

**TRANSPORTE DE ELÉTRONS VIA L-GALACTONO-1,4-LACTONA
DESIDROGENASE (GaILDH) E SUA RELAÇÃO COM A
RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM FRUTOS**

DIEDERSON BORTOLINI SANTANA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MAIO – 2019**

TRANSPORTE DE ELÉTRONS VIA L-GALACTONO-1,4-LACTONA
DESIDROGENASE (GaILDH) E SUA RELAÇÃO COM A
RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM FRUTOS

DIEDERSON BORTOLINI SANTANA

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

Orientador: Professor Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MAIO – 2019

FICHA CATALOGRÁFICA
UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

S232 Santana, Diederson Bortolini.

Transporte de elétrons via L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) e sua relação com a respiração mitocondrial em frutos / Diederson Bortolini Santana.- Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

83 f. : il.

Bibliografia: 69-81.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2019.

Orientador: Jurandi Gonçalves de Oliveira.

1. L-galactono-1,4-lactona desidrogenase. 2. Cadeia Transportadora de Elétrons Mitocondrial. 3. Oxidase Alternativa. 4. Peróxido de Hidrogênio. 5. Ácido Ascórbico.
I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 630.

TRANSPORTE DE ELÉTRONS VIA L-GALACTONO-1,4-LACTONA
DESIDROGENASE (GaILDH) E SUA RELAÇÃO COM A
RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL EM FRUTOS

DIEDERSON BORTOLINI SANTANA

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

Aprovada em 10 de Maio de 2019

Comissão Examinadora:



Prof. Claudete Santa-Catarina (D.Sc., Biotecnologia) - UENF



Prof. Gonçalo Apolinario de Souza Filho (D. Sc., Biociências e Biotecnologia) - UENF



Prof. Eldo Campos (D. Sc., Biociências e Biotecnologia) - UFRJ



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

Dedico

Para Davi, Samuel e Adão.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), pela infraestrutura e oportunidade de cursar o doutorado;

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro;

A CAPES pelo apoio e concessão de bolsa;

Ao meu orientador, Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira, pelo ensino, dedicação, paciência e confiança;

Aos professores de cada disciplina por manterem a perseverança em tempos de exaltação à ignorância;

Aos meus pais Adão e Marta e à minha Irmã Diesther por todo apoio e por estarem comigo em todo tempo;

Ao meu parceiro Marcelo Cardoso por estar comigo em todos os momentos;

Aos amigos de Linhares que possuem meu amor, em especial Marcos Cassoli, Laila Mourad, Weslei Carvalho, Rodrigo Rabelo, Sonia Lopes e Juliete Penedo;

Um agradecimento especial a Gláucia Michelle Cosme Silva pelo otimismo incansável, amizade e dedicação ao meu trabalho;

Aos amigos do laboratório, em especial os que ainda estão por aqui Edinaldo Sena, Eduardo Augusto, Isabelle Matos, Bárbara Silva e Raissa Hufnagel;

Aos colegas que estão longe, mas continuam a contribuir com o trabalho
Willian Batista Silva e André Vicente de Oliveira;

A Caliman Agricola S/A pelo fornecimento dos frutos de mamão e apoio
desde sempre;

Ao Luis Miguel Mazorra Morales pelas boas ideias e o incentivo durante o
mestrado e doutorado;

Agradeço a todos que de alguma forma e em qualquer momento tenham
contribuído para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Perspectiva histórica e importância do ácido ascórbico.....	17
2.2. Importância do AA sobre o desenvolvimento vegetal e o amadurecimento de frutos	20
2.3. Metabolismo do AA e o processo respiratório	24
2.4. Mitocôndrias como centros geradores de H ₂ O ₂	30
2.4.1. Regulação da produção de H ₂ O ₂ pelo processo bioenergético mitocondrial	30
2.4.2. AA controlando os níveis de H ₂ O ₂	32
2.5. Justificativa teórica e hipótese	33
3. OBJETIVO	35
3.1. Objetivo geral.....	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1. Material vegetal.....	36
4.2. Caracterização pós-colheita	37
4.3. Purificação de mitocôndrias.....	37
4.4. Quantificação da atividade respiratória.....	38
4.5. Atividade da GalLDH	40
4.6. Produção de AA.....	40
4.7. Relação da GalLDH na biossíntese de H ₂ O ₂	41
4.8. Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
6. RESUMO E CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

$^1\text{O}_2$ - Oxigênio Singleto AA - Ácido Ascórbico
ACC – Ácido 1-aminociclopropeno-1-carboxílico ADP - Adenosina difosfato
ANOVA - Análise de variância AOX - Alternativa Oxidase APX - Ascorbato
Peroxidase ATP - Adenosina Trifosfato BSA - Albumina de soro bovino CAT -
Catalase
Cit c - Citocromo c
COX – Citocromo c oxidase - Complexo IV CR - Coeficiente respiratório
CTE - Cadeia transportadora de elétrons DHA - Dehidroascorbato
DIC - Delineamento inteiramente casualizado DPI - Difenileniodônio
ERO - Espécies reativas de oxigênio GalL - L-galactono-1,4-lactona
GalLDH - L-galactono-1,4-lactona desidrogenase GR - Glutathione Redutase
 H^+ - Próton
 H_2O_2 - Peróxido de Hidrogênio $\text{HO}\cdot$ - Radical Hidroxila
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance
Hue - Ângulo de cor Hue L^* - Luminosidade
MDHA - Monodehidroascorbato
MDHAR - Monodehidro Ascorbato Redutase O^- – Ânion SuperóxidoPMI
Fosfomanose Isomerase
PMM - Fosfomanose Mutase S4 - Estádio 4 da respiração SAM - S-adenosil L-
metionina
SHAM - Ácido Salicilhidroxâmico SOD - Superóxido Dismutase SS - Sólidos
solúveis
UcP - Proteína desacopladora UQ - Ubiquinona
WT - Tipo selvagem

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Estrutura da molécula de AA proposta por Howorth em 1933-----	17
Tabala 1 - Caracterização pós-colheita de três genótipos de tomate, sendo um do tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14) com o silenciamento da GalLDH e 'Golden' -----	39
Figura 2 - Taxa de consumo de O ₂ total e específica para COX e AOX em mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de três genótipos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14) com o silenciamento da GalLDH -----	41
Figura 3 - Taxa de consumo de O ₂ total e específica para COX e AOX em mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de mamão 'Golden'-----	42
Figura 4 - Taxa de consumo de O ₂ via GalLDH e específica para COX e AOX em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14)-----	44
Figura 5 - Taxa de consumo de O ₂ via GalLDH e específica para COX e AOX em mamão "golden" -----	45
Figura 6 - Taxa de consumo de O ₂ via GalLDH e específica para COX e AOX em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14)-----	47
Figura 7 - Taxa de consumo de O ₂ via GalLDH e específica para COX e AOX em mamão 'Golden'-----	49
Figura 8 - Atividade GalLDH via redução do citocromo c (Cit c) em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-	

13 e 8-14) -----	51
Figura 9 - Atividade GalLDH via redução do citocromo c (Cit c) em frutos 'Golden'- -----	52
Figura 10 - Formação de H ₂ O ₂ via GalLDH em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14)-----	54
Figura 11 - Formação de H ₂ O ₂ via GalLDH em 'Golden'. Utilizado GalL (substrato ativador da GalLDH)-----	55
Figura 12 - Acúmulo de AA via GalLDH em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14)-----	58
Figura 13 - Acúmulo de AA via GalLDH em 'Golden'. Utilizado um controle contendo apenas extrato de mitocôndrias purificado -----	59
Figura 14 - Modelo ilustrativo das principais influências dos complexos da CTE sobre a atividade GalLDH na produção de AA e H ₂ O ₂ -----	61

RESUMO

A última etapa da via de biossíntese do ácido ascórbico (AA) em vegetais ocorre no interior das mitocôndrias e é catalisada por uma enzima encontrada nas cristas mitocondriais como uma subunidade do Complexo I, a L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) que converte o L-galactono-1,4-lactona (GalL) em AA. Dados preliminares indicam a geração de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas de vegetais quando o substrato oxidável disponível é o GalL. A princípio este seria um evento controverso levando em consideração a importância do AA para o sistema antioxidante vegetal. Com o objetivo de investigar este evento e relacioná-lo ao transporte de elétrons em mitocôndrias isoladas de frutos de mamão 'Golden' e tomate foram realizadas as seguintes análises: caracterização pós-colheita dos frutos utilizados durante as análises para padronização, quantificação da atividade respiratória via consumo de O_2 utilizando eletrodo de O_2 do tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK), atividade GalLDH via redução do citocromo c por espectrofotometria, acúmulo de AA via cromatografia líquida, geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via GalLDH por meio de fluorescência em mitocôndrias isoladas. Os tratamentos envolvem a adição de substratos e inibidores dos componentes da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTE), sendo eles NADH (estimulador do complexo I), ADP (para detectar fosforilação das mitocôndrias, DTT (estimulador da oxidase alternativa), SHAM (inibidor da oxidase alternativa), rotenona (inibidor do complexo I), succinato (estimulador do complexo II), malonato (inibidor do complexo II), antimicina A (inibidor do complexo III), azida (inibidor do complexo e DPI (inibidor de flavoenzimas como a GalLDH). Entre os

genótipos de tomate utilizados, o mutante 5-13 (subexpressando a GalLDH) apresentou o maior consumo de O_2 , bem como maior fosforilação. Em nenhuma das duas espécies avaliadas foi possível inibir completamente a atividade das oxidases terminais quando o substrato oxidável era o GalL, indicando a ativação de outro mecanismo de consumo de O_2 quando a GalLDH está ativa. A manutenção do consumo de O_2 foi atribuída à geração de H_2O_2 via GalLDH. Os resultados indicam ainda relação entre a GalLDH e a atividade da oxidase alternativa (AOX), sendo esta moduladora da formação de AA, bem como da respiração via GalL e geração de H_2O_2 . É possível que a atividade GalLDH e sua transferência de elétrons para a CTE, além de fazer parte do sistema de controle das espécies reativas de oxigênio, também atue como parte de um sistema de sinalização por meio da geração de H_2O_2 , sendo a AOX a moduladora deste sistema em vegetais.

ABSTRACT

The last step of the ascorbic acid (AA) biosynthesis process in culture occurs inside the mitochondria and is catalyzed by an enzyme in the mitochondria crests as a subunit of Complex I, an L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) converting L-galactono-1,4-lactone (GalL) to AA. Preliminary data indicate the generation of H₂O₂ in plant-isolated mitochondria when the available oxidizable substrate is GalL. This would be a paradoxical event taking into account the importance of GalLDH and AA for the plant antioxidant system. In order to investigate this event and to relate it to the transport of electrons in mitochondria isolated from 'Golden' papaya fruits and three tomato genotypes, one of them being wild (WT) and two mutants (5-13 and 8-14) underexpressing the GalLDH activity, the following analytics were performed: post-harvest characterization of fruits during post-harvest analysis, quantification of respiratory function via O₂ consumption using Clark electrode (Hansatech, Respire 1, UK), GalLDH activity via spectrophotometry, AA accumulation via liquid chromatography, generation of H₂O₂ via GalLDH in isolated mitochondria. The treatments involve the addition of substrates and inhibitors of mitochondrial electron transport chain (CTE) components, such as NADH (complex I stimulator), ADP (to detect mitochondrial phosphorylation), DTT (alternative oxidase stimulator), SHAM (inhibitor of alternative oxidase), succinate (complex II stimulator), malonate (complex I inhibitor), antimycin A (complex III inhibitor), azide (IV complex inhibitor), and DPI (flavoenzymes inhibitor such as GalLDH). Genotype 5-13 showed higher O₂

consumption as well as higher phosphorylation. In none of the evaluated species it was possible to completely inhibit the activity of the terminal oxidases when the oxidizable substrate was GalL, indicating the activation of another O₂ consumption mechanism when GalLDH is active. Maintenance of O₂ consumption was attributed to the generation of H₂O₂ via GalLDH. The results indicate the relationship between GalLDH and the activity of the alternative oxidase (AOX), being this modulator of AA formation as well as respiration via GalL and generation of H₂O₂. It is possible that the activity GalLDH and its transference of electrons to the CTE set up a network to combat reactive oxygen species as well as a signaling system through the generation of H₂O₂, AOX being the modulator of this system in plants.

1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) é uma molécula universalmente conhecida pelas suas inúmeras vantagens para a saúde humana. Com o passar do tempo, o AA foi sendo associado a padrões de vida saudáveis, fazendo assim, que haja atenção maior aos produtos hortifrutícolas reconhecidos como fonte de AA e elevando a produção de alimentos aos quais se adiciona vitamina C, como é amplamente conhecido.

Estruturalmente conhecido como L-treo-hex-2-enono-1,4-lactona, o AA tem sua principal função como antioxidante, associada à sua ciclagem no metabolismo, onde constantemente sua forma varia entre monodehidroascorbato (MDHA) e dehidroascorbato (DHA) (Foyer, 2017).

Quanto ao processo antioxidante celular não enzimático, as moléculas de ascorbato, glutatona e α -tocoferol atuam como eficientes consumidores de espécies reativas de oxigênio (ERO) em vegetais, existindo então a necessidade de que estas moléculas estejam em concentrações relativamente elevadas (Barbosa et al., 2014). O AA atua como um importante eliminador dos radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e ânion superóxido (O_2^-), também apresenta importância na atividade antioxidante enzimática, sendo utilizado pela APX (ascorbato peroxidase) para converter peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água.

Este processo ocorre tanto em mitocôndrias quanto em cloroplastos, locais de maior intensidade na produção de ERO. Assim, o AA sendo utilizado pela APX evita danos causados pelas ERO sobre a atividade respiratória e funcionamento do

fotossistema I (Dietz, 2016). Desta forma, o AA caracteriza-se como importante metabólito no funcionamento adequado tanto do processo fotossintético quanto respiratório em vegetais.

Outra função associada ao metabolismo antioxidante do AA está na conservação de frutas e hortaliças, onde a concentração de AA influencia no tempo de prateleira. O escurecimento destes produtos gerado pela oxidação enzimática leva à perda de sabor e aroma, desqualificando tais produtos. Alguns trabalhos demonstram a importante atividade antioxidante do AA, influenciando diretamente contra o processo degradativo destes produtos (Silva et al., 2009; Landi et al., 2015)

A síntese de AA em vegetais se dá em dois subcompartimentos celulares, iniciando-se no citosol e finalizando a biossíntese no interior das mitocôndrias. A biossíntese inicia-se com a conversão de manose-6-P para L-galactose, a qual será metabolizada por uma série de enzimas citosólicas até gerar o L-galactono-1,4-lactona (GalL) (Pateraki et al., 2004).

A formação do GalL possibilita sua entrada no interior das mitocôndrias. É neste ambiente, mais precisamente acoplada ao complexo I da respiração, que a L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH), enzima que catalisa a última etapa da síntese do AA, oxida o GalL formando o AA. Paralelamente a este evento há a redução do citocromo c, o qual ao ser oxidado pela citocromo c oxidase (COX), complexo IV da respiração, contribui de forma indireta para o metabolismo respiratório (Pateraki et al., 2004).

As mitocôndrias estão envolvidas diretamente no metabolismo antioxidante vegetal. Nas mitocôndrias ocorre uma parte significativa da biossíntese do AA; este processo ocorre paralelo à formação de ATP e também se dá na cadeia transportadora de elétrons (CTE), onde se encontra a GalLDH. Devido à relação próxima entre a respiração e a síntese de AA, há indícios de que estes dois processos causem influências entre si. Assim, a produção de energia e de AA poderiam atuar com regulação mútua (Schimmeyer et al., 2016).

Por causa da função sinalizadora das espécies reativas de oxigênio, as plantas possuem vários locais geradores de radicais livres. Por este motivo, não é rara a ocorrência de desbalanço na formação destas moléculas com conseqüente acúmulo destes em níveis tóxicos.

A formação de H_2O_2 , ERO que dá origem ao $OH\cdot$, tem significativa produção intracelular em pontos distintos, sendo os principais locais, os

cloroplastos, os peroxissomos e as mitocôndrias. Nas mitocôndrias, o transporte de elétrons na CTE da respiração é o local dos principais pontos geradores de H_2O_2 (Huang et al., 2016; Noctor et al., 2018). Por este motivo, no interior das mitocôndrias existem sistemas eficazes no controle dos níveis elevados de H_2O_2 . Entre estes sistemas, como já mencionado, está o AA, sendo este um dos mais importantes cofatores para atividade de APX, além de sua importância na remoção química direta de radicais livres (Foyer & Noctor, 2011; Gómez et al., 2008; Rahantaniaina et al., 2017).

Componentes diretamente associados ao transporte de elétrons mitocondrial contribuem para minimizar a geração de H_2O_2 durante a oxidação de substratos respiratórios e o transporte de elétrons até o O_2 . Entre estes, pode-se citar a proteína desacopladora (UcP) e a alternativa oxidase (AOX). A AOX, comum em vegetais, reduz o O_2 a H_2O , recebendo elétrons diretamente do *pool* de ubiquinona (UQ), sem passar pela COX, deixando de passar pelo complexo III (importante local gerador de radicais livres). Com a atividade da via AOX, há menor fluxo de prótons (H^+) para o espaço intermembranar, diminuindo a formação do gradiente eletroquímico e a energização da membrana interna da mitocôndria, facilitando o transporte de elétrons entre os complexos, evitando que estes elétrons sejam desviados gerando radicais livres como o H_2O_2 (Popov et al., 1997; Huang et al., 2016). Pela proximidade da GalLDH e sua atividade ao processo respiratório, é possível que estes sistemas de combate aos níveis tóxicos de radicais livres possam estar associados, podendo apresentar-se como componentes interdependentes no combate às espécies reativas de oxigênio, incluindo o H_2O_2 .

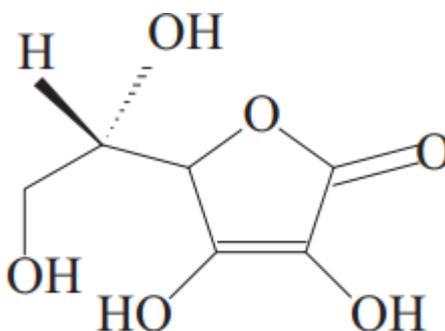
Ainda não se conhece em que passo da fosforilação oxidativa a síntese de AA pode estar influenciando, quer seja positiva ou negativamente. O que se conhece até o momento é que estes dois processos estão correlacionados, principalmente porque a formação de AA contribui com a formação de parte do potencial de membrana pelo transporte de elétrons na CTE, já que os elétrons provenientes da oxidação do GalL contribuem para o bombeamento de prótons para o espaço intermembranar.

Assim, o presente estudo busca esclarecer os mecanismos que correlacionam a respiração mitocondrial e a síntese de AA, compreender a influência de cada um dos complexos transportadores de elétrons da CTE sobre a GalLDH, assim como a influência da GalLDH e a CTE sobre a geração de H_2O_2 .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Perspectiva histórica e importância do ácido ascórbico

Em 1932 foi obtido o isolado do componente conhecido como AA a partir de fontes vegetais e animais, a cristalização do composto ativo e as evidências esclareceram que o composto cristalino e o AA na realidade eram a mesma substância (Svirbely, 1932). Pouco menos de um ano depois, em 1933, o professor Norman Haworth propôs a estrutura do AA possibilitando a sua síntese comercial (Figura 1). A partir deste ponto, iniciou-se a produção industrial de AA, facilitando o acesso a um suprimento ilimitado do componente, abrindo novas perspectivas para a exploração de seus efeitos fisiológicos, bioquímicos, bem como suas propriedades biomédicas (Haworth, 1933; Reichstein et al., 1933).



Estrutura do Ácido ascórbico

Figura 1 - Estrutura da molécula de AA proposta por Norman Howorth em 1933 (Souza et al., 2015).

O avanço nos conhecimentos a respeito do AA foi de grande importância para a população mundial. Muitas enfermidades ocorreram ao longo dos anos devido à falta de AA e do pouco conhecimento a respeito da molécula e seus benefícios para a saúde. O escorbuto, por exemplo, doença muito comum em humanos durante séculos, teve sua importância pelo desconhecimento do AA. Esta foi uma doença comum em séculos passados, principalmente entre os navegadores, que passavam longos períodos sem acesso às frutas cítricas e verduras frescas durante suas viagens (Butler e Gash, 1993).

Na atualidade, a utilização do AA é tão ampla quanto o conhecimento a seu respeito já alcançado. Uma gama enorme de alimentos como cereais matinais, refrigerantes e enlatados contém AA sintético. Essa adição também ocorre em carnes para ajudar a manter a coloração desejável e prevenção da formação de nitrosaminas a partir de nitrito de sódio usado como um inibidor do crescimento de microrganismos em alimentos (Snyder, 1995; Kirschnik., 2013). Como já foi mencionado, o AA é altamente eficiente na captura de ERO, desempenhando papel bastante importante, removendo os radicais livres e facilitando o transporte de elétrons intracelulares. Em mamíferos, também facilita a absorção de Fe pelo intestino, por se tratar de um redutor, mantendo assim o ferro sempre em sua forma reduzida, o que possibilita a absorção daquele elemento.

Como foi destacado, o AA constitui componente essencial para a dieta e metabolismo animal. Daí a grande necessidade da ingestão de vegetais, já que em humanos a biossíntese desta vitamina não ocorre naturalmente. Em vegetais ocorre a síntese, não obstante, para estes o AA também caracteriza-se como composto vital para o desenvolvimento. Nos vegetais o AA é fundamental não só por sua importante característica antioxidante, mas também porque o AA faz-se crucial em várias etapas do metabolismo e diversas fases do seu desenvolvimento.

Um estudo promovido por Deuner et al. (2008) dá uma demonstração de como o AA influencia outros processos além da atividade antioxidante das enzimas já conhecidas. Estes autores perceberam brusca queda transpiratória em cafeeiro em decorrência da aplicação de AA, a aplicação exógena de AA ao diminuir os níveis de H_2O_2 promove a reabertura dos estômatos dando vazão para transpiração, de forma indireta, favorecendo o processo fotossintético.

Há também evidências de que o AA funciona como um estimulador de brotações favorecendo a regeneração vegetal. Flores et al. (2012), demonstram que explantes de Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) desenvolvidos em solução com concentração de 0,05% de AA apresentam melhor regeneração de brotações além de possuírem menores índices de oxidação, proporcionando assim desenvolvimento vegetal progressivo. O AA também pode ser utilizado em meios de cultivo *in vitro* com o intuito de minimizar danos por necrose e escurecimento dos tecidos.

O AA também tem função importante em alguns órgãos vegetais isoladamente, atuando de forma determinante sobre o metabolismo destes. Um exemplo disso são os frutos, cuja qualidade tende a diminuir de acordo com os níveis de AA encontrados. A diminuição nos teores de AA provoca escurecimento não enzimático proporcionando sabor desagradável (Melo et al., 2009). O AA também pode ser utilizado como um importante indicador da estabilidade e conservação de hortifrutícolas, por ser uma molécula termolábil, sua presença e estabilidade indicam que os demais nutrientes estão em estado conservado, pois o AA é uma das primeiras moléculas a serem degradadas. Assim, conforme os frutos se desenvolvem e começam a amadurecer, a quantidade de radicais livres tende a se elevar em decorrência do processo respiratório, que em alguns casos tende a se elevar, neste contexto os teores de AA também se elevam como resposta combativa ao excesso de ERO (Silva et al., 2009; Landi et al., 2015).

Outras funções do AA no metabolismo vegetal são sua atuação como cofator enzimático, atuando na síntese de fitorreguladores como etileno e ácido giberélico, importantes para o desenvolvimento das plantas, também atua na síntese de hidroxiprolina, antocianinas e outros metabólitos secundários, além de relatos deste composto participando de respostas a ataques de patógenos (Smirnoff, 2001; Resende et al., 2003).

Os níveis deste importante componente para o sistema antioxidante vegetal sofrem influência de diversos fatores, como luminosidade, disponibilidade de substratos e deficiência nutricional, como a falta de potássio e enxofre (Freitas et al., 2006; Pinelas et al., 2018; Souza et al., 2018).

Compreender como se dá a influência da síntese do AA sobre a respiração mitocondrial vegetal é um passo muito importante na compreensão das diversas funções desta molécula no metabolismo das plantas.

2.2. Importância do AA sobre o desenvolvimento vegetal e o amadurecimento de frutos

Os frutos são componentes essenciais na alimentação humana, isto se deve ao significativo aporte de vitaminas, como o AA, carboidratos e minerais. Quando colhidos, estes órgãos se tornam extremamente suscetíveis à degradação. No caso dos frutos tidos como climatéricos, após o desligamento da planta mãe, esse iniciará um contínuo processo de transformações metabólicas influenciando diretamente nos atributos físicos e químicos que tornarão esse fruto mais palatável. Estas transformações irão melhorar as características de aroma, sabor e textura do fruto, todavia culminará na sua total degradação, processo este relativamente rápido. Em muitas espécies frutíferas, a concentração de AA também sofrerá variações significativas durante esta fase do desenvolvimento, influenciando completamente a qualidade e a fisiologia do amadurecimento destes órgãos (Silva et al., 2017; Silva et al., 2018).

Apesar de intensas e rápidas durante a fase de amadurecimento, as transformações na fisiologia e nas características químicas e físicas do fruto ocorrem em todas as suas fases de desenvolvimento, desde a antese até o fim da senescência. Entre as transformações químicas, as mudanças na concentração de AA também acompanham este ritmo de mudanças. Assim, pode-se reconhecer pelo menos quatro estádios fisiológicos durante o desenvolvimento de frutos que se iniciam logo após a fecundação, são eles: a etapa de crescimento, maturação, amadurecimento e senescência. O crescimento é marcado por sucessivas divisões celulares e expansão celular; na maturação observa-se bruscas mudanças estruturais cuja etapa final é denominada amadurecimento, momento em que estes processos transformadores se intensificam, afetando a qualidade sensorial destes órgãos. Ao fim ocorre a senescência, momento em que predominam os processos degradativos que resultam na morte dos tecidos. Em todas estas etapas é possível detectar diferentes concentrações endógenas de AA (Chitarra e Chitarra 2005; Osorio et al., 2013).

As concentrações de AA podem chegar a triplicar ao fim do estágio de crescimento e início da fase de amadurecimento, como no caso da gabioba (*Campomanesia pubescens*) demonstrado por Silva et al. (2009). Nesta espécie, os autores observam aumento na concentração de AA a partir de 33 dias após a antese e posterior queda entre 53 e 63 dias, período compreendido já como final

do processo de amadurecimento e início da senescência. Neste momento os frutos apresentaram aproximadamente 0,6% de AA, teor considerado relativamente elevado quando comparado a outras frutíferas.

Ao atingir a fase de amadurecimento, as concentrações de AA continuam sofrendo variações, principalmente neste momento, em que as características organolépticas do órgão irão mudar significativamente tornando-o mais aceitável para os propósitos comestíveis (Oliveira et al., 2011; Valente et al., 2011; Ornelas-Paz et al. 2013; Pinto et al., 2013). Na fase de amadurecimento observa-se o completo desenvolvimento das sementes, mudanças na cor e textura da polpa, taxa respiratória e de produção de etileno, alterações na permeabilidade celular, mudanças químicas no perfil dos carboidratos, dos ácidos orgânicos e das proteínas, a composição de substâncias fenólicas também se modifica além da formação de substâncias voláteis (Nhung et al., 2010; Kubola e Siriamornpus 2011; Teixeira et al., 2016). Quando iniciado o amadurecimento, ocorre a síntese de novos mRNAs, junto com compostos responsáveis pelas mudanças de sabor e coloração tanto da polpa quanto da casca, esta síntese é subsidiada pelo processo respiratório, etapa importante na geração de AA como será discutido a diante (Chitarra e Chitarra, 2005; Sampaio et al., 2007; Jiménez et al., 2011).

Nesta fase do desenvolvimento, os frutos podem ser classificados em dois grandes grupos a depender do padrão respiratório destes; existem aqueles considerados climatéricos e os não climatéricos. Os frutos do tipo climatéricos apresentam durante a fase de amadurecimento elevação na taxa respiratória, constantemente acompanhada por um pico na produção de etileno, hormônio vegetal conhecido por ativar o processo de amadurecimento. (Azzolini et al., 2004; Chitarra e Chitarra, 2005; Silva et al., 2009; Paul et al., 2012).

É conhecida a importância do etileno na degradação da clorofila e síntese de antocianinas e carotenoides, processo responsável pela mudança na coloração, além de sua clara influência no processo respiratório tendendo ao aumento em frutos considerados climatéricos (Chitarra e Chitarra, 2005; Aguila et al., 2011; Azevedo e Santos, 2011). O etileno constitui um dos principais fatores que influenciam o amadurecimento em frutos climatéricos, como no caso do mamão, podendo influenciar direta e indiretamente o processo respiratório, bem como a síntese de AA (Gergoff et al., 2009; Mazon et al., 2013; Souza et al., 2014).

Em muitas espécies, durante o período de amadurecimento a concentração

de AA tende a elevar-se (Morgado et al., 2010; Campos et al., 2012; da Silva Pereira et al., 2014). Isso provavelmente ocorre devido ao aumento da disponibilidade de substratos conhecidos da via de síntese do AA, resultante da degradação da parede celular, bastante significativa, durante esta fase (Smirnoff et al., 2001). Esse processo se dá pela degradação de polissacarídeos constituintes da parede celular, elevando a disponibilidade de galactose, conhecido precursor da biossíntese de AA (Smirnoff et al., 2001; Tezotto et al., 2011; Pinto et al., 2013).

Existe uma gama de estudos a respeito da relação entre o metabolismo vegetal e o AA, como, por exemplo protegendo o aparelho fotossintético do excesso de ERO, bem como na fotorrespiração quando a APX oxida H_2O_2 e AA gerando H_2O e dehidroascorbato, a produção de conhecimentos a respeito do papel do AA no apoplasto flexibilizando a parede celular possibilitando a expansão da célula. Todavia, ainda há muito a ser conhecido sobre o metabolismo do AA, sua síntese e os mecanismos no catabolismo adjacente, como é regulado, como se dá seu transporte e sua compartimentalização, todos processos vitais no metabolismo vegetal (Davey et al., 2000). Estas dúvidas, também se estendem à fisiologia de frutos durante a pós-colheita e sua relação com o metabolismo do AA durante a fase de amadurecimento.

Assim como nos demais tecidos, nos frutos ocorre uma constante ciclagem do AA. Em ambiente seco o ácido ascórbico é estável, mas em solução pode se oxidar facilmente, principalmente na presença de baixas quantidades de cobre e ferro alcalino. O produto desta oxidação é o monodehidroascorbato (MDHA), também conhecido como ascorbato livre que pode ser metabolizado mais uma vez tornando-se dehidroascorbato (DHA). *In vivo*, o MDHA é geralmente reduzido de volta a AA pela atividade de uma enzima dependente de NADP conhecida como monodehidroascorbato redutase, ou a redução pode ocorrer pela transferência de elétrons para o AA. Estas moléculas são instáveis, sofrem constantes ciclagens e podem se oxidar irreversivelmente sempre que em meio aquoso (Davey et al., 2000).

Outra função de significativa importância do AA em vegetais é sua ação como cofator enzimático, contribuindo e facilitando a atividade de enzimas importantes para o metabolismo vegetal. Podemos citar várias enzimas que utilizam o AA como cofator, a exemplo da lisina hidroxilase atuando na hidrólise de lisina, 2-oxoglutarato 3 dioxigenase atuando na hidroxilação da prolina, violaxantina

de-epoxidase facilitando a formação da zeaxantina e mantendo o ciclo das xantofilas ativo, tiocluosidase glucohidrolase importante enzima do catabolismo das glucosinolases, além de atuar como cofator de enzimas responsáveis pela síntese de hormônios importantes do desenvolvimento vegetal tal como a giberelina e etileno (Davey et al., 2000; Smirnov, 2001; Peteraki et al., 2004; Deuner et al., 2008; Foyer e Shigeoka, 2011).

No metabolismo de frutos, o AA se torna extremamente importante como cofator da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilase, enzima fundamental na rota biossintética do etileno, sem a qual o desenvolvimento e as transformações que tornam o fruto apto ao consumo humano são impossibilitados. O cofator desta enzima é o ferro, a atuação do AA possibilita a conversão do ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) em etileno no último passo da formação deste hormônio (Devey et al., 2000).

Estas enzimas que têm o AA como cofator são geralmente mono ou dioxigenases, contendo íons ferro ou cobre em seu sítio ativo, exigindo então a presença de AA para sua máxima atividade. O AA atua mantendo os centros iônicos de metais de transição em sua forma reduzida, potencializando assim a atividade destas. Em certos casos, outros agentes redutores podem substituir parcialmente a ação do AA desde que estejam em concentrações elevadas. (Davey et al., 2000; Meng et al., 2014).

Uma das principais funções do AA, como já mencionado, é sua capacidade de desintoxicação das ERO, além de sua importância também no metabolismo de frutos. Estas reações de controle dos níveis de ERO são parte importante para o bom funcionamento de um organismo aeróbico e concentrações elevadas de AA, inclusive em frutos, é indicação de que o metabolismo antioxidante está em pleno funcionamento. Assim, o equilíbrio de várias etapas do metabolismo vegetal está associado a níveis positivos de AA disponível.

Assim, encontram concentrações de AA bastante variáveis em várias espécies de frutos, umas bastante elevadas com características nutricionais interessantes e outras nem tanto. Frutos como acerolas, goiabas e os citros de modo geral são conhecidos por sua elevada concentração de AA contendo até 1010,0 mg por 100 g de fruto (Matsuura et al., 2001; Branco et al., 2007). Concentrações de AA elevadas também são observadas em morango, mamão, limão, manga e amora preta (Marinho et al., 2001; Calegari et al., 2002; Brandão

et al., 2003; Antunes et al., 2003; Serpa et al., 2015; Brackmann et al., 2015; Alves et al., 2015).

Algumas espécies que têm consumo diminuto no país também podem apresentar concentrações interessantes de AA, tais como a cajarana, o cupuaçu, caju, noni, açai, jambo, pitanga, jabuticaba e cambuci, espécies relativamente pouco exploradas comercialmente com evidente potencial nutricional (Valillo et al., 2005).

De forma geral, os níveis de AA durante todo o desenvolvimento dos frutos passa por variações. Especificamente na fase de maturação e amadurecimento os teores de AA vão se elevando como já foi mencionado. Isso é evidenciado em uma gama de espécies, pode citar o maracujá- amarelo, fruta-de-lobo, goiaba, cajarana, mamão e atemóia (Júnior et al., 2003; Silva et al., 2009; Morgado et al., 2010; Aroucha et al., 2012).

2.3. Metabolismo do AA e o processo respiratório

A síntese do AA em vegetais está associada à degradação dos polissacarídeos da parede celular, que ocorre em maior intensidade na maioria das espécies durante a fase de amadurecimento quando os frutos, principalmente aqueles de polpa carnosa, perdem a consistência da polpa, tornando-se mais macios (Smirnoff, 2001). Segundo Smirnoff. (2001), a rota biossintética do AA inicia-se com atuação da enzima fosfomanose isomerase (PMI), a qual converte frutose 6-P em manose 6-P. Este produto pode tornar-se tóxico ao tecido vegetal por relacionar-se ao sequestro de fosfato, minimizando de forma indireta a síntese de ATP. Isto exige, de certa forma, uma regulação precisa dos níveis de manose 6-P, bem como da atividade da PMI.

A atividade da PMI e a formação de manose 6-P são tão importantes para o metabolismo de AA quanto para a formação do manitol, componente osmoticamente ativo e de grande importância para equilibrar o movimento da água intercelular (ankatesh e Park, 2014).

Segue-se a atuação da enzima fosfomanose mutase (PMM), que utiliza a manose 6-P como substrato na geração da manose 1-P. Esta enzima exige menores níveis de moléculas bifosfato, tais como manose-1,6-bifosfato e glicose-1,6-bifosfato, presentes no meio para seu funcionamento adequado. Relatos

mostram que em algumas espécies vegetais, tais como o milho, existem duas enzimas com atividade PMM, uma que utiliza especificamente a manose e outra para a glicose (Xu et al., 2013; Huang et al., 2016).

A partir deste ponto, a síntese do AA em vegetais começa a envolver enzimas e substratos provenientes da parede celular, essenciais para a formação da molécula. A enzima GDP-D-manose pirofosforilase converte a manose 1-P em GDP-manose, que sendo metabolizada poderá gerar GDP- glucose ou dar sequência, formando GDP-L-galactose a partir da atividade da GDP-D-manose-3,5-epimerase. Há indícios de que com esta última enzima, a transferência de elétrons se faça por um nucleotídeo de piridina fortemente associado à enzima (Feingold, 1982). A ação de outros complexos enzimáticos sobre a GDP-L-galactose pode gerar GDP-L-fucose desviando os subprodutos da formação de AA para outras rotas metabólicas.

No passo a seguir, o GDP-L-galactose será transformado em L- galactose, todavia ainda não está claro qual enzima catalisa esta reação. Trabalhos demonstram que incubações de GDP-L-galactose em suspensões celulares geram quantidades significativas do L-galactose, apesar de ainda não estar descrita com absoluta certeza a enzima responsável por esta etapa da formação de AA (Weeler et al., 1998; Huang et al., 2016).

O último evento a ocorrer no citosol durante a síntese de AA é a formação do precursor imediato da vitamina C, a L-galactono-1,4-lactona (GalL), originada a partir de L-galactose pela atividade da enzima L-galactose desidrogenase. No processo de oxidação da L-galactose, ocorre a transferência de elétrons para uma molécula de NAD, formando NADH. A presença de D-galacturonato também pode suprir as reservas de GalL, sendo convertido a este pela atividade da enzima aldono lactonase, este substrato é estritamente originário da hidrólise da parede celular, formado a partir de uma rota paralela à que está sendo descrita (Weeler et al., 1998; Venkatesh e Park, 2014).

Uma vez que o GalL se forma, a etapa final da síntese de AA se inicia com o transporte deste intermediário para o interior das mitocôndrias, organela em que se localiza a enzima catalisadora desta etapa final. A enzima responsável por essa etapa é a L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH). Uma vez no interior das mitocôndrias, o GalL sofre oxidação pela ação da GalLDH, este evento gera o AA e paralelamente a redução do citocromo c (Cit c), componente importante da

fosforilação oxidativa. Os elétrons provenientes da formação do AA são então utilizados na redução do complexo IV (COX) da respiração, o qual reduz o O_2 a H_2O nos eventos finais da rota respiratória (Bartoli et al., 2000; Bartoli et al., 2009; Millar et al., 2011; Venkatesh e Park, 2014).

Esta importante enzima responsável pela geração de AA, a GalLDH, constitui-se em um monômero formado por uma cadeia contendo 598 aminoácidos com peso molécula de cerca de 57 Da. Possuem três possíveis regiões transmembranares e identidade semelhante em diferentes espécies, identidade esta próxima a 80%, dados confirmados em batata, *Arabidopsis*, morango, batata-doce, tomate e couve-flor (Pateraki et al., 2004). Segundo Pateraki et al. (2004), a GalLDH é codificada por um único gene. O mesmo estudo aponta influências sobre a atividade e expressão da enzima pela luminosidade, período do desenvolvimento do vegetal, diferenças entre tecidos vegetativos e o tecido de frutos, bem como diferenças quanto à época do desenvolvimento dos frutos.

A localização exata da GalLDH nas mitocôndrias é na membrana interna, unida à cadeia transportadora de elétrons da fosforilação oxidativa, etapa final da respiração. Seu sítio ativo facilita a oxidação do GalL transportado do citosol, pois este está voltado para a face externa das cristas mitocondriais. Um estudo com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata revelou a influência direta da atividade desta enzima no processo respiratório. A adição de 5 mM de GalL além de outros substratos respiratórios como NADH e ADP elevou o consumo de oxigênio em 20% em mitocôndrias purificadas além da elevação da produção de AA (Bartoli et al., 2000).

Segundo Bartoli et al. (2000), a adição de antimicina A e KCN, potenciais inibidores da respiração, influenciou negativamente o processo respiratório, na presença ou não do GalL. A antimicina A, porém, provocou aumento na formação de AA, isso se deve à sua capacidade inibitória do complexo III, impedindo assim que os elétrons da via principal reduzissem o citocromo c, deixando assim este oxidado, favorecendo a atividade da GalLDH. A utilização de rotenona, conhecida por diminuir a atividade do complexo I da CTE, não afetou a produção de AA, ainda que tenha provocado queda significativa no consumo de O_2 . Em contrapartida, a utilização de KCN inibiu por completo a síntese de AA *in vitro*. Isso ocorre devido ao impedimento do fluxo de elétrons a partir do citocromo c para o complexo IV que se encontra impedido de reduzir o O_2 a H_2O (Bartoli et al., 2000; Pateraki et al.,

2004; Ventakech e Park, 2014).

Estes dados apontam claramente para o citocromo c como receptor dos elétrons gerados na oxidação do GalL e formação de AA, de forma que o processo respiratório, mais precisamente em sua etapa final, está intrinsecamente associado à biossíntese de AA. Isto pode ser comprovado a partir da adição de KCN e outros inibidores da rota respiratória e como esta ação pode causar o aumento ou a diminuição da formação do AA.

Outros fatores podem provocar efeitos positivos e negativos regulando a concentração de AA, bem como a atividade e expressão da GalLDH. Bartoli et al. (2009) observaram diminuição na concentração de AA quando a relação de luz vermelho/vermelho distante era alterada. Em situações de maior razão vermelho/vermelho distante a quantidade de AA em *Phaseolus vulgaris* era significativamente superior aos exemplares cultivados em ambiente de sombra. De acordo com Bartoli et al. (2009), há efeito da razão vermelho/vermelho distante sobre a respiração e atividade GalLDH, afetando diretamente a concentração de AA nas folhas de *P. vulgaris*, resultados que corroboram com Bartoli et al. (2006). Estes resultados podem ajudar a explicar as variações sazonais nas concentrações de AA encontradas em algumas espécies arbóreas por Bulbovas et al. (2005).

Outros fatores como altas temperaturas e ferimentos podem provocar o acúmulo de AA devido à geração de ERO quando estes fatores de estresse estão presentes. Todavia, o trabalho de Pateraki et al. (2004) não verificou diferenças quanto às respostas a estes ambientes estressantes entre indivíduos selvagens e mutantes subexpressando a GalLDH. A hipótese dos autores é de que a regulação dos níveis de AA no âmbito destas condições estressantes não requer a síntese de novo de GalLDH.

De fato, a atividade da GalLDH, sua síntese e diretamente a produção de AA podem sofrer influências de diversas formas. Ainda que a disponibilidade de GalL seja o fator principal desta regulação, foi verificada significativa influência do processo respiratório, já que este ocorre em paralelo à formação de AA (Bartoli et al., 2006). Millar et al. (2003) demonstram clara regulação da formação de AA pelas funções mitocondriais. A utilização de giberelinas como antagonistas ao processo respiratório fez com que a síntese de AA se elevasse enquanto o transporte de elétrons na CTE e o consumo de O₂ entravam em declínio. As características de localização da GalLDH, inserida como subunidade do complexo I da respiração; a

utilização do citocromo c como aceitador final dos elétrons da biossíntese e modulador direto da atividade da GalLDH são fatores que sustentam a forte influência do processo respiratório sobre a formação de AA (Bartoli et al., 2000; Millar et al., 2001).

A localização da GalLDH, como subunidade do complexo I, também é fator importante na contribuição do transporte de elétrons proveniente da síntese de AA. Apesar da GalLDH compor uma subunidade específica no complexo I da CTE de plantas e algas, entre outras 32 subunidades, esta enzima influencia pouco o transporte de elétrons na CTE. Seu maior efeito está, porém, não no complexo I, mas sim na transferência dos elétrons provenientes da oxidação do Gall para o citocromo c (Millar et al., 2003; Rasmussen et al., 2008).

Todos estes trabalhos mostram a relação efetiva entre a respiração vegetal e a produção de AA. Entretanto, ainda há muito a esclarecer a respeito destas influências mútuas. Por exemplo, a literatura ainda não esclarece o quanto influente é a GalLDH sobre a formação do potencial de membrana mitocondrial, tão importante para a geração de energia e manutenção do metabolismo como um todo. Ainda que a GalLDH esteja intimamente ligada à fosforilação oxidativa, qual a sua contribuição para o acoplamento das organelas?

A ideia da GalLDH influenciando muito mais do que o transporte de elétrons, mais a própria formação de um potencial de membrana torna-se plausível quando se olha de forma mais atenta para outros complexos enzimáticos envolvidos com a CTE que provocam efeitos diretos na formação do potencial, bem como na síntese de ATP. Exemplos mais claros no caso dos vegetais é a presença da Ucp e da AOX, ambas afetando negativamente o potencial.

No caso das Ucps, o efeito é direto, já que esta facilita o retorno dos prótons do espaço intermembranar para o interior da matriz, sem que estes passem pela ATPsintase, tornando a membrana interna naturalmente permeável. Este movimento dos prótons diminui a formação de ATP, provocando equilíbrio na diferença de pH entre os dois subcompartimentos mitocondriais, o que leva a uma menor redução do *pool* de ubiquinona (UQ), com resultados no aumento do transporte de elétrons e conseqüente maior consumo de O₂ (Jarmuszkiewicz et al., 2000; Vercesi et al., 2006; Noctor et al., 2007; Begcy et al., 2011).

A AOX também é considerada moduladora do potencial de membrana, porém com mecanismo diferente das Ucps. Como funcionam de forma homóloga

ao complexo IV, esta rota alternativa reduz o O_2 em H_2O utilizando os elétrons provenientes do *pool* de UQ (Florez-Sarasa et al., 2011). Uma vez desviados da rota principal, os elétrons deixam de ser transportados pelo complexo III e IV, provocando menor bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranar, diminuindo a formação do potencial de membrana. Desta forma, a AOX atua diminuindo a geração do gradiente eletroquímico, evitando que haja acúmulo de elétrons na CTE e impedindo que estes sejam desviados para a geração de ERO (Noctor et al., 2007; Scheckhuber et al., 2011; Keunen et al., 2015).

Os conhecimentos a respeito da síntese e importância do AA para o metabolismo vegetal ainda carecem de mais informações para explicar a influência deste processo na respiração, o quanto os componentes da CTE, bem como suas vias alternativas, contribuem positiva ou negativamente para a formação de AA. Qual seria o nível de influência da GalLDH e sua importante função sobre o metabolismo energético vegetal?

Dados preliminares do nosso grupo de trabalho dão conta de uma evidência bastante interessante. Quando a atividade AOX foi estimulada utilizando-se DTT, observou-se um incremento significativo na produção de AA (dados não publicados). Este aumento foi ainda mais expressivo quando além do estímulo por DDT, a AOX contou com a presença de piruvato, ativador alostérico da AOX, produto da rota glicolítica (Taiz e Zeiger, 2017). Sabe-se que o DTT ativa a via AOX por meio da redução da ponte dissulfeto lábil existente no centro ativo da enzima, a qual somente funciona quando esta ponte está reduzida. Estes resultados indicam a importância da AOX no processo de formação do AA. Todavia, não se sabe o mecanismo envolvido na relação entre a atividade AOX e a síntese de AA.

Uma hipótese é que a formação do AA e a atividade da GalLDH vão além da função antioxidante, mas podem servir como moduladores da atividade respiratória assim como as UCPs e AOX, influenciando tanto no transporte de elétrons da CTE, algo já conhecido, quanto na formação de um gradiente eletroquímico de prótons e geração do ATP, algo ainda a ser testado. Também é provável que a atividade AOX em conjunto com a GalLDH e a formação de AA possam compor uma espécie de rede de controle da geração de ERO como será explorado a diante.

2.4. Mitocôndrias como centros geradores de H₂O₂

O metabolismo vegetal está constantemente produzindo ERO. Esta produção ocorre em diversos subcompartimentos celulares simultaneamente. Sabe-se que em mitocôndrias, de diferentes organismos, ocorre expressiva formação de H₂O₂, o que mostra que essa organela é uma fonte importante deste radical livre (Passaia et al., 2013; Sewelam et al., 2014; Hey-Mogensen et al., 2014). Na maioria dos organismos estudados, inclusive em vegetais, esta produção está intimamente associada ao uso dos substratos respiratórios NADH e succinato, sendo o inibidor do transporte de elétrons, rotenona, um minimizador da produção de H₂O₂ (Blokhina et al., 2010; Perevoshchikova et al., 2013; Gonçalves et al., 2015; Patterson et al., 2015).

Já se observou que a geração de H₂O₂ em mitocôndrias muitas vezes está associada aos sítios da CTE que sofrem inibição de sua atividade, principalmente por rotenona e antimicina A. O ubiquinol é o principal redutor de oxigênio molecular na CTE; sendo assim, os complexos I e III possuem os sítios de maior geração de H₂O₂ por seu contato direto com o *pool*/ubiquinona (UQ) de (Patterson et al., 2015; Gonçalves et al., 2015). O mesmo efeito foi observado também por Perevoshchikova et al. (2013), que quando inibiram o complexo III de mitocôndrias extraídas de músculos de ratos, verificaram elevada redução do *pool* de UQ e geração elevada de ERO, entre os quais H₂O₂.

Estes resultados evidenciam a participação expressiva dos complexos I e III, principalmente, como geradores primários de H₂O₂ e outras ERO. Enquanto estes sítios elevam os níveis de H₂O₂ durante seu funcionamento, outros mecanismos podem ser considerados combativos a este evento, como será comentado a seguir. Tais eventos ocorrem no interior das mitocôndrias e estão intimamente associados ao processo respiratório. A rota respiratória caracteriza-se como importante produtora de radicais livres, todavia também possui mecanismos importantes no combate destas espécies reativas. Alguns destes processos são estritamente observados no metabolismo vegetal.

2.4.1. Regulação da produção de H₂O₂ pelo processo bioenergético mitocondrial

O fornecimento de energia para a atividade celular ocorre a partir do

processo respiratório. Estes mecanismos contam com a ação coordenada de várias organelas, efetuando assim a ativação do desenvolvimento vegetal. A mitocôndria é uma das principais organelas envolvidas na geração de energia em forma de ATP e sua constante atividade em prol da demanda por energia provoca a geração contínua de ERO. Sob determinados tipos de estresse, a produção de ERO eleva-se significativamente (Borisjuk et al., 2003; Vanlerberghe, 2013; Sasha et al., 2016).

Estes fatores estressantes por muitas vezes provocam a diminuição da energia prontamente disponível na forma de ATP, através da diminuição da atividade respiratória e fotossintética. Esta queda está por muitas vezes, associada à saturação do transporte de elétrons na CTE, provocando o desvio destes elétrons para a formação de ERO. Pode citar, como fatores de estresse, extremos de temperatura, hipoxia e anoxia, pH alterado e falta de nutrientes como importantes agentes promotores do desbalanço entre o consumo de ATP e sua formação, gerando assim déficits energéticos no metabolismo vegetal (Baena-González e Sheen, 2008; Oliveira et al., 2013).

As plantas especificamente possuem mecanismos de dissipação do gradiente eletroquímico, evitando assim a polarização excessiva da membrana, o que pode acarretar na geração de ERO. Um dos principais mecanismos envolvidos no controle da polarização da membrana interna mitocondrial é a via AOX, que, oxidando o *pool* de UQ superreduzido, evita que alguns elétrons sejam transportados via complexo III e IV. Este desvio no transporte de elétrons contribui para diminuir o gradiente eletroquímico formado, além de evitar que elétrons sejam “desviados” da via oxidativa preferencial e sejam usados na formação de H₂O₂ (Vanlerberghe e McIntosh, 1996; Cvetkovska e Vanlerberghe, 2012).

Esta rota alternativa converterá a energia acumulada na forma de gradiente de prótons dissipando-a na forma de calor, com consequente redução na produção de ATP. O bloqueio total ou parcial desta via pode provocar um aumento significativo na formação de H₂O₂.

Há outros componentes dissipadores do potencial de membrana mitocondrial, como, por exemplo a Ucp, que atuam modulando o *status* energético celular diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio. Localizada na membrana interna das mitocôndrias, a Ucp atua desfazendo o potencial redox mitocondrial. Os efeitos da ação da Ucp variam de acordo com a sua expressão no tecido vegetal (Czarna e Jarmuszkiewicz et al., 2005; Gandin et al., 2014; Oliveira

et al., 2015).

Ao atuarem contra a formação do potencial de membrana, transferindo os prótons do espaço intermembranar de volta para a matriz mitocondrial, favorecem a diminuição da formação de ATP. Tal efeito mantém o fluxo de elétrons na CTE e diminui a formação de H_2O_2 . Assim, a UCP caracteriza-se pela promoção da respiração com menor acoplamento, o que minimiza os danos oxidativos (Navrot et al., 2007). Nesta perspectiva, é possível que qualquer fator que afete um potencial de membrana exacerbado poderá provocar minimizações diretas na formação deste radical livre.

Prasad et al. (1994) ao expor sementes de milho ao estresse pelo frio, verificaram uma crescente formação de ERO, inclusive H_2O_2 , conforme se observava a diminuição do transporte de elétrons e queda expressiva na atividade ATPsintase. A diminuição da atividade ATPsintase resulta no aumento do potencial de membrana que pode chegar a níveis tão altos, tornando possível a formação de H_2O_2 . A diminuição na atividade da CTE e na atividade da ATPsintase resulta na ativação de enzimas antioxidantes, tais como catalase e peroxidase, em uma possível reação de controle ao excessivo nível de H_2O_2 gerado pelo estresse em situação de frio.

2.4.2. AA controlando os níveis de H_2O_2

Quando os níveis de ERO chegam a limites prejudiciais às estruturas e ao metabolismo vegetal, dois mecanismos são essenciais para controlar as concentrações destas moléculas altamente reativas. Um deles é o mecanismo enzimático, onde o H_2O_2 é oxidado diretamente por enzimas especializadas. No outro mecanismo, não enzimático, o H_2O_2 pode ser eliminado do meio celular por ação da vitamina E (α -tocoferol) ou do AA (Foyer et al., 1997). A atividade enzimática, quando presente, mostra-se primordial no combate a ERO e conservação das moléculas de AA existentes (Boatright, 2015).

A atividade da enzima APX oxida o H_2O_2 gerando H_2O , utilizando para isso o AA que é reduzido a MDHA. Este por sua vez pode voltar à sua forma reduzida, AA, pela atividade da enzima MDHAR, oxidando NADPH. A APX, assim como a GalLDH, pode ser encontrada como componente da membrana interna mitocondrial. Sua atividade no combate ao H_2O_2 provoca a oxidação de AA,

gerando H_2O (Lázaro et al., 2013).

Outro modo de eliminação das ERO formadas no meio celular se dá pela atividade da enzima SOD, que catalisa a dismutação do ânion superóxido, gerando H_2O_2 . Associada à atividade SOD está a CAT, que promove a conversão do H_2O_2 em H_2O e oxigênio. A afinidade da CAT por H_2O_2 é relativamente baixa, o que torna importante a atuação das APX's na transformação do H_2O_2 em H_2O durante o controle dos níveis de ERO no meio celular, visto que a afinidade destas enzimas por H_2O_2 é elevada (Arrigoni e Tullio, 2002).

2.5. Justificativa teórica e hipótese

Questões que ainda precisam ser melhor entendidas se relacionam com a regulação da atividade GalLDH. Sendo o AA um dos principais componentes no processo de controle do nível de H_2O_2 , poderá este produto (H_2O_2) resultante da atividade respiratória influenciar positivamente a atividade da GalLDH? Se isso for confirmado, o H_2O_2 estará funcionando, nesse caso, como um sinalizador para o aumento da atividade enzimática geradora de AA, o que em última análise estaria ativando o sistema de controle de ERO.

Outra questão em aberto está relacionada à participação direta da GalLDH na formação de H_2O_2 . Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa (não publicados) mostraram possível relação entre o aumento da atividade GalLDH, bem como a formação de AA, com a crescente geração de H_2O_2 , evento associado ao consumo de O_2 mesmo quando as oxidases terminais conhecidas, AOX e COX, encontravam-se completamente inibidas.

É importante determinar o quanto cada um dos componentes da CTE influencia (positiva ou negativamente) a atividade GalLDH, a geração de AA, bem como a possível geração de H_2O_2 . Ainda, como a atividade GalLDH influencia o transporte de elétrons na CTE mitocondrial.

Para obtenção de dados que auxiliem a compreensão do funcionamento do transporte de elétrons mitocondrial através da atividade da GalLDH, propõe-se determinar os efeitos do bloqueio da AOX, bem como da COX sobre a produção de AA e H_2O_2 em mitocôndrias extraídas de frutos, a fim de identificar se há influência na produção de H_2O_2 durante o bloqueio da atividade respiratória. Todos os complexos transportadores de elétrons também serão estudados durante o

funcionamento da GalLDH para determinar o nível de influência de cada um sobre a produção de AA e H₂O₂.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Obter dados que auxiliem na compreensão do funcionamento do transporte de elétrons mitocondrial através da atividade GalLDH.

3.2. Objetivos específicos

Determinar o nível de influência da inibição da CTE sobre a produção de H_2O_2 e AA na presença de GalL;

Avaliar a relação entre a atividade GalLDH e a formação de H_2O_2 , bem como se a atividade da GalLDH potencializa a produção de H_2O_2 ;

Quantificar como as oxidases terminais (COX e AOX) influenciam a geração de H_2O_2 via GalLDH;

Propor um modelo relacionando o processo respiratório mitocondrial e a formação de AA como parte de um sistema de sinalização via H_2O_2 .

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Foram utilizados frutos de mamão 'Golden', provenientes de pomar comercial da empresa Caliman Agrícola S/A, de localização 19°15'S e 39°51'70" W, na cidade de Linhares – ES. Os frutos foram colhidos e lavados, passaram por seleção em packing house da própria empresa, quando então foram transportados até o setor de Fisiologia Vegetal do Laboratório de Melhoramento Genético e Vegetal na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), localizada em Campos dos Goytacazes - RJ.

Também foram utilizados nas avaliações frutos de tomate cereja (*Solanum lycopersum* 'West Virginia 106'), cultivados em casa de vegetação da unidade de apoio à pesquisa (UAP) do CCTA/UENF, a partir de sementes gentilmente doadas pelo professor Pierre Baldet do French National Institute for Agricultural Research em Bordeaux, de linhas transgênicas (5-13 e 8-14) e selvagens (WT), subexpressando atividade GalLDH, especificamente na região das raízes e frutos. Estes frutos apresentam silenciamento do gene codificador da GalLDH (Alhag Dow et al., 2007).

Os frutos colhidos no estágio 0 de amadurecimento, casca 100% verde, permaneceram acondicionados sob controle de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa ($85\% \pm 5\%$), permanecendo assim durante todo o período que perduraram as análises. O material foi submetido aos ensaios quando ainda estava completamente verde, quando a casca não apresentava sinais expressivos de

mudança de cor.

Estas espécies foram escolhidas por um motivo específico. O tomateiro em função da disponibilidade de estudo utilizando um mutante subexpressando a atividade GalLDH. O 'Golden' foi escolhido pela facilidade de execução dos protocolos utilizados no método, já que os estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa fornecem toda a informação necessária para a boa execução dos métodos propostos por este trabalho.

4.2. Caracterização pós-colheita

As características físicas e químicas dos frutos foram avaliadas a fim da padronização do material de ensaio, garantindo que todos os frutos utilizados em cada análise se encontrassem no mesmo estágio de maturação.

Coloração do epicarpo: Foram feitas medidas da coloração do epicarpo dos frutos em três pontos equidistantes localizados na região equatorial dos mesmos. Para isso, foi utilizado um colorímetro Minolta, modelo CR-300 com calibração ocorrendo em superfície de porcelana branca, a qual forneceu os parâmetros de coloração definidos por três coordenadas (X, Y e Z). O parâmetro utilizado para definição exata da coloração foi o ângulo de cor *Hue*, o qual indica frutos mais amarelos quando apresenta 90ºh e coloração verde quando apresenta valores próximos a 180ºh (McGuire, 1992).

Firmeza do fruto: Foi analisada a firmeza do pericarpo dos frutos com utilização de um texturômetro do tipo Texture Analyser, modelo TA.XT Express, UK. A ponta de prova tem 2 mm de diâmetro, com deslocamento vertical de 1 cm da superfície da casca e aprofundando-se no mesocarpo. O ensaio teve velocidade de 2 mm.s⁻¹, com ajuste de 0,1961 N de forma aplicada.

Teor de sólidos solúveis (SS): Foi determinado por refratometria utilizando duas gotas da polpa dos frutos em um refratômetro digital de bancada modelo DRBS-300. O resultado foi expresso em °Brix.

4.3. Purificação de mitocôndrias

Todo processo de purificação das mitocôndrias da polpa do mamão e tomate foi realizado a 4°C, quando 300 g de polpa dos frutos de mamão e 40 g dos frutos de tomate foram homogeneizados em solução tampão em uma centrífuga

Juicer, modelo R16720 da marca Walita. A solução tampão para frutos de mamão conteve manitol 0,35 M, MOPS 50 mM, EDTA 3 mM, Cys 8 mM, BSA 0,1% (p/v), PVP-25 0,4% (p/v) e seu pH foi ajustado para 7,4, enquanto para tomate as concentrações foram de Sacarose 0,4 M, MOPS 50 mM, EDTA 8 mM, Cys 4 mM, BSA 5% e PVP 0,4% e ajuste de pH também para 7,4. Este homogenato foi filtrado em duas camadas de gaze e uma camada de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e centrifugado então a 1.500 g por 15 minutos. Foi descartado o *pellet* e centrifugado o sobrenadante a 15.000 g por 15 minutos, o qual possibilitou a resuspensão do *pellet* originado em tampão de lavagem contendo manitol 0,35 M, MOPS 10 mM, EDTA 0,5 mM, BSA 0,1% (p/v) e ajustado para pH 7,2 tanto para mamão quanto para tomate. O resuspendido passou por centrifugação a 1000 g durante 8 minutos, sendo então o sobrenadante novamente centrifugado a 9.000 g por 15 minutos, onde foi possível obter mitocôndrias no precipitado.

Obtendo-se o extrato mitocondrial lavado, este foi submetido a um processo de purificação para total limpeza de resíduos extra mitocôndria ou fragmentos de outras organelas, bem como limpeza das mitocôndrias rompidas que por ventura estivessem no extrato. Para isso, foi utilizado um gradiente de *Percoll*, onde o precipitado coletado foi resuspenso em 1 mL do tampão de lavagem e inserido em 30 mL de tampão de purificação, o qual conteve 22,5 % de *Percoll* (v/v), manitol 0,6 M, MOPS 10 mM, BSA 0,5% (p/v) e ajustado para pH 7,2. O gradiente contendo o extrato lavado de mitocôndrias foi centrifugado a 12.000 g por 45 minutos. As mitocôndrias purificadas se apresentaram em halo específico na metade inferior do tubo, foram então coletadas com ajuda de pipeta Pasteur e diluídas aproximadamente 10 vezes utilizando o tampão de lavagem e posteriormente centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos. Este protocolo segue o protocolo definido por Oliveira et al. (2015), com modificações pertinentes. A concentração de proteínas foi determinada espectrofotometricamente utilizando comprimento de onda igual a 595 nm como descrito por Bradford (1976). Albumina de Soro Bovino (BSA) foi utilizada como proteína padrão.

4.4. Quantificação da atividade respiratória

A atividade respiratória das mitocôndrias foi avaliada utilizando o método polarográfico com o auxílio de um eletrodo do tipo Clark (Hansatech, Respire 1,

UK). Todo o procedimento ocorreu em temperatura de 25°C, utilizando 1 mg de proteína mitocondrial por ensaio em 1 mL de tampão de reação contendo manitol 0,35 M, tampão fosfato 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,5% (p/v), com ajuste de pH para 7,2. O consumo de O₂ foi medido com a adição de 10 µL de NADH 8 mM, momento conhecido como estágio 2 da respiração. Após, foi adicionado na câmara de reação 100 nmoles de ADP para verificação da taxa de fosforilação, este estágio é chamado de estágio 3. Após alguns minutos, quando todo o ADP adicionado foi consumido (que denominamos estágio 4), se obteve o coeficiente respiratório (CR), medido pela razão entre estágio 3 e 4, oferecendo assim um parâmetro de acoplamento das organelas purificadas.

Em seguida foi possível quantificar a participação das duas vias consumidoras de O₂ e expressar esta contribuição em porcentagem. Ainda no estágio 4 foram adicionados 4 mM de SHAM, conhecido inibidor da AOX para posterior adição de 3 mM de azida inibindo completamente as vias oxidases terminais com a supressão da COX.

A atividade respiratória em mitocôndrias isoladas foi mensurada também na presença de GalL, a fim de relacionar o consumo de O₂ com atividade GalLDH. As mitocôndrias (1 mg de proteína) foram pré-tratadas com GalL 5 mM e o consumo de oxigênio foi avaliado em 200 µL de meio de reação já citado acima. Após acompanhar o consumo de O₂ via GalLDH adicionou-se os respectivos inibidores das oxidases terminais, sendo azida 10 mM para a COX e SHAM 5 mM para a AOX, além de antimicina A 5 mM como inibidor do complexo III, rotenona 4 mM como inibidor do complexo I, succinato 15 mM como estimulador do complexo II e difenileniodônio (DPI) 2 mM como inibidor de flavoenzimas (Siddique et al., 2014) para a GalLDH.

Após obtenção dos traçados utilizando aparelho de plotagem Kipp e Zonen, foram calculadas as taxas respiratórias das mitocôndrias purificadas. Se obteve percentuais de consumo de O₂ total além da respiração resistente ao cianeto (AOX) para efeito de comparação através das vias de consumo de O₂. O coeficiente respiratório gira em torno de 1,54, indicando que a extração mitocondrial foi bem-sucedida.

4.5. Atividade da GalLDH

A atividade da GalLDH foi determinada através de espectrofotometria a partir da inibição dos principais complexos da fosforilação oxidativa. O método consiste em detectar a redução do citocromo c na presença de GalL 5 mM. Para isso, mitocôndrias purificadas foram adicionadas em tampão Tris 50 mM em pH 7,8 contendo citocromo c 5 mM e GalL 5 mM. Todos os ensaios ocorreram na presença do detergente Triton® 5%, que permeabiliza a membrana e possibilita a entrada do citocromo c no interior da organela.

Foi observada a atividade da GalLDH com a inibição dos complexos I, II, III, IV e AOX para comparar a influência causada por estes componentes respiratórios sobre a atividade da enzima, para isso foram efetuados quatro ensaios contendo os mesmos compostos já mencionados na detecção da atividade da GalLDH, além dos respectivos inibidores de cada um destes componentes.

Para inibição da atividade do complexo I foi adicionado rotenona 4 mM, o complexo II foi inibido com malonato 5 mM, o complexo III foi inibido com antimicina A 5 mM, a COX foi inibida com azida 3 mM e a AOX inibida com SHAM 3 mM.

4.6. Produção de AA

Os extratos de mitocôndrias purificadas de mamão e tomate devidamente incubados foram utilizados para a quantificação da produção de AA, que foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), modelo LC-10AD (Shimadzu, Japan) acoplado a um registrador/integrador – chromatopac, modelo C-R6A (Shimadzu, Japan). Este cromatógrafo foi equipado com coluna “Spherisorb ODS C18”. As análises seguiram o método descrito por Benlloch et al. (1993), com resultados sendo expressos em mg ácido ascórbico.100 g peso fresco⁻¹.

Os bloqueadores e substratos utilizados na reação foram DPI 2 mM como inibidor de flavoenzimas (Siddique et al., 2014), para a GalLDH, SHAM 5 mM como inibidor AOX, Azida 5 mM como inibidor COX, rotenona 4 mM como inibidor do complexo I, antimicina A 5 mM como inibidor do complexo III e DTT 5 mM como estimulador da via AOX.

4.7. Relação da GalLDH na biossíntese de H₂O₂

A relação da atividade GalLDH na formação de H₂O₂ foi quantificada utilizando Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay para medir a formação de H₂O₂ via fluorescência.

O protocolo consiste na detecção da atividade da peroxidase em extrato mitocondrial na faixa de excitação de 550 nm e emissão de 600 nm. O extrato foi suplementado com GalL 1 M para estímulo da via GalLDH, além de inibidores das vias oxidases terminais AOX e complexo IV e estimulantes dos complexos respiratórios para detecção da influência destes na formação de H₂O₂ em conjunto com GalLDH.

Os bloqueadores e substratos utilizados na reação foram difenilenioiodônio (DPI) 2 mM como inibidor de flavoenzimas (Siddique et al., 2014) para a GalLDH, SHAM 5 mM como inibidor AOX, Azida 5 mM como inibidor COX, succinato 15 mM como estimulador do complexo II, rotenona 4 mM como inibidor do complexo I, antimicina A 5 mM como inibidor do complexo III.

4.8. Análise Estatística

Os ensaios foram conduzidos seguindo delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial (genótipo x tratamento), após a coleta, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.6 (Ferreira, 2014). Todos os dados são apresentados com média ± erro padrão. Todos os pressupostos da análise de variância foram verificados para garantir a validade da análise estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para fins de padronização da coleta de dados, optou-se neste trabalho pela utilização de frutos fisiologicamente maduros, com 100% da superfície da casca na cor verde. Os frutos foram caracterizados e os resultados indicam que não há diferença ($P \leq 0,05$) entre os genótipos de tomateiro em nenhum dos parâmetros pós-colheita (Tabela 1). As linhas transgênicas e WT apresentaram média do ângulo de cor *Hue* muito semelhantes variando entre 114,0 e 113,9, a luminosidade (L^*) dos frutos variou entre 59,8 e 61,7, a firmeza do fruto variou entre 7,9 e 8,8 N e o teor de SS apresentou valores entre 3,2 e 3,4 °Brix. Estes dados mostram que o estágio de amadurecimento dos frutos dos três genótipos não diferiu entre eles.

Tabela 1: Caracterização pós-colheita de três genótipos de tomate, sendo um do tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14) com o silenciamento da GalLDH, além do mamão 'Golden'

	WT	5-13	8-14	'Golden'
Hue	114,0 ± 0,37a	113,9 ± 0,31a	114,0 ± 0,38a	110,2 ± 0,64
L*	61,7 ± 0,16a	59,8 ± 0,22a	61,7 ± 0,54a	59,1 ± 0,45
Firmeza	7,9 ± 0,26a	8,4 ± 0,23a	7,8 ± 0,26a	14,5 ± 0,41
SS	3,2 ± 0,15a	3,4 ± 0,28a	3,3 ± 0,15a	8,2 ± 0,52

Médias (\pm erro padrão) seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A coleta dos frutos de mamão 'Golden' seguiu os mesmos padrões descritos para o tomateiro. Os frutos apresentaram coloração verde com ângulo de cor *Hue* igual a 110,2, luminosidade com média de 59,1 e firmeza igual a 14,5 N (Tabela 1).

A taxa respiratória quando se usa o NADH como substrato respiratório em mitocôndrias isoladas da polpa dos frutos de tomate, está representada na Figura 2. Verificou-se diferença ($P \leq 0,05$) no consumo de O_2 entre os genótipos, com o genótipo 5-13 apresentando o maior consumo de oxigênio ($304,8 \text{ nmol mg proteína}^{-1} \text{ s}^{-1}$), enquanto os demais genótipos, WT e 8-14, não diferiram entre si, apresentando médias de 113,4 e 147,9 $\text{nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, respectivamente. Após a adição de ADP ao meio de reação verificou-se um aumento da taxa respiratória, devido à fosforilação das mitocôndrias purificadas, em todos os genótipos. Enquanto nos genótipos WT e 8-14 o incremento na taxa respiratória foi de cerca de 54% , no genótipo 5-13, esse aumento foi da ordem de 68%, portanto, mostrando também a maior capacidade fosforilativa do genótipo 5-13 em relação aos demais genótipos (Figura 2). Após todo o consumo do ADP adicionado, quando a respiração atingiu o estado de relaxamento (E4), o consumo de O_2 retornou aos níveis de pré-adição de ADP, com a maior taxa respiratória ($P \leq 0,05$) para o genótipo 5-13 e nenhuma diferença entre os demais genótipos (Figura 2).

Quando foi inibida a via AOX, com a adição de SHAM, o consumo de O_2 diminuiu significativamente no genótipo WT em relação à respiração total das mitocôndrias, o que não foi verificado nas linhas transgênicas 5-13 e 8-14 (Figura 2). A taxa respiratória na presença de SHAM representa a participação da via AOX na respiração total da mitocôndria, sendo verificado valor de 52,8% no genótipo WT. Com a via AOX inibida, a adição de azida de potássio promoveu a inibição também da via COX, o que foi verificado em todos os genótipos, restando um consumo de O_2 muito pequeno, relativo à respiração residual, sendo esta da ordem de 3,0 a 4,0% (Figura 2).

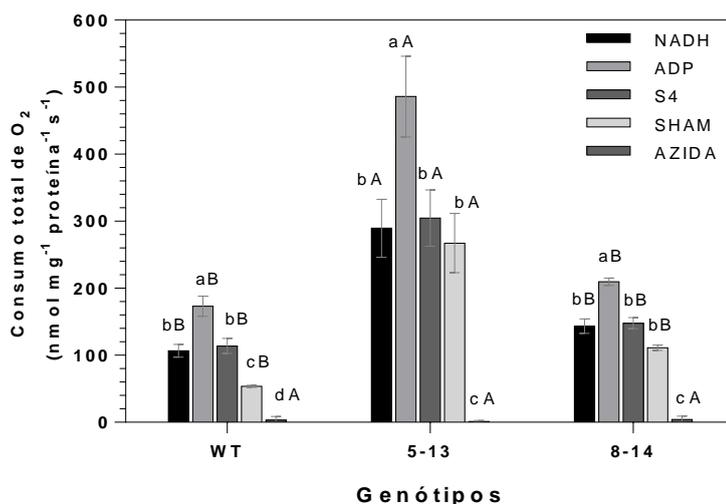


Figura 2: Taxa de consumo de O_2 total e específica para COX e AOX em mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de três genótipos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14) com o silenciamento da GalLDH. Foi utilizado 8 mM de NADH como substrato oxidável para o início do consumo de O_2 . A indução da fosforilação oxidativa foi obtida pela adição de 100 nmoles de ADP. O estado S4 representa o estado de relaxamento após a fosforilação de todo o ADP adicionado. A adição de 5 mM de SHAM (inibidor da via AOX) representa o consumo de O_2 pela via citocromo c oxidase, enquanto a adição de 10 mM de azida de potássio (inibidor da via COX) representa o consumo de O_2 quando as duas oxidases terminais (AOX e COX) estão inibidas. Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A taxa respiratória de mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de mamão 'Golden' pode ser visualizada na Figura 3. É possível verificar maior consumo de O_2 em mitocôndrias do mamão 'Golden' quando comparadas ao tomateiro com exceção do genótipo 5-13 que permanece com maior consumo de O_2 . A taxa respiratória inicial em 'Golden' está em torno de $200 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, dobrando este consumo após a adição de ADP, indicando alta capacidade fosforilativa das mitocôndrias. Após o consumo de todo ADP, a taxa respiratória volta próximo ao nível inicial, registrando consumo de O_2 em torno de $225 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.

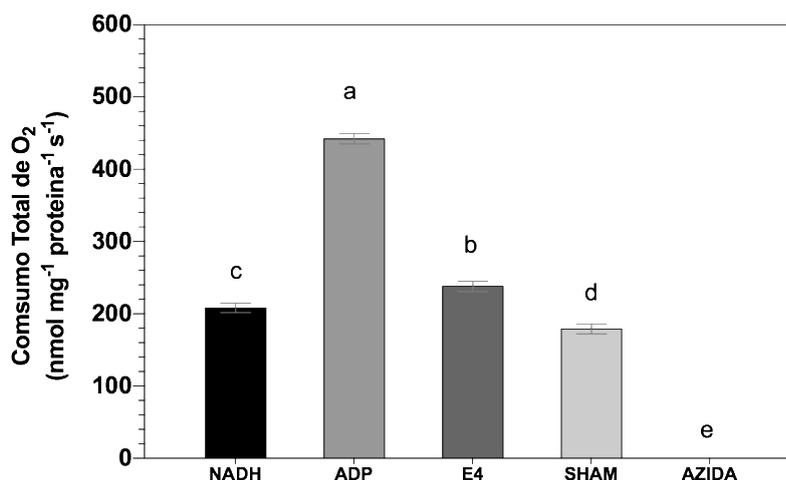


Figura 3: Taxa de consumo de O₂ total e específica para COX e AOX em mitocôndrias isoladas da polpa de frutos de mamão 'Golden'. Foi utilizado 8 mM de NADH como substrato oxidável para o início do consumo de O₂. A indução da fosforilação oxidativa foi obtida pela adição de 100 nmoles de ADP. O estado E4 representa o estado de relaxamento após a fosforilação de todo o ADP adicionado. A adição de 5 mM de SHAM (inibidor da via AOX) representa o consumo de O₂ pela via citocromo c oxidase, enquanto a adição de 10 mM de azida de potássio (inibidor da via COX) representa o consumo de O₂ quando as duas oxidases terminais (AOX e COX) estão inibidas. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A taxa respiratória total observada em mamão indicada pelo E4, corrobora com os resultados encontrados por Oliveira et al. (2015), que também verificaram elevada fosforilação com alto coeficiente respiratório (CR), característico de mitocôndrias isoladas de frutos de 'Golden' em estados não avançados de maturação quando comparado a outras espécies. Nestes frutos é comum observar altos níveis de consumo de O₂ que ainda se elevam conforme avançam no amadurecimento. Sua característica climatérica favorece e intensifica a atividade respiratória mitocondrial que serve de via para disponibilizar esqueletos carbônicos utilizados em diversas rotas metabólicas essenciais ao processo de amadurecimento, levando o fruto a sofrer as transformações físicas e químicas desta etapa do desenvolvimento (Souza et al., 2014; Silva et al., 2015). A respiração resulta em profundas modificações em compostos orgânicos desde proteínas, carboidratos, ácidos orgânicos e compostos voláteis que levam a total transformação das características organolépticas de um fruto. Durante esta etapa estes componentes são mobilizados e então oxidados de forma controlada.

Oliveira et al. (2015) também detectaram menor participação da via AOX no consumo total de O₂ neste estágio de maturação, quando a casca dos frutos se

encontra completamente verde, apresentando característica elevação na participação desta oxidase conforme ocorre avanço no amadurecimento. Em algumas variedades de mamão a atividade AOX sobrepõe a atividade COX, como é possível observar no trabalho realizado por Souza et al. (2014). Este é um evento observado em frutos considerados climatéricos onde o declínio na atividade COX favorece o aumento na participação AOX no consumo de O₂, possibilitando a entrada destes órgãos na fase de senescência (Considini et al., 2001). Em seu estudo, Considini et al. (2001) detectaram a diminuição na expressão de uma gama de proteínas envolvidas no transporte de elétrons mitocondriais durante a fase de maturação em manga, como uma subunidade da COX e o próprio citocromo c, enquanto elevava-se consideravelmente a expressão da AOX, da Ucp e algumas chaperonas.

Como esperado, a inibição das vias oxidases terminais em 'Golden' levou a paralisação completa do consumo de O₂. Os dados indicam a COX com maior contribuição na taxa de consumo de O₂, representando cerca de 90% do O₂ consumido, enquanto a contribuição da AOX foi de aproximadamente 13% da respiração total.

A taxa de consumo de O₂ utilizando GalL 5 mM como substrato oxidável verificada para todas as espécies foi inferior àquela registrada quando utilizou-se o NADH como substrato respiratório. Na presença de GalL o consumo de O₂ do genótipo 5-13 foi superior ($P \leq 0,05$) ao observado nos demais genótipos (WT e 8-14), os quais não diferiram entre si (Figura 4), assim como verificado com o NADH como substrato (Figura 2). A inibição da AOX, com a adição de SHAM, foi observada em todos os genótipos que apresentaram uma queda no consumo de O₂ de cerca de 40%, 47% e 37%, respectivamente nos genótipos WT, 5-13 e 8-14 (Figura 4). A taxa de consumo de O₂ na presença de SHAM revela que não há diferença entre os genótipos na participação da via COX (Figura 4). Na presença de SHAM (i.e. com a AOX inibida) a adição de azida de potássio promove a inibição também da via COX, portanto, as duas vias oxidativas terminais estão inibidas. Porém, surpreendentemente, mesmo com a AOX e a COX inibidas, não houve paralisação total no consumo de O₂, sendo verificadas taxas respiratórias da ordem de 41, 39 e 36 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹, respectivamente, para os genótipos WT, 5-13 e 8-14, com diferença ($P \leq 0,05$) apenas entre as duas linhas com a GalLDH silenciada.

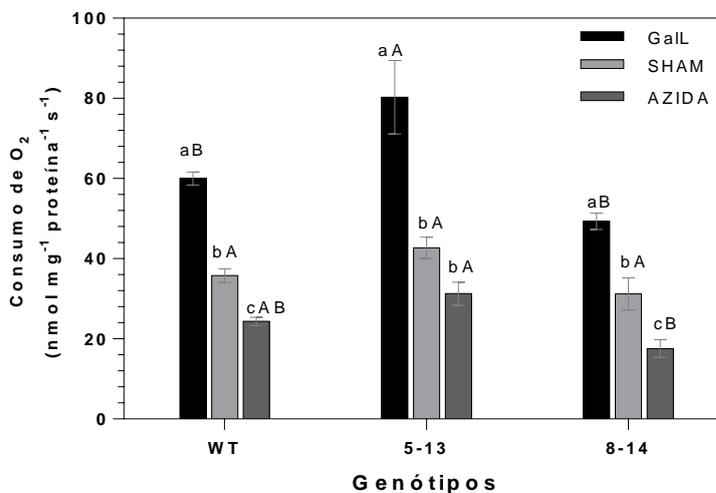


Figura 4: Taxa de consumo de O₂ via GalLDH e específica para COX e AOX em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14). Gall (substrato oxidável para início do consumo de O₂). Os inibidores utilizados foram SHAM (inibidor da via AOX) e azida (inibidor da via COX). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Repetindo o que se verificou em frutos de tomateiro, em mamão o consumo de O₂ via Gall (Figura 5) também foi muito menor ($P \leq 0,05$) quando comparado ao consumo via NADH (Figura 3), ainda que não se tenha feito a comparação de médias, os valores são bastante discrepantes. Em mamão esta taxa está em torno de 45 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹, o que significa um consumo de O₂ aproximadamente 77% menor do que o verificado com NADH como substrato oxidável. Nesta espécie também não se verifica a total paralisação do consumo de O₂ após adição dos inibidores das oxidases terminais em situações em que a respiração é iniciada com Gall. No caso do mamão, a adição de SHAM não provocou diferença significativa ($P \leq 0,05$) na taxa de consumo de O₂ (Figura 5), diferindo do verificado para o tomate (Figura 4) ainda, mesmo com a adição de azida de potássio o consumo de O₂ caiu apenas cerca de 20%, porção muito menor do que aquele verificado em tomateiro.

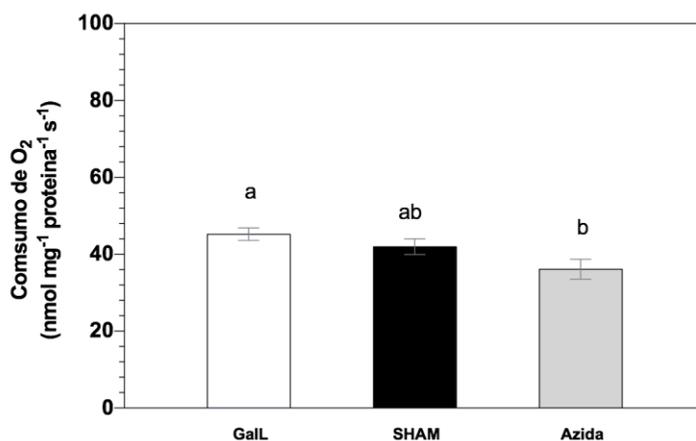


Figura 5: Taxa de consumo de O₂ via GalLDH e específica para COX e AOX em mamão 'Golden'. Os substratos e inibidores utilizados foram GalL (substrato oxidável para início do consumo de O₂), SHAM (inibidor da via AOX) e azida (inibidor da via COX). Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Como será evidenciado adiante, os resultados indicam influência dos complexos da CTE sobre a atividade GalLDH. Entretanto, a atividade AOX mostra evidências mais claras desta influência modulando o funcionamento da GalLDH. Foi possível detectar a respiração mitocondrial quando o único substrato oxidável disponível foi o GalL, tal consumo de O₂ mostrou-se inferior ao consumo total observado quando o substrato respirável era o NADH, sendo o mesmo verificado tanto no tomate (Figura 2), quanto no mamão (Figura 3).

Em média, a respiração via GalL em tomateiro representa apenas cerca de 33% da respiração via NADH, o que já era esperado, já que o fluxo de elétrons provenientes da oxidação do GalL limita-se ao citocromo c e COX (Wheeler et al., 1998; Bartoli et al., 2000; Leferink et al., 2008; Silva et al., Silva, 2016). Um evento não esperado foi observado após a adição dos inibidores das oxidases terminais, SHAM e azida, quando persistiu o consumo de O₂, o que não ocorre na respiração via NADH (Figuras 4 e 5).

Houve manutenção da atividade GalLDH, após a adição de GalL, mantendo o consumo de O₂ mesmo na presença dos inibidores das vias AOX e COX nas duas espécies. Os motivos pelos quais este consumo se manteve serão esclarecidos posteriormente a partir dos resultados das outras análises. A respiração se manteve ativa em tomate, após adições de SHAM e azida, com valor médio de 24 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ nas linhas avaliadas. Descartou-se a possibilidade deste consumo ser apenas uma atividade respiratória residual quando se

comparou a atividade residual da respiração a partir da oxidação do NADH na presença de azida e SHAM que gira em torno de $3 \text{ nmol nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, ou seja, pelo menos 8 vezes menor do que o consumo de O_2 resistente aos inibidores, SHAM e azida, observado na presença de GalL (Figuras 4 e 5).

A Figura 2 mostra a marcante participação no consumo de O_2 da via AOX, neste estágio de maturação, no genótipo WT. Uma parte significativa do consumo de O_2 é atribuída à atividade AOX, sendo verificado a maior participação da AOX no WT. Apesar de não haver diferença significativa quando adicionado SHAM para as linhas 5-13 e 8-14, ainda assim apresenta uma tendência à diminuição do consumo de O_2 , indicando a participação da via AOX. Estudos indicam a evidente participação desta via em frutos climatéricos e como ela pode elevar-se conforme esses órgãos se aproximam da senescência (Souza et al., 2014; Oliveira et al., 2015).

Já se detectou diversas funções da AOX durante a fase de amadurecimento que explicam sua maior expressão e participação no consumo de O_2 . Esta via pode servir como controle da respiração levando ao climatério, ou controlar o consumo de O_2 após este, em algumas espécies favorece a senescência e pode influenciar positivamente o sistema II de biossíntese de etileno, diminuindo a vida útil destes órgãos após a colheita, o que explica a maior participação da AOX nas linhas WT e 8-14 (Gómez et al., 2008; Asghari & Aghdam, 2010; Wang et al., 2013; Perotti et al., 2014).

Apesar da nítida manutenção do consumo de O_2 mesmo na presença dos inibidores das vias AOX e COX, após a adição de SHAM, ainda assim verificou-se queda na taxa de consumo de O_2 quando utilizou-se GalL como substrato oxidável em tomate (Figura 4). A diminuição no consumo de O_2 é maior após a adição de SHAM comparativamente à adição de azida nos genótipos WT e 5-13. No genótipo WT, a participação da AOX foi da ordem de 40%, enquanto no 5-13 esta foi de cerca de 47%, quando a enzima GalLDH estava ativa pela adição de GalL (Figura 4), o que difere do observado quando a GalLDH não estava ativa pela adição de GalL e o substrato respiratório presente era o NADH, onde com exceção do WT, os outros genótipos não mostraram participação significativa ($P < 0,05$) da via AOX (Figura 2). Isso indica uma influência positiva da GalLDH sobre a atividade AOX, quando utilizou o GalL como substrato para observar o consumo de O_2 , além de induzir a atividade GalLDH, aumentou também a participação da AOX na

respiração do fruto que passa a contribuir com uma parte maior do consumo de O₂.

Semelhante aos eventos observados em tomate, no mamão 'Golden', a ativação da GalLDH a partir da adição de GalL como substrato oxidável também mantém um consumo considerável de O₂ mesmo na presença dos inibidores das duas oxidases terminais (Figura 5).

A adição de outro substrato (succinato) e outros inibidores além de SHAM e azida sobre a atividade da CTE não promoveu a inibição completa do consumo de O₂ quando a GalLDH estava ativa pela presença do GalL como substrato oxidável disponível (Figura 6). A adição de rotenona (inibidor do complexo I) em mitocôndrias isoladas de polpa de tomate nos três genótipos não resultou na paralisação total do consumo de O₂, sendo verificada redução ($P < 0,05$) na respiração apenas no WT quando o consumo de O₂ caiu cerca de 33% em relação à taxa inicial (Figura 6A).

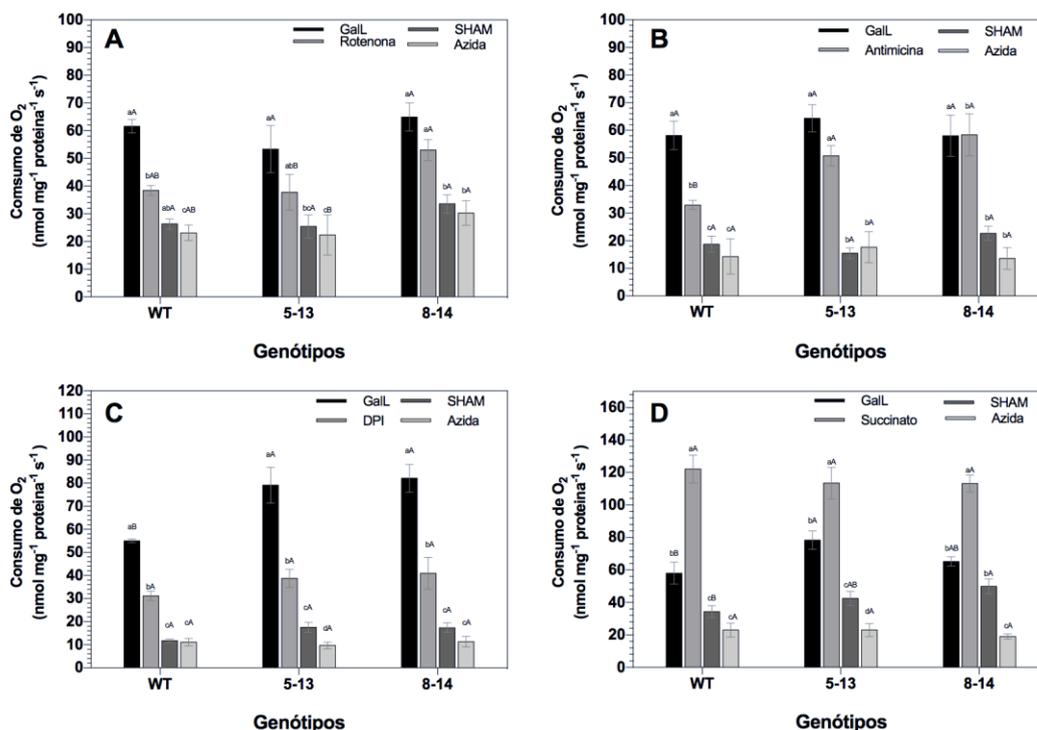


Figura 6: Taxa de consumo de O₂ via GalLDH e específica para COX e AOX em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14). Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram Gall (substrato oxidável para início do consumo de O₂), SHAM (inibidor da via AOX), azida (inibidor da via COX), rotenona (inibidor do complexo I), antimicina A (inibidor do complexo III), DPI (inibidor da GalLDH) e succinato (ativador do complexo II). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A adição de antimicina A (Figura 6B), conhecida por inibir a atividade do complexo III apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Apenas o WT indica diferença significativa ($P \leq 0,05$) quando este componente é adicionado ao meio de reação com queda na taxa respiratória de 44,16% do valor total de consumo de O₂. Inesperadamente, quando se adicionou DPI, o inibidor da própria GalLDH, foi observado menor ($P < 0,05$) consumo de O₂ em relação à respiração na presença apenas de Gall nos genótipos WT, 5-13 e 8-14, com quedas de cerca de 43, 48 e 49%, respectivamente, porém, não foi verificada diferença ($P < 0,05$) entre estes genótipos (Figura 6C).

Como esperado, a adição de succinato, conhecido estimulador do complexo II, favoreceu o consumo de O₂ na presença de Gall em todos os genótipos de tomateiro (Figura 6D). O aumento no consumo de O₂ foi da ordem de

62, 29 e 60% para WT, 5-13 e 8-14, respectivamente. Entretanto, a atividade respiratória também não foi bloqueada completamente com as adições de SHAM e azida de potássio, devido à ativação da GalLDH a partir da disponibilização de GalL, mesmo quando adiciona-se succinato (Figura 6C).

Assim como no tomate WT, a rotenona teve efeito significativo ($P \leq 0,05$) no consumo de O_2 via GalL em mamoeiro (Figura 7A). Porém, o efeito na respiração do mamão foi menos intenso que o observado no tomate WT. A taxa respiratória caiu cerca de 14% com a adição do inibidor do complexo I, o que representa aproximadamente a metade da queda observada no genótipo de tomateiro WT. Neste tratamento a manutenção do consumo de O_2 se repete como nos demais genótipos avaliados mantendo uma taxa de 45,7% do consumo de O_2 via GalL observado inicialmente.

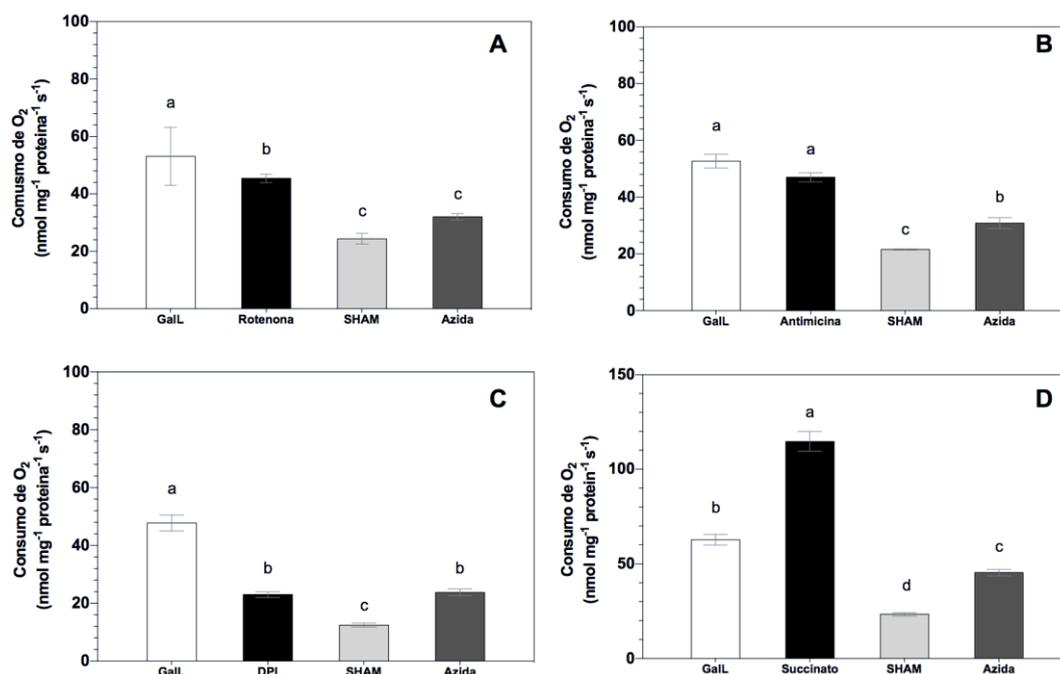


Figura 7: Taxa de consumo de O_2 via GalLDH e específica para COX e AOX em mamão 'Golden'. Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram GalL (substrato oxidável para início do consumo de O_2), SHAM (inibidor da via AOX), Azida (inibidor da via COX), rotenona (inibidor do complexo I), antimicina A (inibidor do complexo III), DPI (inibidor da GalLDH) e succinato (ativador do complexo II). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Por outro lado, a adição de antimicina A não teve efeito ($P \leq 0,05$) sobre o consumo de O_2 de mitocôndrias isoladas da polpa do mamão 'Golden' quando a GalLDH estava ativa pela presença de GalL como substrato oxidável (Figura 7B). Neste caso, a resposta do mamão assemelha-se à dos genótipos mutantes dos frutos de tomate que também não apresentaram diferença significativa na taxa de consumo de O_2 inicial após adição de antimicina A (Figura 6B).

O uso de DPI como inibidor da atividade GalLDH teve efeito significativo ($P \leq 0,05$) sobre o consumo de O_2 de mitocôndrias isoladas da polpa do mamão 'Golden' (Figura 7C). Assim como em todos os genótipos de tomateiro este inibidor provocou importante queda na taxa respiratória, sendo no 'Golden' a queda na ordem de 52% do consumo de O_2 originado da adição de GalL. Esta queda foi maior do que a verificada em todos os genótipos de tomateiro (Figura 6C).

A adição de succinato (estimulador do complexo II) em mitocôndrias extraídas do mamão 'Golden' também provocou aumento ($P \leq 0,05$) na taxa respiratória de cerca de 83% em relação ao consumo de O_2 após estimulada a atividade GalLDH com a adição de GalL (Figura 7D). A adição de succinato nas mitocôndrias da polpa do mamão teve efeito maior do que aquele observado em todos os genótipos de tomateiro, chegando a apresentar aumento maior que o dobro quando se compara o 'Golden' e o 5-13.

Em todos os casos de adições de inibidores (rotenona, antimicina A e DPI) e estimuladores (succinato) nos extratos de mitocôndrias do mamão "Golden" verifica-se que o consumo de O_2 permaneceu (ainda que mais baixo) mesmo na presença de SHAM e azida de potássio.

A atividade GalLDH, estimulada pela adição de GalL, foi estatisticamente igual nas linhas transgênicas que apresentam 2,03 e 0,7 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ na 5-13 e 8-14, respectivamente, bem como no WT que apresenta 4,95 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ (Figura 8).

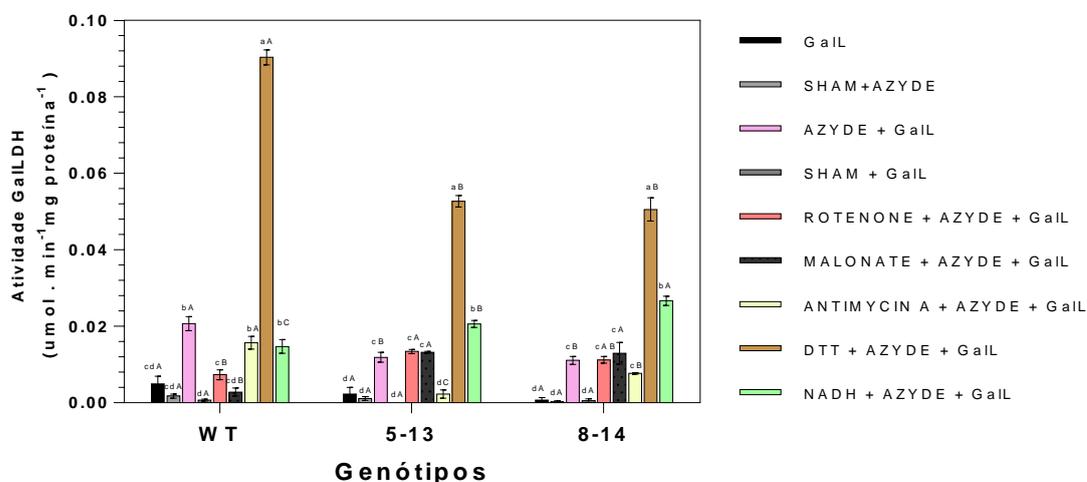


Figura 8: Atividade GalLDH via redução do citocromo c em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14). Utilizada azida nos tratamentos para manter a redução do Cit c. Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram GaIL (substrato oxidável para verificar a redução do Cit c), rotenona (inibidor do complexo I), malonato (inibidor do complexo II), antimicina A (inibidor do complexo III), DTT (estimulador da via AOX), NADH (estimulador do complexo I), SHAM (inibidor da via AOX) e azida (inibidor da via COX). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Igualaram-se estatisticamente também após a adição de SHAM em exclusividade ou em conjunto com azida de potássio (Figura 8). Quanto ao meio de reação, porém, foi aplicado azida de potássio (não mais em conjunto com SHAM), verificou-se um estímulo à atividade GalLDH em todos os genótipos, sendo maior ($P \leq 0,05$) nos mutantes que apresentam cerca de 5 vezes o valor verificado no tratamento controle.

Nas mitocôndrias extraídas de polpa de tomate cuja atividade COX estava bloqueada devido à presença de azida de potássio, a atividade GalLDH variou dependendo do nível de impedimento ao fluxo de elétrons da CTE. Quando foi inibido o complexo I (na presença de rotenona) ou o complexo II (após adição de malonato) a atividade GalLDH foi menor ($P \leq 0,05$) no WT e não diferiu entre as linhas transgênicas, enquanto que com a inibição do complexo III (após a adição de antimicina A) a atividade GalLDH foi maior ($P \leq 0,05$) no WT em comparação aos demais genótipos, mostrando-se menor ($P \leq 0,05$) no genótipo 5-13 (Figura 8). Já o

estímulo do complexo I com adição de NADH mostrou aumento na atividade GalLDH e diferença significativa entre os três genótipos ($P \leq 0,05$) com maiores valores de redução do citocromo c no genótipo mutante 5-13. (Figura 8).

O efeito de maior impacto na atividade GalLDH, sem dúvidas, foi a adição de DTT (estimulador da atividade AOX) ao meio de reação. Na presença de DTT a atividade GalLDH aumentou em cerca de 20 vezes no genótipo WT. Nos mutantes este aumento também se verifica, porém em menor intensidade (Figura 8).

Assim como nos genótipos de tomateiro, quando foram avaliadas as mitocôndrias da polpa do mamão 'Golden' foi possível observar menor atividade GalLDH todas as vezes que houve a adição de SHAM nos tratamentos quando compara-se com os tratamentos contendo azida e GalL (Figura 9). Nesta espécie o malonato (inibidor do complexo II) também provocou uma diminuição da atividade GalLDH. Entretanto, estes tratamentos se mostraram iguais ao tratamento controle sem azida de potássio mantendo seus valores em torno de $0,04 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg} \text{ proteína}^{-1}$.

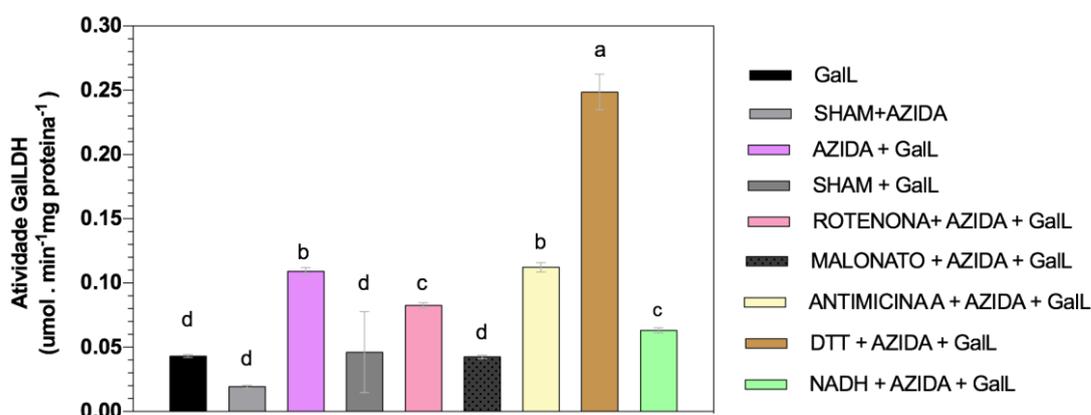


Figura 9: Atividade GalLDH via redução do citocromo c (Cit c) em frutos de mamão 'Golden'. Utilizada azida nos tratamentos para manter a redução do Cit c. Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram GalL (substrato oxidável para verificar a redução do Cit c), rotenona (inibidor do complexo I), malonato (inibidor do complexo II), antimicina A (inibidor do complexo III), DTT (estimulador da via AOX), NADH (estimulador do complexo I), SHAM (inibidor da via AOX) e azida (inibidor da via COX). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

O controle contendo azida de potássio em 'Golden' foi maior que aquele contendo apenas Gall, o que já era esperado visto que na ausência de azida ocorre a reoxidação do citocromo c reduzido via COX impossibilitando a visualização de um acúmulo de citocromo c reduzido. A adição de antimicina A a fim de inibir o complexo III não indica diferença significativa quando comparado ao tratamento contendo apenas azida de potássio e Gall. Já a adição de rotenona e NADH apresenta queda significativa ($P \leq 0,05$) inibindo e ativando o complexo I, respectivamente, e igualam-se. Assim como pode ser detectado em tomateiro, a adição de DTT, ativador da atividade AOX, elevou consideravelmente a atividade GalLDH, mostrando ser o tratamento mais eficiente quanto à atividade GalLDH.

De um modo geral, a atividade da GalLDH mostrou-se mais intensa em 'Golden' do que em todos os três genótipos avaliados de tomate. Esse efeito é facilmente observável comparando-se o tratamento com azida e Gall entre as duas espécies. Enquanto no tomateiro este tratamento não chega a $0,02 \mu\text{mol. min}^{-1} \text{mg prote\~{i}na}^{-1}$, em 'Golden' a redução do citocromo c ultrapassa o valor de $0,11 \mu\text{mol. min}^{-1} \text{mg prote\~{i}na}^{-1}$ de citocromo c reduzido, mostrando maior atividade GalLDH nesta espécie.

Como foi observado na Figura 8, a atividade GalLDH em tomateiro sofreu influência positiva e negativa com a adição de bloqueadores e ativadores da CTE quando se compara o tratamento contendo azida e Gall aos demais tratamentos. A influência mais evidente é percebida quando adiciona-se o inibidor da AOX e seu estimulador, o DTT. A atividade GalLDH praticamente não existe na presença de SHAM, o inverso é observado quando DTT é adicionado à reação, resultando nos maiores valores de citocromo c reduzido em três linhas avaliadas, sendo este aumento maior na linha WT.

Estes resultados estão de acordo com Millar et al. (2003), que ao extraírem mitocôndrias de *Arabidopsis* observaram que a biossíntese de AA nestas organelas elevava-se ou diminuía de acordo com o substrato ou inibidor da etapa respiratória adicionado à reação. Bartoli et al. (2000), também detectaram a influência dos transportadores de elétrons sobre a atividade GalLDH de mitocôndrias extraídas de folhas de batata. A adição de antimicina A provocou maior acúmulo de AA no trabalho citado, o que corrobora com o aumento na atividade GalLDH observado na Figura 8 quando adiciona-se o mesmo inibidor a reação em mitocôndrias extraídas de tomate WT, ainda que nas linhas mutantes

esse aumento não tenha sido detectado.

A adição de rotenona não teve influência nos genótipos mutantes de tomate quando este tratamento é comparado ao tratamento contendo azida e Gall. Apenas no WT observa-se uma significativa diminuição quando estes tratamentos são comparados.

Segundo Foyer & Noctor (2011), o AA e a glutathiona estão no centro do sistema antioxidante em organismos vegetais. Desta forma, a GalLDH como geradora do AA em vegetais estaria “na linha de frente” do controle contra o estresse oxidativo. Assim, a associação entre a atividade GalLDH e a AOX, aqui observada, pode ser explicada como integrantes de uma rede de controle do estresse oxidativo mitocondrial, onde a atividade de ambas é interdependente e qualquer fator que regule negativamente o desempenho da AOX afeta diretamente a atividade GalLDH (Popov et al., 1997; Wang et al., 2015; Noctor et al., 2018) como evidenciam os resultados apresentados nas Figura 8 e 9.

A produção de H_2O_2 em tomate via atividade GalLDH de modo geral apresentou diferença ($P \leq 0,05$) tanto entre os genótipos quanto em função dos bloqueadores dos complexos da CTE, com o WT produzindo mais H_2O_2 na maioria dos tratamentos quando comparado aos outros dois genótipos (Figura 10). No tratamento controle utilizando apenas Gall como substrato, sem a presença de qualquer inibidor, a produção de H_2O_2 foi maior ($P \leq 0,05$) no WT seguido pelo 8-14 e pelo 5-13.

As mitocôndrias extraídas do tomate da linha 5-13 apresentaram a menor produção de H_2O_2 igualando-se aos demais genótipos apenas nos tratamentos em que houve a inibição da AOX a partir da adição de SHAM, quando praticamente não se verificou a formação de H_2O_2 . O efeito da inibição da AOX sobre a produção de H_2O_2 foi muito parecido com o efeito observado quando tanto a AOX quanto a COX eram bloqueadas simultaneamente, com a produção de H_2O_2 praticamente nula. Esses resultados se devem muito provavelmente à inibição da AOX, uma vez que a inibição apenas da COX resultou em aumento ($P \leq 0,05$) na produção de H_2O_2 (Figura 10).

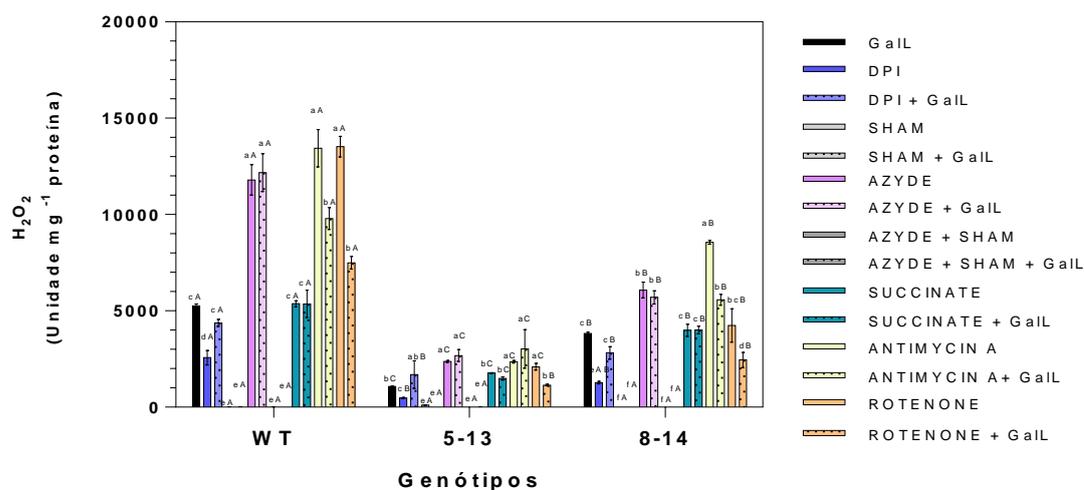


Figura 10: Acúmulo de H₂O₂ via GalLDH em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14). Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram GaLL (substrato ativador da GalLDH), DPI (inibidor de flavoenzimas como inibidor da GalLDH), SHAM (inibidor da via AOX), azida (inibidor da via COX), succinato (substrato ativador do complexo II), antimicina A (inibidor do complexo III) e rotenona (inibidor do complexo I). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A inibição da GalLDH, a partir da incubação das mitocôndrias com DPI mostrou-se eficiente na inibição da formação de H₂O₂ em todos os genótipos de tomate, efeito esse, porém que foi revertido quando estava presente no meio, além do DPI, também o substrato GaLL (Figura 10).

A adição de antimicina A também provocou aumento ($P \leq 0,05$) na produção de H₂O₂ independente do genótipo avaliado. A adição de rotenona apresentou resultados parecidos ao verificado com a adição de antimicina A no WT, enquanto a adição de succinato não interferiu ($P \leq 0,05$) na produção de H₂O₂ em todos os genótipos de tomateiro avaliados (Figura 10).

Marcadamente a inibição da AOX, conhecida por seu papel antioxidante em vegetais, provocou a total inibição na formação de H₂O₂ na presença de GaLL nos três genótipos de tomate, mesmo quando adicionava-se componentes que, isoladamente, já haviam favorecido a formação do H₂O₂, como no caso da azida.

Entretanto, no mamão todos os inibidores com exceção do DPI (rotenona, antimicina A e azida de potássio) promoveram a formação de H₂O₂ (Figura 11) na presença de GaLL, mantendo estes tratamentos acima do tratamento controle

($P \leq 0,05$). Succinato e DPI sem GalL se mostram efetivos ($P < 0,05$) na redução da geração de H_2O_2 mantendo os níveis desta molécula próximos a zero em mitocôndrias isoladas apresentando formação de H_2O_2 apenas na presença de GalL, todavia, no tratamento contendo DPI esta quantidade de H_2O_2 está abaixo do tratamento controle.

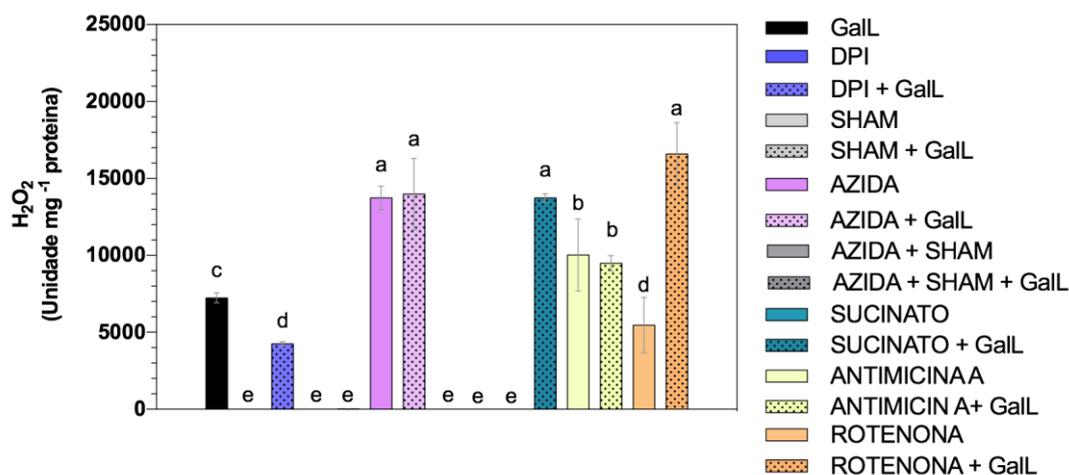


Figura 11: Acúmulo de H_2O_2 via GalLDH em 'Golden'. Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram GalL (substrato ativador da GalLDH), DPI (inibidor de flavoenzimas como inibidor da GalLDH), SHAM (inibidor da via AOX), azida (inibidor da via COX), succinato (substrato ativador do complexo II), antimicina A (inibidor do complexo III) e rotenona (inibidor do complexo I). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

A inibição da AOX com SHAM teve o mesmo efeito na produção de H_2O_2 em mitocôndrias isoladas da polpa do mamão 'Golden' já verificado em frutos de tomate. Em todos os tratamentos onde houve a inibição da AOX com SHAM verificou-se a inibição total da produção de H_2O_2 , mesmo naqueles tratamentos onde havia sido bloqueada a COX pela adição de azida de potássio, o que difere dos tratamentos sem a inibição da AOX quando foram observados valores de produção de H_2O_2 iguais ($P < 0,05$) aos observados no tratamento controle contendo apenas GalL.

A geração de H_2O_2 pelas mitocôndrias isoladas de tomate na presença de GalL é evidenciada na Figura 10. Os genótipos produziram H_2O_2 em um padrão semelhante, porém em quantidades distintas, sendo o WT o genótipo que mais

produziu H_2O_2 na presença de Gall, seguido pelo 8-14 e por último o 5-13.

A simples adição de Gall no extrato mitocondrial foi suficiente para ativar a formação de H_2O_2 , isso indica que a atividade GalLDH estaria gerando H_2O_2 enquanto produzia AA, como observa-se no tratamento controle contendo apenas mitocôndria e Gall. Este é um evento paradoxal, levando em conta a importante função da GalLDH na geração de AA, um dos mais potentes antioxidantes produzidos pelos vegetais (Foyer & Noctor, 2011; Wang et al., 2015; Rodríguez-Ruiz et al., 2017).

Estaria a GalLDH, amplamente conhecida em seu papel na formação de AA, contribuindo para o acúmulo de H_2O_2 intramitocondrial? Os resultados indicam que sim, e este acúmulo eleva-se a depender dos complexos transportadores de elétrons mitocondriais inibidos durante a atividade GalLDH. Obviamente estes resultados despertam a necessidade de um estudo mais assertivo a respeito da função da GalLDH no metabolismo vegetal. Esta capacidade de gerar H_2O_2 está associada ao contínuo consumo de O_2 , mesmo quando se adiciona os inibidores das oxidases terminais ao meio de reação (Figuras 4 e 5), visto que para a geração desta espécie reativa, demanda-se O_2 (Foyer & Noctor, 2011).

A geração de H_2O_2 em organismos vegetais sofre influência de uma série de fatores, tanto bióticos quanto abióticos. Solo e ar poluídos, altas concentrações de metais pesados no solo, solos salinos, luminosidade e calor excessivos e estresse bióticos podem elevar de forma drástica a geração de H_2O_2 . No interior das mitocôndrias, mínimas desordens no funcionamento dos transportadores de elétrons acarretam na formação desta espécie reativa pelo desvio de elétrons da cadeia (Gallie, 2013; Das & Roychoudhury, 2014;).

Os prejuízos para o organismo vegetal quando este componente é encontrado em níveis elevados no interior das mitocôndrias são muitos. Apesar do H_2O_2 não provocar a degradação do DNA como outras espécies reativas, ele pode ser convertido a OH^\bullet via $O^{\bullet-}$, que é extremamente reativo reagindo com biomoléculas, provocando a degradação de DNA e proteínas.

A obstrução de outros complexos da CTE nos genótipos de tomate promoveu uma geração ainda maior de H_2O_2 via Gall. A adição de antimicina A, inibidor do complexo III, apresentou o mais marcante acúmulo de H_2O_2 com diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os genótipos. A adição de Gall neste tratamento provocou diminuição na formação de H_2O_2 , entretanto, a produção de

H₂O₂ neste tratamento ainda se manteve mais alta na comparação com o controle (Figura 10).

Esta diminuição na formação de H₂O₂ também foi observada na linha 8- 14, levando o tratamento com antimicina A e Gall a níveis menores, porém ainda mais elevados que o controle contendo apenas Gall. Já no 5-13, tanto o tratamento apenas com antimicina A quanto o que também foi adicionado Gall, a produção de H₂O₂ foi mais alta quando comparados ao controle (Figura 10). A adição de azida também mostrou considerável aumento na geração de H₂O₂ e quando houve a adição de Gall a este tratamento, não se verificou a redução nestes níveis de H₂O₂. A inibição do complexo I com rotenona adicionando-se Gall só foi efetiva na produção de H₂O₂ no WT. Este era um resultado esperado diante dos resultados que evidenciam o complexo I, III e IV como centros geradores de espécies reativas nas mitocôndrias não só em vegetais, mas também em animais (Tormos et al., 2011; Huang et al., 2016).

Mais uma vez a inibição da AOX influenciou de modo significativo a produção de H₂O₂, como observado em tomate. Ao adicionar este inibidor os níveis de H₂O₂ são significativamente baixos quando não são completamente nulos (Figura 10). Levando em conta as funções conhecidas da via AOX no metabolismo respiratório e seu marcante envolvimento na mimetização da formação de ERO durante o transporte de elétrons da CTE (Talla et al., 2011), o esperado seria observar o aumento no acúmulo de H₂O₂ quando esta fosse inibida em qualquer condição (Jin et al., 2015; Vishwakarma et al., 2015; Zhang e Lin, 2015;). No entanto, a via AOX mostrou envolvimento com a atividade GalLDH, como pode ser observado nas figuras 8 e 9 e sendo o H₂O₂ produzido proveniente da oxidação do Gall via GalLDH, a inibição da AOX afetou diretamente a atividade GalLDH nas mitocôndrias de tomate, levando a geração de H₂O₂ por meio desta enzima a níveis muito menores (Ho et al., 2008; Das e Roychoudhury. 2014). Assim, é possível concluir que os maiores nível de H₂O₂ produzidos no WT são em decorrência da maior atividade GalLDH observada neste genótipo.

Em metabolismo animal já se sabe que determinado transporte reverso de elétrons em mitocôndrias de coração de rato via complexo II gerado por um acúmulo anormal de succinato promove injúrias no tecido do órgão, levando a inflamação e morte (Chouchani et al., 2014). Quando este evento se inicia ocorre uma maior geração de ROS via complexo I, provocando sinalização que

diminui o acúmulo de succinato tendo efeito terapêutico sobre as injúrias causadas por tal transporte reverso.

Como pode ser observado, tanto em mitocôndrias de tomate do genótipo WT quanto em mitocôndrias do mamão 'Golden' ocorreu aumento no consumo de O_2 via GalL quando adicionado succinato ao meio de reação, enquanto a adição de malonato para inibir o complexo II não eleva a geração de H_2O_2 nos genótipos sem mutação. Assim, a atividade GalLDH pode estar, em conjunto com o complexo II, favorecendo a geração de H_2O_2 , funcionando como mecanismo sinalizador por meio de transporte reverso de elétrons, assim como em animais.

A rotenona provocando pequena queda no consumo de O_2 serve como indicador desta hipótese, já que em animais é a atividade do complexo I que eleva a geração de ROS de sinalização, se neste caso o ROS gerado é via GalLDH, a inibição do complexo I compromete este consumo de O_2 , pois pode estar influenciando diretamente a atividade GalLDH. Este evento pode não estar sendo evidenciado nos genótipos mutantes exatamente pela menor atividade da enzima verificada.

Não houve diferença ($P \leq 0,05$) na produção de AA entre genótipos de tomateiro na presença ou não de GalL, precursor imediato do AA, bem como com as adições de SHAM, rotenona e DPI (Figura 12). A produção de AA não foi verificada quando as mitocôndrias foram incubadas sem a presença de GalL, confirmando a baixa atividade GalLDH neste tratamento. Com a adição de GalL, verifica-se um aumento na produção de AA em todos os genótipos com média de $1,45 \mu\text{mol mg proteína}^{-1}$. Porém, com a adição de azida observa-se um aumento muito marcante, cerca de 8 vezes, na produção de AA, com destaque ($P \leq 0,05$) para o WT em relação aos demais genótipos que não diferiram entre si. A adição de antimicina A estimulou a produção de AA apenas no WT, com efeito, muito pequeno nos demais genótipos comparando com o tratamento contendo apenas GalL (Figura 12).

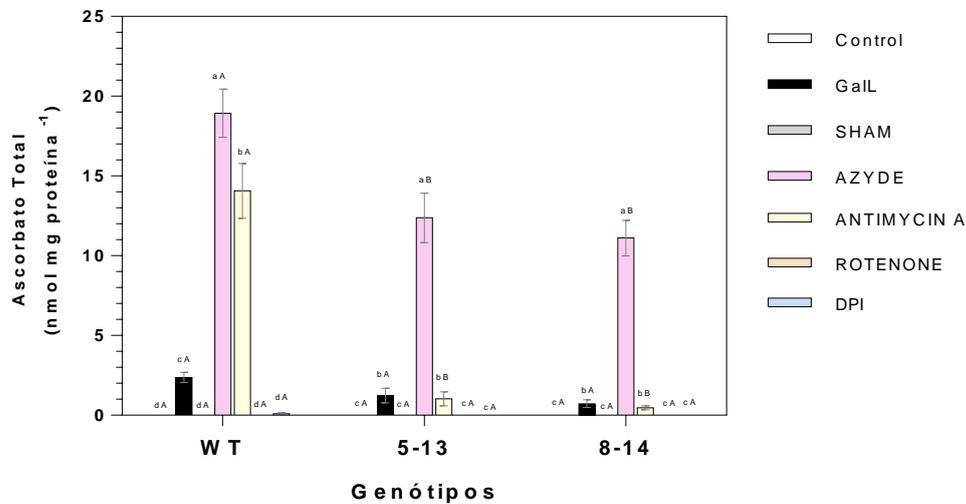


Figura 12: Acúmulo de AA via GalLDH em três genótipos de frutos de tomate, sendo um tipo selvagem (WT) e duas linhas transgênicas (5-13 e 8-14). Utilizado um controle contendo apenas extrato de mitocôndrias purificado. Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram GalL (substrato ativador da GalLDH), SHAM (inibidor da via AOX), azida (inibidor da via COX), antimicina A (inibidor do complexo III), rotenona (inibidor do complexo I) e DPI (inibidor de flavoenzimas como inibidor da GalLDH). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

Similar aos genótipos de tomateiro, em frutos de mamão 'Golden' o tratamento contendo apenas isolado de mitocôndria, sem a adição de GalL, não apresenta geração de AA. Isto confirma a baixa atividade da GalLDH na ausência de GalL, enquanto o tratamento contendo 5 mM de GalL apresenta pouco mais de 2,0 nmol de AA nmol mg proteína⁻¹ (Figura 13), resultado também similar aos mesmos tratamentos dos frutos de tomate WT (Figura 12).

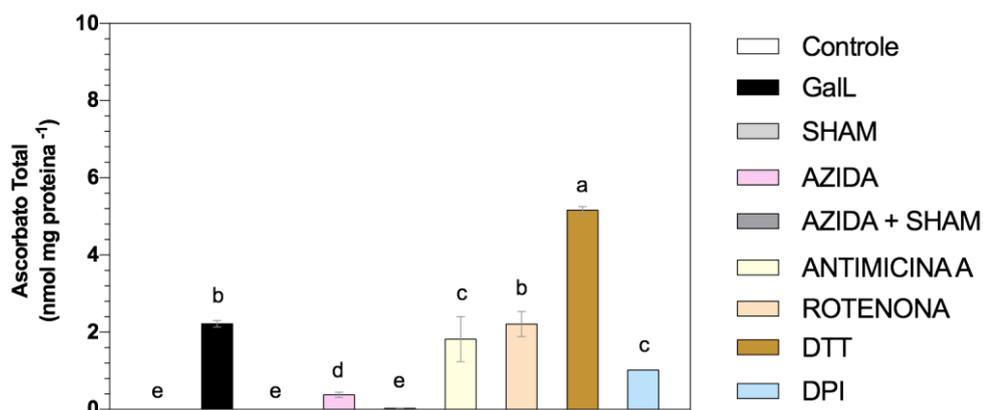


Figura 13: Acúmulo de AA via GalLDH em 'Golden'. Utilizado um controle contendo apenas extrato de mitocôndrias purificado. Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram Gall (substrato ativador da GalLDH), SHAM (inibidor da via AOX), azida (inibidor da via COX), antimicina A (inibidor do complexo III), rotenona (inibidor do complexo I) e DPI (inibidor de flavoenzimas como inibidor da GalLDH). Letras maiúsculas representam diferença entre genótipos e minúsculas entre tratamentos. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade.

De modo inverso ao que se detectou em tomate, a adição do inibidor da COX (azida) em mamão diminuiu significativamente a produção de AA apresentando quantidades menores quando comparadas ao tratamento controle apenas com Gall estando também abaixo dos tratamentos contendo antimicina A e rotenona (Figura 13). As adições de antimicina A e DPI mostram diferença ($P \leq 0,05$) com o tratamento controle, porém o efeito destes dois inibidores não é comparável à ação do SHAM sobre o acúmulo de AA em 'Golden'. A inibição da AOX, pela adição de SHAM, inibiu praticamente por completo a formação de AA em todos os tratamentos em que esteve presente, igualando-se ($P \leq 0,05$) ao tratamento controle onde estava presente apenas o isolado mitocondrial.

A adição de SHAM também provocou a inibição na formação de AA em mitocôndrias de tomate, como pode ser observado na Figura 12. Assim como na atividade GalLDH e formação de H_2O_2 , a adição de azida elevou as concentrações de AA. Estes dados mostram que a inibição da COX estimula a níveis consideráveis a atividade GalLDH, influenciando na concentração de AA.

Efeito parecido é observado com azida quando se adiciona antimicina A no genótipo WT, que apresentou elevada produção de AA com a adição deste inibidor do complexo III, enquanto este evento não se observa nas linhas transgênicas.

Diversos fatores internos e externos podem provocar influência sobre a atividade GalLDH e por consequência na concentração de AA (Bartoli et al., 2009; Gallie, 2013). Mais uma vez se evidencia a conexão entre o funcionamento da GalLDH e os componentes da CTE, onde a obstrução ou o estímulo de um destes complexos pode controlar a biossíntese do AA.

Em tomate, a inibição de alguns destes componentes apresentou consequências mais significativas no acúmulo do AA, como é o caso do DPI, rotenona e SHAM. Entretanto, nenhum destes teve influência tão marcante sobre a GalLDH quanto o SHAM, reforçando a interconexão destas duas enzimas, a GalLDH e a AOX, em seus funcionamentos. Em todos os testes a inibição da via AOX provocou influência negativa sobre a via GalLDH.

Os níveis de AA chegaram a zero em todos os genótipos de tomate avaliados quando as mitocôndrias incubadas com GalL receberam a adição de SHAM. Em contrapartida, a adição de DTT a fim de estimular a AOX provocou concentrações tão elevadas de AA que estas foram difíceis de serem quantificadas pelo método proposto para a análise. Ainda que toda a etapa de transporte de elétrons na CTE possa influenciar a atividade GalLDH e a geração de AA, os resultados aqui verificados mostram que a via AOX apresenta uma forte interação com a última etapa da biossíntese do AA. É possível que a AOX atue em conjunto com a GalLDH em tomateiro durante a fase de amadurecimento, mantendo o controle sobre a biossíntese do AA e a atividade da GalLDH.

Com este estudo fica claro a relação dos complexos da CTE sobre a atividade GalLDH em sua produção de AA, bem como em sua possível produção de H_2O_2 . Os complexos I, III e COX quando inativos estimulam a atividade GalLDH na formação de H_2O_2 , enquanto a AOX provoca influência sobre a GalLDH tanto ativa quanto inativa. Em atividade, a AOX estimula a geração de AA e H_2O_2 , enquanto inibida os níveis destas duas moléculas geradas chegam a quantidades muito pequenas. Um modelo ilustrativo foi proposto para elucidar estas informações (Figura 14). É preciso seguir nos estudos a respeito da influência da atividade GalLDH sobre a etapa respiratória, se os eventos detectados aqui ocorrerem em tecido intacto é possível que a atividade GalLDH possa influenciar fases do desenvolvimento vegetal, como, por exemplo o amadurecimento? O H_2O_2 gerado pela enzima pode servir como sinalizador ativando rotas metabólicas essenciais às transformações do fruto durante o amadurecimento?

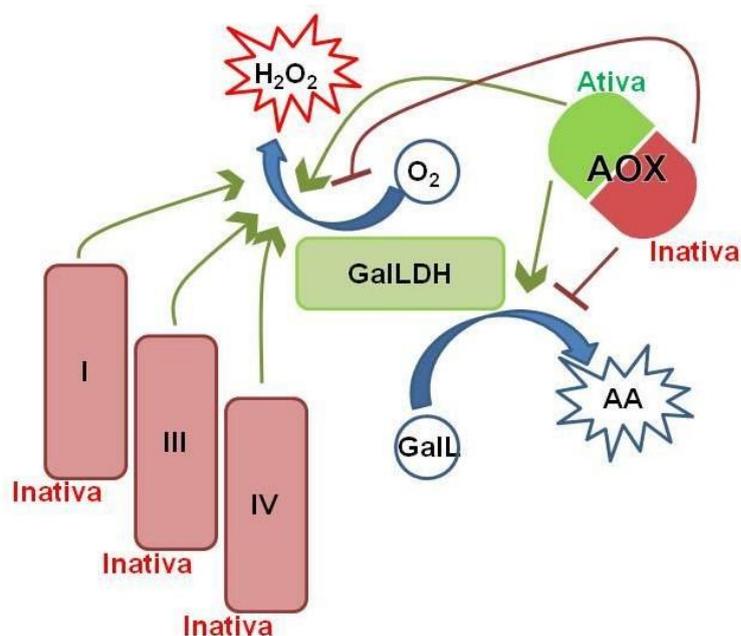


Figura 14: Modelo ilustrativo das principais influências dos complexos da CTE sobre a atividade GalLDH na produção de AA e H₂O₂. Setas vermelhas indicam a supressão do acúmulo de AA ou H₂O₂ por um complexo da CTE, setas verdes indicam estímulo no acúmulo de AA ou H₂O₂ por um complexo da CTE.

O bloqueio da atividade destes componentes da CTE além de provocar o acúmulo de ERO, como é o caso do H₂O₂, minimiza a geração de AA, o qual é essencial no combate às concentrações tóxicas destas moléculas. O controle enzimático de H₂O₂ torna-se comprometido, visto que a APX utiliza o AA na conversão de H₂O₂ em H₂O e oxigênio. Além disso, a produção mínima de AA compromete sua ciclagem, sem esta etapa de reciclar o H₂O₂, OH[•] e O^{•-} não são degradados, impedindo a geração de α-tocoferol a partir do tocoferoxil, essencial na proteção das membranas de danos oxidativos. Sem estes mecanismos, a exposição da célula aos radicais livres aumenta comprometendo o seu funcionamento e até mesmo provocando a morte celular (Sharma & Pessarakli., 2012; Das & Roychoudhury., 2014).

A geração de H_2O_2 via GalLDH aqui verificada pode não ter ação apenas danosa em estruturas celulares. Esta é uma molécula importantíssima em diversos processos metabólicos (dos Santos Soares e Machado, 2007). Durante o amadurecimento a geração de H_2O_2 funciona como sinalizador de processos metabólicos que favorecem esta etapa do desenvolvimento, como, por exemplo, o abrandamento da polpa está associado à digestão dos componentes da parede celular, algumas enzimas que degradam lignina necessitam da presença de H_2O_2 em seu funcionamento (Carvalho et al., 2009). Portanto, o H_2O_2 produzido via GalLDH pode favorecer o abrandamento da polpa tanto de tomate quanto de mamão durante o amadurecimento, fase em que este processo metabólico ocorre de forma intensa.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Os resultados indicam a influência dos complexos transportadores de elétrons da CTE sobre a atividade GalLDH, sendo esta relação mais marcante quando se trata da COX e AOX. A influência destes complexos não é igual quando se compara a atividade GalLDH e a produção de AA, o que demonstra que a produção de AA é influenciada por outros fatores além da atividade GalLDH.

A respiração de um modo geral também sofre influência da via GalLDH, sendo impossível observar a completa inibição do consumo de O₂ em mitocôndrias isoladas de tomate e mamão quando o substrato oxidável é o GalL. É atribuído o consumo de O₂ resistente aos inibidores das oxidases terminais à formação de H₂O₂.

A atividade AOX mostra-se estreitamente associada à atividade GalLDH, interferindo também na produção de AA pela enzima GalLDH.

A atividade da GalLDH em conjunto com a respiração pode gerar concentrações elevadas H₂O₂ e o acúmulo desta espécie reativa de O₂ via GalL sofre influência direta também da via AOX, bem como de outros componentes da CTE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguila, J. S. D., Ortega, E. M. M., Aguilá, L. S. H., Cluge, R. H. (2011). Efeito de diferentes temperaturas de aplicação ou não de etileno exógeno sobre a qualidade da manga 'Tommy Atkins'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 298 - 305
- Alhagdow, M., Mounet, F., Gilbert, L., Nunes-Nesi, A., Garcia, V., Just, D., 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*, 1408-1422
- Alves, A. I., Teixeira, L. J. Q., Saraiva, S. H., de Souza Carneiro, J. (2015). Revalidação do método titulométrico para determinação do ácido ascórbico. *Ceres*, 61, 156-161
- Antunes, L. E. C., Duarte Filho, J., Souza, C. D. (2003). Conservação pós-colheita de frutos de amoreira-preta. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38, 413-419.
- apple fruit. II. Alternative oxidase is induced at the climacteric. *Plant Physiology*, 24-31
- Aroucha, E. M. M., Souza, C., Souza, A. D., Ferreira, R. D. A., Aroucha-Filho, J. C. (2012). Qualidade pós-colheita da cajarana em diferentes estádios de maturação durante armazenamento refrigerado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 391-399
- Arrigoni, O., De Tullio, M. C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1-9
- Asghari, M., Aghdam, M. S. (2010). Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in Food Science and Technology*, 502-509

- Azevedo, I. G., Santos, C. A. (2011). Influência do etileno e da H⁺-ATPase durante o amadurecimento de frutos. *Ciências Biológicas e da Saúde*, 12-20
- Azzolini, M., Jacomino, A. P., Bron, I. U. (2004). Índices para avaliar qualidade pós-colheita de goiabas em diferentes estádios de maturação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 139-145
- Baena-González, E., Sheen, J. (2008). Convergent energy and stress signaling. *Trends in plant science*, 474-482
- Barbosa, M. R., Medeiros de Araújo Silva, M., Willadino, L., Ulisses, C., Rangel Camara, T. (2014). Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, 44
- 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*, 335-344
- Bartoli, C. G., Tambussi, E. A., Diego, F., Foyer, C. H. (2009). Control of ascorbic acid synthesis and accumulation and glutathione by the incident light red/far red ratio in *Phaseolus vulgaris* leaves. *FEBS Letters*, 118–122
- Bartoli, C. G., Yu, J., Gomez, F., Fernández, L., McIntosh, L., Foyer, C. H. (2006). Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1621-1631
- Bartoli, C. G., Yu, J., Gómez, F., Fernández, L., McIntosh, L., Foyer, C. H. (2006). Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Experimental Botany*, 1621-1631
- Begcy, K., Mariano, E. D., Mattiello, L., Nunes, A. V., Mazzafera, P., Maia, I. G., Menossi, M. (2011). An *Arabidopsis* mitochondrial uncoupling protein confers tolerance to drought and salt stress in transgenic tobacco plants. *PloS one*, 1-9
- Benlloch, R., Farre, R., Frigola, A. (1993). A quantitative estimate of ascorbic and isoascorbic acid by high performance liquid chromatography: application to citric juices. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 3113-3122
- Blokhina, O., Fagerstedt, K. V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia plantarum*, 447-462
- Boatright, W. L. (2015). Oxygen dependency of one-electron reactions generating ascorbate radicals and hydrogen peroxide from ascorbic acid. *Food chemistry*, 1361-1367
- Bodenstein-Lang, J., Buch, A., Follmann, H. (1989). Animal and plant mitochondria contain specific thioredoxins. *FEBS letters*, 22-26

- Borisjuk, L., Rolletschek, H., Walenta, S., Panitz, R., Wobus, U., Weber, H. (2003). Energy status and its control on embryogenesis of legumes: ATP distribution within *Vicia faba* embryos is developmentally regulated and correlated with photosynthetic capacity. *The Plant Journal*, 318-329
- Brackmann, A., Pavanello, E. P., Both, V., Janisch, D. I., Schmitt, O. J., Giménez, G. (2015). Avaliação de genótipos de morangueiro quanto à qualidade e potencial de armazenamento. *Ceres*, 542-547
- Bradford, M. M. 1976. Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-259
- Branco, I. G., Sanjinez-Argandoña, E. J., Silva, M. D., Paula, T. D. (2007). Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um blend de laranja e cenoura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 7-12
- Brandão, M. C. C., Maia, G. A., Lima, D. P., Parente, E. D. S., Campello, C. C., Nassu, R. T., Sousa, P. H. M. D. (2003). Análise físico-química, microbiológica e sensorial de frutos de manga submetidos à desidratação osmótico-solar. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38-41
- Bulbovas, P., Rinaldi, M., Delitti, W. B., Domingos, M. (2005). Seasonal variation in antioxidants in leaves of young plants of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood). *Brazilian Journal of Botany*, 687-696
- Butler, A. R., Gash, R. (1993). Of sailors and scientists-the story of vitamin C. *Education In Chemistry*, 122-122
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C. I., Stoppani, A. O. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics*, 248-257
- Calegario, J. M., Pezzi, E., Bender, R. J. (2002). Utilização de atmosfera modificada na conservação de morangos em pós-colheita. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1049-1055
- Campos, R. P., Hiane, P. A., Ramos, M. I. L., Ramos Filho, M. M., Macedo, M. L. R. (2012). Conservação pós-colheita de guavira (*Campomanesia* sp.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41-49
- Carvalho, W., Canilha, L., Ferraz, A., Milagres, A. M. F. (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Química Nova*, 1-5
- Chitarra, M. I. F.; Chitarra, A. B. (2005). Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e manuseio. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 785

- Chouchani, E. T., Pell, V. R., Gaude, E., Aksentijević, D., Sundier, S. Y., Robb, E. L., Eyassu, F. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature*, 431
- Considini, M. J., Daley, D. O., Whelan, J. (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology*, 1619-1629
- Cvetkovska, M., Vanlerberghe, G. C. (2012). Alternative oxidase modulates leaf mitochondrial concentrations of superoxide and nitric oxide. *New Phytologist*, 32-39
- Czarna, M., Jarmuszkiewicz, W. (2005). Activation of alternative oxidase and uncoupling protein lowers hydrogen peroxide formation in amoeba *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS letters*, 3136-3140
- da Silva Pereira, G., de Castro Machado, F. L., da Costa, J. M. C. (2014). Aplicação de recobrimento prolonga a qualidade pós-colheita de laranja 'Valência Delta' durante armazenamento ambiente. *Revista Ciência Agrônômica*, 520-527
- Das, K., Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 1 - 13
- Davey, M. W., Montagu, M. V., Inzé, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N., Fletcher, J. (2000). Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 825-860
- Davies, S. G., Ichihara, O. (1991). Asymmetric synthesis of R- β -amino butanoic acid and S- β -tyrosine: Homochiral lithium amide equivalents for Michael additions to α , β -unsaturated esters. *Tetrahedron Asymmetry*, 183-186
- Deng, X. G., Zhu, T., Zhang, D. W., Lin, H. H. (2015). The alternative respiratory pathway is involved in brassinosteroid-induced environmental stress tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany*, 6219–6232
- Deuner, S., Alves, J. D., Fries, D. D., Zanandrea, I., Lima, A. A., de Castro Henrique, P., Patrícia de Fátima, P. G. (2008). Peróxido de hidrogênio e ácido ascórbico influenciando a atividade de enzimas antioxidantes de mudas de cafeeiro. *Ceres*, 135-140
- Dietz, K. J. (2016). Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast?. *Molecules and cells*, 20
- dos Santos Soares, A. M., Machado, O. L. T. (2007). Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas*, 10

- Feingold, D. S. (1982). Aldo (and keto) hexoses and uronic acids in plant Carbohydrates I (pp. 3-76). Springer Berlin Heidelberg
- Ferreira, D. F. (2014). Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e agrotecnologia*, 109-112
- Flores, R., Stefanello, S., Franco, E., Mantovani, N. (2012). Regeneração in vitro de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.). *Current Agricultural Science and Technology*, 201-205.
- Florez-Sarasa, I., Flexas, J., Rasmusson, A. G., Umbach, A. L., Siedow, J. N., Ribas-Carbo, M. (2011). In vivo cytochrome and alternative pathway respiration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with altered alternative oxidase under different light conditions. *Plant, cell & environment*, 1373-1383.
- Foyer, C. H. (2017). Ascorbic acid. In *Antioxidants in higher plants* (pp. 31-58). CRC press.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2011). Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology*, 2-18
- Foyer, C. H., Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant physiology*, 93- 100.
- 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*, 241-254
- Freitas, M. S. M., Monnerat, P. H., Pinho, L. D. R., Carvalho, A. D. (2006). Deficiência de macronutrientes e boro em maracujazeiro doce: qualidade dos frutos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 492-496.
- Gallie, D. R. (2013). L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. *Scientifica*, 1–24
- Gandin, A., Denysyuk, M., Cousins, A. B. (2014). Disruption of the mitochondrial alternative oxidase (AOX) and uncoupling protein (UCP) alters rates of foliar nitrate and carbon assimilation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 3133-3142
- Gergoff, G., Chaves, A., Bartoli, C. G. (2010). Ethylene regulates ascorbic acid content during dark-induced leaf senescence. *Plant science*, 207- 212
- Gómez, F., Fernández, L., Gergoff, G., Guiamet, J. J., Chaves, A., Bartoli, C. G. (2008). Heat shock increases mitochondrial H₂O₂ production and extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest Biology and Technology*, 229–234
- Gonçalves, R. L., Quinlan, C. L., Pervoshchikova, 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*, 209-227

- Haworth, W. N. (1933). The constitution of ascorbic acid. *Journal of the Society of Chemical Industry*, 482-485
- Hey-Mogensen, M., Goncalves, R. L., Orr, A. L., Brand, M. D. (2014). Production of superoxide/H₂O₂ by dihydroorotate dehydrogenase in rat skeletal muscle mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 149- 155
- Ho, L. H. M., Giraud, E., Uggalla, V., Lister, R., Clifton, R., Glen, A., Whelan, J. (2008). Identification of Regulatory Pathways Controlling Gene Expression of Stress-Responsive Mitochondrial Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 1858–1873
- Huang, S., Van Aken, O., Schwarzländer, M., Belt, K., Millar, A. H. (2016). The Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cellular Signaling and Stress Response in Plants. *Plant Physiology*, 1551–1559
- Huang, W., Wang, G. L., Li, H., Wang, F., Xu, Z. S., Xiong, A. S. (2016). Transcriptional profiling of genes involved in ascorbic acid biosynthesis, recycling, and degradation during three leaf developmental stages in celery. *Molecular genetics and genomics*, 2131-2143
- Jarmuszkiewicz, W., Milani, G., Fortes, F., Schreiber, A. Z., Sluse, F. E., Vercesi, A. E. (2000). First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS letters*, 145-149
- Jiménez, A. M., Sierra, C. M., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., Osorio, C. (2011). Physicochemical characterisation of gulupa (*Passiflora edulis* Sims. fo *edulis*) fruit from Colombia during the ripening. *Food Research International*, 1912-1918
- Jin, Y., Liu, K., Peng, J., Wang, C., Kang, L., Chang, N., Sun, H. (2015). Rhizoma Dioscoreae Nipponicae polysaccharides protect HUVECs from H₂O₂-induced injury by regulating PPAR γ factor and the NADPH oxidase/ROS-NF- κ B signal pathway. *Toxicology Letters*, 149–158
- Junior, E. N. D. O., dos Santos, C. D., de Abreu, C. M. P., Corrêa, A. D., Santos, J. Z. L. (2003). Análise nutricional da fruta-de-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento. *Ciência e Agrotecnologia*, 846-851
- Kao, C. H. (2015). Role of L-Ascorbic Acid in Rice Plants. *ResearchGate*, 1-7
- Keunen, E., Schellingen, K., Van Der Straeten, D., Remans, T., Colpaert, J., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2015). ALTERNATIVE OXIDASE1a modulates the oxidative challenge during moderate Cd exposure in Arabidopsis thaliana leaves. *Journal of experimental botany*, 2967- 2977
- Kirschnik, P. G., Trindade, M. A., Gomide, C. A., Moro, M. E. G., Viegas, E. M. M. (2013). Estabilidade em armazenamento da carne de tilápia-do-nilo mecanicamente separada, lavada, adicionada de conservantes e congelada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 935-942

- Kubola, J., Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food chemistry*, 1138-1145
- Landi, M., Fambrini, M., Basile, A., Salvini, M., Guidi, L., Pugliesi, C. (2015). Overexpression of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH) gene correlates with increased ascorbate concentration and reduced browning in leaves of *Lactuca sativa* L. after cutting. *Plant Cell*, 109- 120.
- Lázaro, J. J., Jiménez, A., Camejo, D., Iglesias-Baena, I., del Carmen Martí, M., Lázaro-Payo, A., Sevilla, F. (2013). Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Frontiers in plant science*, 4
- 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*, 713–726
- Lima, A. R., Barbosa, V. C., Santos Filho, P. R., Gouvêa, C. M. C. P. (2006). Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 531-536.
- Mariano, A. B. (2005). Efeitos do estresse sobre componentes alternativos da cadeia respiratória e na transição de permeabilidade em mitocôndrias de tubérculos de batata e caracterização de mitocôndrias de *Araucaria angustifolia*.
- Marinho, C. S., Oliveira, M. D., Monnerat, P. H., Vianni, R., Maldonado, J. F. (2001). Fontes e doses de nitrogênio e a qualidade dos frutos do mamoeiro. *Scientia Agricola*, 345-348
- Matsuura, F. C. A. U., Cardoso, R. L., Folegatti, M. D. S., Oliveira, J. R. P., Oliveira, J. D., Santos, D. D. (2001). Avaliações físico-químicas em frutos de diferentes genótipos de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 602-6
- Mazorra, L. M., Oliveira, M. G., Souza, A. F., Silva, W. B. D., Santos, G. M. D., Silva, L. R. A. D., Oliveira, J. G. D. (2013). Involvement of brassinosteroids and ethylene in the control of mitochondrial electron transport chain in postharvest papaya fruit. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 0-0
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 1254-1255
- Melo, A. A. M., Vilas, B., Justo, C. F. (2009). Uso de aditivos químicos para a conservação pós-colheita de Banana 'Maçã' minimamente processada. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 228-236
- Meng, D., Shen, L., Yang, R., Zhang, X., Sheng, J. (2014). Identification and active site analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase catalysing the synthesis of ethylene in *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 120- 128

- Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G., Heazlewood, J. L., Bartoli, C. G., Theodoulou, F. L., Foyer, C. H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, 443-447
- Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Giegé, P., Leaver, C. J. (2001). Analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome. *Plant Physiology*, 1711-1727
- 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*, 79-104
- Morgado, C. A., Durigan, J. F., Lopes, V. G., Santos, L. O. (2010). Conservação pós-colheita de goiabas 'Kumagai': Efeito do estágio de maturação e da temperatura de armazenamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 1001-1008
- Morgado, C. M. A., Durigan, J. F., Lopes, V. G., Santos, L. O. (2010). Conservação pós-colheita de goiabas' Kumagai': efeito do estágio de maturação e da temperatura de armazenamento. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 1001-1008
- Mosegue, G. B., Rozenfeld, S., Veras, R. P., Vianna, C. M. (1999). Avaliação da qualidade do uso de medicamentos em idosos. *Revista Saúde Pública*, 437-44.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J. P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 185-195.
- Nègre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Trolly, M., Salvayre, R., Casteilla, L. (1997). A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *The FASEB Journal*, 809-815
- Nhung, D. T. T., Bung, P. N., Ha, N. T., Phong, T. K. (2010). Changes in lycopene and beta carotene contents in aril and oil of gac fruit during storage. *Food Chemistry*, 326-331
- Noctor, G., Peape. R., Foyer, H. F., (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Cell Press*, 125-134
- Noctor, G., Reichheld, J. P., Foyer, C. H. (2018). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 3–12
- Oliveira, D. S., Aquino, P. P., Ribeiro, S. M. R., Proença, R. P. C., Pinheiro-Sant'Ana, H. M (2011). Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. *Health Sciences*, 89-98
- Oliveira, H. C., Salgado, I., Sodek, L. (2013). Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. *Planta*, 255-264

- Oliveira, M. G., Mazorra, L. M., Souza, A. F., Silva, G. M. C., Correa, S. F., Santos, W. C., Oliveira, J. G. (2015). Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of Plant Physiology*, 42–50
- Oliveira, M. G., Mazorra, L. M., Souza, A. F., Silva, G. M. C., Correa, S. F., Santos, W. C., Silva, M. A. P. (2015). Involvement of AOX and UCP pathways in the post-harvest ripening of papaya fruits. *Journal of plant physiology*, 42-50
- Oliveira, M. G., (2012). Armazenamento de frutos de mamoeiro: investigação da participação da oxidase alternativa e da proteína desacopladora na respiração em mitocôndrias isoladas da polpa do fruto. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 106p
- Ornelas-Paz, J. J., Yahia, E. M., Ramírez-Bustamante, N., Pérez-Martínez, J., Escalante-Minakata, M. P., Ibarra-Junquera, V., Costa-Muñiz, C., Guerrero-Prieto, V., Ochoa-Reyes, E., (2013). Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry*, 372-381
- Osorio, S., Scossa, F., Fernie, A. R., (2013). Molecular regulation of fruit ripening. *Plant Science*, 1-8
- Passaia, G., Fonini, L. S., Caverzan, A., Jardim-Messeder, D., Christoff, A. P., Gaeta, M. L., Margis-Pinheiro, M. (2013). The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H₂O₂ homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant science*, 93-101
- 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*, 1623-1633.
- Patterson, H. C., Gerbeth, C., Thiru, P., Vögtle, N. F., Knoll, M., Shahsafaei, A., Chen, C. (2015). A respiratory chain controlled signal transduction cascade in the mitochondrial intermembrane space mediates hydrogen peroxide signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5679-5688
- Paul, V., Pandey, R., Srivastava, G. C. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene. *Journal of food science and technology*, 1-21
- 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*, 298-309
- Perotti, V. E., Moreno, A. S., Podestá, F. E. (2014). Author ' s personal copy Mitochondrion Physiological aspects of fruit ripening: The mitochondrial connection. *Systems Biology*, 1–6

- Pinela, J., Barros, L., Morales, P., Cabo Verde, S., Carvalho, A. M., Oliveira, M. P. P., Ferreira, I. C. (2018). Efeito da irradiação na estabilidade de vitaminas essenciais em azedas (*Rumex induratus*) armazenadas a 4° *XXIV Encontro Luso Galego de Química*, 0-0
- Pinto, L. K. A., Martins, M. L. L., Resende, E. D., Thiébaud, J. T. L., Martins, M. A. (2013). Avaliação da atividade das enzimas pectinametilesterase e β -galactosidase em mamões cv. Golden armazenados sob diferentes concentrações de oxigênio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 15-22.
- Pinto, P. M., Jacomino, A. M., Silva, S. R., Andrade, C. A. W., (2013). Ponto de colheita e maturação de frutos de camu-camu colhidos em diferentes estádios. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 605-612
- Pires, R. M. G. (2015). *Contribuição da vitamina C, carotenóides e compostos fenólicos no potencial antioxidante de várias variedades de citrinos*.
- Popov, V., Simonian, R., Skulachev, V., Starkov, A. (1997). Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *FEBS Letters*, 415, 87–90
- Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., Stewart, C. R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*, 65-74
- Rahantaniaina, M.-S., Li, S., Chatel-Innocenti, G., Tuzet, A., Issakidis-Bourguet, E., Mhamdi, A., Noctor, G. (2017). Cytosolic and Chloroplastic DHARs Cooperate in Oxidative Stress-Driven Activation of the Salicylic Acid Pathway. *Plant Physiology*, 956–971
- Rasmusson, A. G., Geisler, D. A., Møller, I. M. (2008). The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion*, 47-60
- Reichstein, T., Grussner, A., Oppenheimer, R. (1933). Synthesis of d-and L-ascorbic acid (vitamin C). *Nature*, 280
- Resende, M. L. V., Salgado, S. M., Chaves, Z. M. (2003). Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 123-130.
- 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*, 171–18
- Saha, B., Borovskii, G., Panda, S. K. (2016). Alternative oxidase and plant stress tolerance. *Plant signaling & behavior*, 1256-1530

- Sampaio, S. A., Bora, P. S., Holschuh, H. J., Silva, S. D. M. (2007). Postharvest respiratory activity and changes in some chemical constituents during maturation of yellow mombin (*Spondias mombin*) fruit. *Food Science and Technology*, 511-515
- Scheckhuber, C. Q., Houthoofd, K., Weil, A. C., Werner, A., De Vreese, A., Vanfleteren, J. R., Osiewacz, H. D. (2011). Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the ageing model *Podospira anserina*. *PloS one*, 1-9
- Schimmeyer, J., Bock, R., Meyer, E. H. (2016). L-Galactono-1, 4-lactone dehydrogenase is an assembly factor of the membrane arm of mitochondrial complex I in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 90(1- 2), 117-126
- Serpa, M. F. P., Castricini, A., Mitsobuzi, G. P., Martins, R. N., Batista, M. F., de Almeida, T. H. (2015). Conservação de manga com uso de fécula de mandioca preparada com extrato de cravo e canela. *Ceres*, 975-982
- Sewelam, N., Jaspert, N., Van Der Kelen, K., Tognetti, V. B., Schmitz, J., Frerigmann, H., Maurino, V. G. (2014). Spatial H₂O₂ signaling specificity: H₂O₂ from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Molecular Plant*, 1191-1210
- 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*, 1–26
- Siddique, S., Matera, C., Radakovic, Z. S., Shamim Hasan, M., Gutbrod, P., Rozanska, E., Grundler, F. M. W. (2014). Parasitic Worms Stimulate Host NADPH Oxidases to Produce Reactive Oxygen Species That Limit Plant Cell Death and Promote Infection. *Science Signaling*, 33
- Silva, C. R. D. M., Naves, M. M. V. (2001). Vitamin supplementation in cancer chemoprevention. *Revista de nutrição*, 135-143.
- Silva, E. D., Vilas, B., Rodrigues, L. J., Siqueira, H. H. (2009). Caracterização física, química e fisiológica de gabioba (*Campomanesia pubescens*) durante o desenvolvimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 803- 809.
- Silva, G. M. C. (2016). O papel dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na síntese e acúmulo do ácido ascórbico em mitocôndrias de frutos (Doctoral dissertation, Tese (Doutorado em Produção Vegetal). UENF-Campos dos Goytacazes–RJ.
- Silva, G. M. C., Silva, W. B., Medeiros, D. B., Santana, A. R., Cordeiro, M. H. M., da Silva, N. M., Mizobutsi, G. P. (2017). The chitosan affects severely the carbon metabolism in mango (*Mangifera indica* L. cv. Palmer) fruit during storage. *Food chemistry*, 372-378

- Silva, L. R. A. D., Silva, G. M. C., Silva, W. B., Souza, C. L. M. D., & Oliveira, J. D. (2015). respiratory activity in isolated mitochondria from the pulp of uenf/caliman01 and tainung01 papaya in postharvest fruit conservation. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 296-307
- Silva, W. B., Silva, G. M. C., Santana, D. B., Salvador, A. R., Medeiros, D. B., Belghith, I., Misobutsi, G. P. (2018). Chitosan delays ripening and ROS production in guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Food chemistry*, 232-238
- Smirnoff, N., Conklin, P. L., Loewus, F. A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual review of plant biology*, 437-467
- Snyder, C. H. (1992). *The extraordinary chemistry of ordinary things*. Wiley.
- Souza, A. F., Silva, W. B., Gonçalves, Y. S., Silva, M. G., Oliveira, J. G. (2014). Fisiologia do amadurecimento de mamões de variedades comercializadas no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 318-328
- Souza, C. D., Siqueira, S. M., Amorim, A. D., Morais, S. D., Gonçalves, T., Gomes, R. N., Ricardo, N. M. P. S. (2015). Encapsulação do ácido l- ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray-drying: preparação, caracterização e atividade antioxidante. *Química Nova*, 877-883
- Souza, D. R., Bruniera, L. B., dos Santos, F. P. (2018). Estabilidade do ácido ascórbico em sucos cítricos industrializados, armazenados sob condições simuladas de consumo doméstico. *Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa*, 26-35
- Svirbely, S. S. (1932). Hexuronic acid as the antiscorbutic factor. *Nature*, 943- 943.
- Taiz, L., Zeiger, E., (2017). *Plant Physiology*. Sinauer, Assoc. Inc. Sunderland Ma, USA, 5. 782p.
- Talla, S., Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Sunil, B., Rajsheel, P., Raghavendra, A. S. (2011). Ascorbic acid is a key participant during the interactions between chloroplasts and mitochondria to optimize photosynthesis and protect against photoinhibition. *Journal of biosciences*, 163-173
- Teixeira, G. H., Júnior, L. C. C., Ferraudo, A. S., Durigan, J. F. (2016). Quality of guava (*Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato) fruit stored in low-O₂ controlled atmospheres is negatively affected by increasing levels of CO₂. *Postharvest Biology and Technology*, 62-68
- Tezotto, J. V., Jacomino, A. P., Godoy, A. E., Cerqueira-Pereira, E. C., Gallon, C. Z. (2011). Efeito do corte como dano mecânico na qualidade e na fisiologia de mamões 'golden'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, volume especial, 241-247.
- Tokunaga, T., Miyahara, K., Tabata, K., Esaka, M. (2005). Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase. *Planta*, 854-863.

- Tormos, K. V., Anso, E., Hamanaka, R. B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., Chandel, N. S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metabolism*, 537–544
- Valente, A., Albuquerque, T. G., Sanches-Silva, A., Costa, H. S. (2011). Ascorbic acid content in exotic fruits: A contribution to produce quality data for food composition databases. *Food Research International*, 2237-2242
- Vallilo, M. I., Garbelotti, M. L., OLIVEIRA, E. D., Lamardo, L. C. A. (2005). Características físicas e químicas dos frutos do cambucizeiro (*Campomanesia phaea*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 241-244
- Vanlerberghe, G. (2013). Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 6805-6847
- Vanlerberghe, G. C., McIntosh, L. (1996). Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria. *Plant Physiology*, 589-595
- Venkatesh, J., Park, S. W. (2014). Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical Studies*, 55, 38
- Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M. Chaimovich, (2006). Plant uncoupling mitochondrial proteins. *The Annual Review of Plant Biology*, 383-404
- 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*, 555–569
- Wang, G.-L., Xu, Z.-S., Wang, F., Li, M.-Y., Tan, G.-F., Xiong, A.-S. (2015). Regulation of ascorbic acid biosynthesis and recycling during root development in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 10–18
- Wang, H., Qian, Z., Ma, S., Zhou, Y., Patrick, J. W., Duan, X., Qu, H. (2013). Energy status of ripening and postharvest senescent fruit of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *BMC Plant Biology*, 13
- Wheeler, G. L., Jones, M. a, Smirnoff, N. (1998). vitamin C in higher plants. *Nature*, 365–369
- Xu, Y., Zhu, X., Chen, Y., Gong, Y., Liu, L. (2013). Expression profiling of genes involved in ascorbate biosynthesis and recycling during fleshy root development in radish. *Plant physiology and biochemistry*, 269-277