197–1214.
- Smirnoff, N.; Conklin, P.L.; Loewus, F.A. (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 52, n. 1, p. 437–467.
- Smirnoff, N.; Wheeler, G.L.; Loewus, F.A. (2000) Ascorbic acid in plants:

biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 19, n. 4, p. 267–290.

Smith, A.M.O.; Ratcliffe, R.G.; Sweetlove, L.J. (2004) Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 50, p. 51944–51952.

Smith, C.A.; Melino, V.J.; Sweetman, C.; Soole, K.L. (2009) Manipulation of alternative oxidase can influence salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum*, v. 137, n. 4, p. 459–472.

Soto, I.C.; Barrientos, A. (2016) Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis is regulated by the redox state of a heme-binding translational activator. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 24, n. 6, p. 281–298.

Stasolla, C.; Yeung, E.C. (2001) Ascorbic acid metabolism during white spruce somatic embryo maturation and germination. *Physiologia Plantarum*, v. 111, n. 2, p. 196–205.

Stasolla, C.; Belmonte, M.F.; Tahir, M.; Elhiti, M.; Khamiss, K.; Joosen, R.; Maliepaard, C.; Sharpe, A.; Gjetvaj, B.; Boutilier, K. (2008) Buthionine sulfoximine (BSO)-mediated improvement in cultured embryo quality in vitro entails changes in ascorbate metabolism, meristem development and embryo maturation. *Planta*, v. 228, n. 2, p. 255–272.

Stasolla, C.; Yeung, E.C. (2007) Cellular ascorbic acid regulates the activity of major peroxidases in the apical poles of germinating white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 45, n. 3–4, p. 188–198.

Steinebrunner, I.; Gey, U.; Andres, M.; Garcia, L.; Gonzalez, D.H. (2014) Divergent functions of the Arabidopsis mitochondrial SCO proteins: HCC1 is essential for COX activity while HCC2 is involved in the UV-B stress response. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 1–17.

Steinebrunner, I.; Landschreiber, M.; Krause-Buchholz, U.; Teichmann, J.; Rödel, G. (2011) HCC1, the Arabidopsis homologue of the yeast mitochondrial copper chaperone SCO1, is essential for embryonic development. *Journal of*

Experimental Botany, v. 62, n. 1, p. 319–330.

Sunderhaus, S.; Klodmann, J.; Lenz, C.; Braun, H.P. (2010) Supramolecular structure of the OXPHOS system in highly thermogenic tissue of *Arum maculatum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 4, p. 265–272.

Svirbely, J. L.; Szent-Györgyi, A (1932) The chemical nature of vitamin C. *Biochemistry Journal*, v.23, n.3, p. 865-870.

Sweetlove, L.J.; Beard, K.F.M.; Nunes-Nesi, A.; Fernie, A.R.; Ratcliffe, R.G. (2010) Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in Plant Science*, v. 15, n. 8, p. 462–470.

Sweetlove, L.J.; Foyer, C.H. (2004) Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. In: Day, D. A.; Millar, A.H.; Whelan, J. (orgs.). *Plant mitochondria: from genome to function*. Kluwer Academic Publishers, p. 307–320.

Szarka, A.; Bánhegyi, G.; Asard, H. (2013) The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 19, n. 9, p. 1036–1044.

Szarka, A.; Horemans, N.; Bánhegyi, G.; Asard, H. (2004) Facilitated glucose and dehydroascorbate transport in plant mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 428, n. 1, p. 73–80.

Szarka, A.; Tomasskovics, B.; Bánhegyi, G. (2012) The ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in abiotic stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 4, p. 4458–4483.

Szecowka, M.; Heise, R.; Tohge, T.; Nunes-Nesi, A.; Vosloh, D.; Huege, J.; Feil, R.; Lunn, J.; Nikoloski, Z.; Stitt, M.; Fernie, A. R.; Arrivault, S. (2013) Metabolic fluxes in an illuminated Arabidopsis rosette. *Plant Cell*, v. 25, n. 2, p. 694–714.

Tabata, K.; Takaoka, T.; Esaka, M. (2002) Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochemistry*, v. 61, n. 6, p. 631–635.

Taiz, L.; Zeiger, E.; Moller, I.; Murphy, A. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6th ed. São Paulo: Artmed.

- Tamaoki, M.; Mukai, F.; Asai, N.; Nakajima, N.; Kubo, A.; Aono, M.; Saji, H. (2003) Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono- γ -lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, v. 164, n. 6, p. 1111–1117.
- Tommasi, F.; Paciolla, C.; Arrigoni, O. (1999) The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiologia Plantarum*, v. 105, n. 2, p. 193–198.
- Tommasi, F.; Paciolla, C.; Pinto, M.C.; Gara, L. (2001) A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, n. 361, p. 1647–1654.
- Torres, M.A.; Dangl, J.L.; Jones, J.D.G. (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 1, p. 517–522.
- Tóth, S.Z.; Nagy, V.; Puthur, J.T.; Kovács, L.; Garab, G. (2011) The physiological role of ascorbate as photosystem II electron donor: Protection against photoinactivation in heat-stressed leaves. *Plant Physiology*, v. 156, n. 1, p. 382–392.
- Tóth, S.Z.; Puthur, J.T.; Nagy, V.; Garab, G. (2009) Experimental evidence for ascorbate-dependent electron transport in leaves with inactive oxygen-evolving complexes. *Plant Physiology*, v. 149, n. 3, p. 1568–1578.
- Tóth, S.Z.; Schansker, G.; Garab, G.; Strasser, R.J. (2007) Photosynthetic electron transport activity in heat-treated barley leaves: The role of internal alternative electron donors to photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1767, n. 4, p. 295–305.
- Tovar-Méndez, A.; Miernyk, J.A.; Randall, D.D. (2003) Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in plant cells. *European Journal of Biochemistry*, v. 270, n. 6, p. 1043–1049.
- Truffault, V.; Gest, N.; Garchery, C.; Causse, M.; Duboscq, R.; Riqueau, G.; Sauvage, C.; Gautier, H.; Baldet, P.; Stevens, R. (2014) Variation in tomato fruit ascorbate levels and consequences of manipulation of ascorbate metabolism

on drought stress tolerance. *Acta Horticulturae*, v. 1048, p. 75–84.

- Truffault, V.; Fry, S.C.; Stevens, R.G.; Gautier, H. (2017) Ascorbate degradation in tomato leads to accumulation of oxalate, threonate and oxalyl threonate. *Plant Journal*, v. 89, n. 5, p. 996–1008.
- Tsaniklidis, G.; Delis, C.; Nikoloudakis, N.; Katinakis, P.; Aivalakis, G. (2014) Low temperature storage affects the ascorbic acid metabolism of cherry tomato fruits. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 84, p. 149–157.
- Tyburski, J.; Dunajska-Ordak, K.; Skorupa, M.; Tretyn, A. (2012) Role of ascorbate in the regulation of the *Arabidopsis thaliana* root growth by phosphate availability. *Journal of Botany*, v. 2012, p. 1–11.
- Valandro, F.; Menguer, P.K.; Cabreira-Cagliari, C.; Margis-Pinheiro, M.; Cagliari, A. (2020) Programmed cell death (PCD) control in plants: New insights from the *Arabidopsis thaliana* deathosome. *Plant Science*, v. 299, n. July, p. 110603.
- Van Hove, L.W.A.; Bossen, M. E.; San Gabino, B. G.; Sgreva, C. (2001) The ability of apoplastic ascorbate to protect poplar leaves against ambient ozone concentrations: A quantitative approach. *Environmental Pollution*, v. 114, n. 3, p. 371–382.
- Vanacker, H.; Carver, T. L.W.; Foyer, C. H. (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, v. 117, n. 3, p. 1103–1114.
- Vanlerberghe, G.C.; Dahal, K.; Alber, N.A.; Chadee, A. (2020) Photosynthesis, respiration and growth: A carbon and energy balancing act for alternative oxidase. *Mitochondrion*, v. 52, n. April, p. 197–211.
- Vanlerberghe, G.C.; Martyn, G.D.; Dahal, K. (2016) Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. *Physiologia Plantarum*, v. 157, n. 3, p. 322–337.
- Ververidis, P.; John, P. (1991) Complete recovery in vitro of ethylene-forming enzyme activity. *Phytochemistry*, v. 30, n. 3, p. 725–727.

- Vishwakarma, A.; Tetali, S.D.; Selinski, J.; Scheibe, R.; Padmasree, K. (2015) Importance of the alternative oxidase (AOX) pathway in regulating cellular redox and ROS homeostasis to optimize photosynthesis during restriction of the cytochrome oxidase pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, v. 116, n. 4, p. 555–569.
- Wanniarachchi, V.R.; Dametto, L.; Sweetman, C.; Shavrukov, Y.; Day, D.A.; Jenkins, C.L.D.; Soole, K.L. (2018) Alternative respiratory pathway component genes (AOX and ND) in rice and barley and their response to stress. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 1–22.
- Welchen, E.; Gonzalez, D.H. (2016) Cytochrome c, a hub linking energy, redox, stress and signaling pathways in mitochondria and other cell compartments. *Physiologia Plantarum*, v. 157, n. 3, p. 310–321.
- Welchen, E.; Hildebrandt, T.M.; Lewejohann, D.; Gonzalez, D.H.; Braun, H.P. (2012) Lack of cytochrome c in *Arabidopsis* decreases stability of Complex IV and modifies redox metabolism without affecting Complexes I and III. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1817, n. 7, p. 990–1001.
- Welchen, E.; Schmitz, J.; Fuchs, P.; García, L.; Wagner, S.; Wienstroer, J.; Schertl, P.; Braun, H. P.; Schwarzländer, M.; Gonzalez, D. H.; Maurino, V. G. (2016) D-lactate dehydrogenase links methylglyoxal degradation and electron transport through cytochrome. *Plant Physiology*, v. 172, n. 2, p. 901–912.
- Welinder, K.G. (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 2, p. 388–393.
- Weng, L.; Bai, X.; Zhao, F.; Li, R.; Xiao, H. (2016) Manipulation of flowering time and branching by overexpression of the tomato transcription factor SIZFP2. *Plant Biotechnology Journal*, v. 14, n. 12, p. 2310–2321.
- Wheeler, G.L.; Jones, M.A.; Smirnoff, N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, v. 393, p. 365–369.
- Wikström, M.; Sharma, V. (2018) Proton pumping by cytochrome c oxidase – A 40 year anniversary. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1859, n. 9, p. 692–698.

- Wirth, C.; Brandt, U.; Hunte, C.; Zickermann, V. (2016) Structure and function of mitochondrial complex i. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1857, n. 7, p. 902–914.
- Wolucka, B. A.; Van Montagu, M. (2003) GDP-Mannose 3',5'-Epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 48, p. 47483–47490.
- Wujeska, A.; Bossinger, G.; Tausz, M. (2013) Responses of foliar antioxidative and photoprotective defence systems of trees to drought: A meta-analysis. *Tree Physiology*, v. 33, n. 10, p. 1018–1029.
- Yabuta, Y.; Yoshimura, K.; Takeda, T.; Shigeoka, S. (2000) Molecular characterization of tobacco mitochondrial L-galactono- γ -lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant and Cell Physiology*, v. 41, n. 6, p. 666–675.
- Yan, J.; Tsuichihara, N.; Etoh, T.; Iwai, S. (2007) Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. *Plant, Cell and Environment*, v. 30, n. 10, p. 1320–1325.
- Ye, N.; Zhu, G.; Liu, Y.; Zhang, A.; Li, Y.; Liu, R.; Shi, L.; Jia, L.; Zhang, J. (2012) Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 5, p. 1809–1822.
- Yoshida, K.; Watanabe, C.K.; Hachiya, T.; Tholen, D.; Shibata, M.; Terashima, I.; Noguchi, K. (2011). Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high-light environments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, v. 34, n. 4, p. 618–628.
- Yu, L.; Gao, B.; Li, Y.; Tan, W.; Li, M.; Zhou, L.; Peng, C.; Xiao, L.; Liu, Y. (2020). The synthesis of strigolactone is affected by endogenous ascorbic acid in transgenic rice for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase suppressed or overexpressing. *Journal of Plant Physiology*, v. 246–247.
- Yu, L.; Liu, Y.; Lu, L.; Zhang, Q.; Chen, Y.; Zhou, L.; Chen, H.; Peng, C. (2017) Ascorbic acid deficiency leads to increased grain chalkiness in transgenic rice

for suppressed of L-GalLDH. *Journal of Plant Physiology*, v. 211, p. 13–26.

Yu, L.; Liu, Y.; Tong, J.; Ding, J.; Wang, R.; Peng, C.; Xiao, L. (2015) Reduced grain chalkiness and its possible physiological mechanism in transgenic rice overexpressing L-GalLDH. *Crop Journal*, v. 3, n. 2, p. 125–134.

Zabaleta, E.; Martin, M. V.; Braun, H. (2012) A basal carbon concentrating mechanism in plants? *Plant Science*, v. 187, p. 97–104.

Zancani, M.; Peresson, C.; Patui, S.; Tubaro, F.; Vianello, A.; Macrì, F. (2007). Mitochondrial ferritin distribution among plant organs and its involvement in ascorbate-mediated iron uptake and release. *Plant Science*, v. 173, n. 2, p. 182–189.

Zandalinas, S. I.; Mittler, R. (2018) ROS-induced ROS release in plant and animal cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 21–27.

Zarrillo, A.; Minutolo, M.; Alioto, D.; Errico, A. (2017) Ascorbic acid regulation in leaves and fruits of tomato ecotypes infected by eggplant mottled dwarf virus. *Scientia Horticulturae*, v. 225, n. July, p. 512–524.

Zechmann, B. (2018) Compartment-specific importance of ascorbate during environmental stress in plants. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 29, n. 15, p. 1488–1501.

Zechmann, B. (2014). Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, n.14, p. 1–11.

Zechmann, B.; Stumpe, M.; Mauch, F. (2011) Immunocytochemical determination of the subcellular distribution of ascorbate in plants. *Planta*, v. 233, n. 1, p. 1–12.

Zhang, J.; Li, B.; Yang, Y.; Mu, P.; Qian, W.; Dong, L.; Zhang, K.; Liu, X.; Qin, H.; Ling, H.; Wang, D. (2016) A novel allele of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is associated with enhanced drought tolerance through affecting stomatal aperture in common wheat. *Scientific Reports*, v. 6, n. June, p. 1–15.

Zhu, Y.; Luo, X.; Nawaz, G.; Yin, J.; Yang, J. (2020) Physiological and biochemical

responses of four cassava cultivars to drought stress. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 1–12.

Zsigmond, L.; Tomasskovics, B.; Deák, V.; Rigó, G.; Szabados, L.; Bánhegyi, G.; Szarka, A. (2011) Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 49, n. 8, p. 809–815.

Zulfiqar, F.; Ashraf, M. (2021) *Bioregulators: unlocking their potential role in regulation of the plant oxidative defense system*. 1 ed. Springer Netherlands.

Zushi, K.; Suehara, C.; Shirai, M. (2020) Effect of light intensity and wavelengths on ascorbic acid content and the antioxidant system in tomato fruit grown in vitro. *Scientia Horticulturae*, v. 274, p. 109673-109680.