

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE L-GALACTONA-1,4-LACTONA  
DESIDROGENASE (GalLDH) E A BIOSÍNTESE DE ASCORBATO  
NO POTENCIAL DE MEMBRANA EM EXTRATO MITOCONDRIAL  
DE FRUTO DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

**SAMYRA DE ARAÚJO CAPETINI**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
SETEMBRO – 2021

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE L-GALACTONA-1,4-LACTONA  
DESIDROGENASE (GaILDH) E A BIOSÍNTESE DE ASCORBATO  
NO POTENCIAL DE MEMBRANA EM EXTRATO MITOCONDRIAL  
DE FRUTO DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

**SAMYRA DE ARAÚJO CAPETINI**

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

Orientador: Prof. Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
SETEMBRO – 2021

### FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

C241

Capetini, Samyra de Araújo.

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE L-GALACTONA-1,4-LACTONA DESIDROGENASE (GaILDH) NA BIOSÍNTESE DE ASCORBATO E NO POTENCIAL DE MEMBRANA EM EXTRATO MITOCONDRIAL DE FRUTO DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.) / Samyra de Araújo Capetini. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

75 f.

Bibliografia: 49 - 61.

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2022.

Orientador: Jurandi Goncalves de Oliveira.

1. mitocondria. 2. CTE. 3. síntese de ATP. 4. fisiologia. 5. mamão. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE L-GALACTONA-1,4-LACTONA  
DESIDROGENASE (GaILDH) NA BIOSÍNTESE DE ASCORBATO E  
NO POTENCIAL DE MEMBRANA EM EXTRATO MITOCONDRIAL  
DE FRUTO DE MAMOEIRO (*Carica papaya* L.)

**SAMYRA DE ARAÚJO CAPETINI**

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

Aprovado em 02 de agosto de 2021

Comissão Examinadora

---

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

---

Dr. Marcos José de Oliveira Fonseca (D.Sc., Produção Vegetal) - EMBRAPA

---

Prof. Dr. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

---

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

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus;

Aos meus pais José Carlos e Aurea Lúcia por todo apoio e incentivo, e por todo o amor e esforço para me oferecer um ótimo estudo e a qualidade de vida;

Ao meu namorado Israel Martins, agradeço pela paciência, amor e companheirismo, além do carinho e conforto que me oferece, sempre acalmando meu coração. Agradeço por você ter feito parte dessa etapa. Essa conquista também pertence a você!

À Dra. Gláucia Michele Cosme Silva por toda paciência em ensinar, pela dedicação e ajuda fundamental durante todas as fases do desenvolvimento deste trabalho, além é claro da amizade;

Às minhas amigas de laboratório, Karolayne e Thays, por compartilhar comigo momentos de tristeza, estresse, mas também de alegrias e por toda a ajuda quando precisei;

Ao meu orientador, Dr. Jurandi Gonçalves de Oliveira, pelo aprendizado, apoio e incentivo nas minhas atividades acadêmicas, pelo ensino, pela dedicação, pela paciência e pela confiança;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), na pessoa da professora Dra. Claudete Santa-Catarina. À Unidade de Fisiologia de Videiras do Setor de Fisiologia Vegetal/LMGV comandada pelo professor Dr. Ricardo Enrique Bressan-Smith. Ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), na pessoa do professor Dr. Arnoldo Rocha Façanha, por toda a colaboração e pela concessão de equipamentos necessários para a realização de parte do trabalho;

Aos amigos de outros laboratórios que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento das minhas análises e do meu projeto como um todo;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal pela infraestrutura e oportunidade de cursar o mestrado;

Ao órgão de fomento FAPERJ pela bolsa concedida.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Psi$  - Potencial de membrana

$\Delta\mu\text{H}^+$  - Gradiente eletroquímico de prótons

AA - Ácido ascórbico

ADP - Adenosina difosfato

ANOVA - Análise de variância

AOX - Alternativa oxidase

ATP - Adenosina trifosfato

$\text{KN}_3$  - Azida de potássio

BSA - Albumina de soro bovino

Cit c - Citocromo c

CI - Complexo I ou NADH:UQ oxidorreductase

CII - Complexo II ou Succinato: UQ oxidorreductase

CIII - Complexo III ou Ubiquinona: citocromo c oxidorreductase

CV - Complexo V ou  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP-sintase

COX - Complexo IV, ou citocromo c oxidase

CR - Controle respiratório

CTEm - Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial

DPI - Cloreto de difenileniodônio

EDTA - Ácido tetracético etilenodiamina

ERO - Espécie reativa de oxigênio

GalL - L-galactono-1,4-lactona

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

*Hue* - Ângulo de cor Hue

H<sup>+</sup> - Prótons

KCl - Cloreto de potássio

KHPO<sub>4</sub> - Fosfato de potássio monobásico

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

MOPS - Ácido 4-morfolinopropanesulfônico

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida

PVP - Polivinilpirrolidona

RT - Respiração total

SHAM - Ácido salicilhidroxâmico

UcP - Proteína desacopladora

UQ – Ubiquinona forma oxidada



## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.1.1 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1 As mitocôndrias e o processo respiratório.....	4
3.2 CTEM: composição e função.....	7
3.2.1 NADH:UQ oxidoreductase (Complexo I, CI).....	7
3.2.2 Ubiquinona (UQ).....	8
3.2.3 Succinato: UQ oxidoreductase (CII).....	9
3.2.4 Ubiquinona: citocromo c oxidoreductase (Complexo III, CIII).....	10
3.2.5 Citocromo c oxidase (Complexo IV, COX).....	10
3.2.6 Oxidase alternativa - AOX.....	11
3.2.7 Citocromo c (Cit c).....	12
3.2.8 F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> -ATP-sintase (Complexo V, CV).....	13
3.2.9 Proteína desacopladora (UcP).....	14
3.3 Biossíntese do ácido ascórbico e sua relação com a CTEM.....	15
3.3.1 L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH).....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Obtenção e padronização do material vegetal.....	20
4.2 Extração e purificação das mitocôndrias em extrato de polpa de mamão...20	
4.3 Aplicação dos tratamentos e quantificação da taxa respiratória em mitocôndrias purificadas.....	23
4.4 Determinação da atividade da GalLDH em extrato de mitocôndrias purificadas.....	24

4.5 Produção de AA em extrato de mitocôndrias purificadas .....	25
4.6 Determinação do $\Delta\Psi$ em extrato de mitocôndrias purificadas.....	26
4.7 Quantificação da produção de ATP .....	27
4.8 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
6. CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## RESUMO

CAPETINI, Samyra de Araújo; M. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2021. Influência da atividade L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) e a biossíntese de ascorbato no potencial de membrana em extrato mitocondrial de fruto de mamoeiro (*Carica papaya* L.).

Orientador: Prof. D.Sc. Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Parte do processo respiratório ocorre no interior das mitocôndrias, com destaque para a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria (CTEm). Durante a atividade da CTEm, alguns complexos transportam prótons ( $H^+$ ) do lado da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, gerando um gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu H^+$ ). A ATP-sintase é capaz de utilizar a força desse  $\Delta\mu H^+$ , junto com ADP e fosfato inorgânico, para gerar energia na forma de ATP, para todos os processos metabólicos. Associada física e funcionalmente à CTEm está a enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH), que também pode alimentar o transporte de elétrons a partir de sua ação na etapa final da biossíntese do ácido ascórbico (AA). Essa pesquisa teve como objetivo, avaliar a influência da GalLDH e a biossíntese de AA, na geração do  $\Delta\mu H^+$  na CTEm, além da produção de ATP. Foram utilizados frutos do mamoeiro “Golden”, maduros, sadios, com 85% da superfície na casca na coloração verde. Os extratos mitocondriais foram utilizados para as análises da taxa respiratória, potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ), síntese de

ATP, atividade GalLDH e produção de AA, em resposta à aplicação dos substratos respiratórios NADH, malato e L-galactona-1,4-lactona (GalL), na presença ou não dos inibidores das oxidases terminais, ácido salicilhidroxâmico (SHAM), azida de potássio (KN<sub>3</sub>) e do desacoplador de membrana, carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona (CCCP). Os valores obtidos foram submetidos ao teste de comparações múltiplas das médias das repetições, pelo programa estatístico R Studio. Os resultados indicam a influência da atividade da GalLDH na geração do  $\Delta\Psi$ , sendo verificado menor  $\Delta\Psi$  quando utilizado NADH como substrato respiratório. As atividades do complexo I e da GalLDH se mostraram interdependentes. Pode-se confirmar isso ao se verificar maior síntese de ATP quando havia no mesmo ensaio, GalL e malato, na comparação com o ensaio usando apenas malato como substrato. A adição exógena de GalL também resultou em aumento significativo na quantidade de AA produzido. A inibição da AOX com a aplicação de SHAM, reduziu drasticamente a geração do  $\Delta\Psi$ , a síntese de ATP, a atividade da GalLDH e a síntese de AA. Com os resultados obtidos pode-se confirmar que os inibidores da CTE<sub>m</sub>, SHAM, difenileniodônio (DPI), rotenona e KN<sub>3</sub> influenciam na geração do potencial de membrana, na síntese de ATP, na atividade da GalLDH e na síntese de AA.

## ABSTRACT

CAPETINI, Samyra de Araújo; M.Sc.; Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August, 2021. Influence of L-galactone-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity and ascorbate biosynthesis on membrane potential in papaya (*Carica papaya* L.) fruit mitochondrial extract. Advisor: Prof. D.Sc., Jurandi Gonçalves de Oliveira.

Part of the respiratory process takes place inside the mitochondria, with emphasis on the mitochondrial electron transport chain (ETC). During activity ETC, some complexes transport protons ( $H^+$ ) from the mitochondrial matrix side to the intermembrane space, generating an electrochemical proton gradient ( $\Delta\mu H^+$ ). ATP synthase is able to use the strength of this  $\Delta\mu H^+$ , together with ADP and inorganic phosphate, to generate energy in the form of ATP, for all metabolic processes. Physically and functionally associated with ETC is the enzyme L-galactone-1, 4-lactone dehydrogenase (GalLDH), which can also fuel the transport of electrons through its action in the final step of ascorbic acid (AA) biosynthesis. This research aimed to evaluate the influence of GalLDH and AA biosynthesis in the generation of  $\Delta\mu H^+$  in ETC, in addition to the production of ATP. Ripe, healthy papaya fruits 'Golden' were used, with 85% of the skin surface in green color. Mitochondrial extracts were used for the analysis of respiratory rate, membrane potential ( $\Delta\Psi$ ), ATP synthesis, GalLDH activity and AA production, in response to the application

of respiratory substrates NADH, malate and L-galactone-1,4- lactone (GalL), in the presence or not of terminal oxidase inhibitors, salicylhydroxamic acid (SHAM), potassium azide ( $\text{KN}_3$ ) and the membrane uncoupler, carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP). The values obtained were submitted to the test of multiple comparisons of the means of repetitions, using the statistical program R Studio. The results indicate the influence of the GalLDH activity in the generation of  $\Delta\Psi$ , with a lower  $\Delta\Psi$  being verified when using NADH as a respiratory substrate. The results indicate the influence of the GalLDH activity in the generation of  $\Delta\Psi$ , with a lower  $\Delta\Psi$  being verified when using NADH as a respiratory substrate. The activities of Complex I and GalLDH proved to be interdependent. This can be confirmed by verifying greater ATP synthesis when there was in the same assay, GalL and malate, in comparison with the assay using only malate as substrate. The exogenous addition of GalL also resulted in a significant increase in the amount of AA produced. The inhibition of AOX with the application of SHAM, drastically reduced  $\Delta\Psi$  generation, ATP synthesis, GalLDH activity and AA synthesis. With the results obtained, it can be confirmed that the inhibitors of ETC, SHAM, diphenyliodonium (DPI), rotenone and  $\text{KN}_3$  influence the generation of membrane potential, the synthesis of ATP, the activity of GalLDH and the synthesis of AA.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido ascórbico (AA) é um antioxidante sintetizado pelas plantas e até o momento são conhecidas pelo menos quatro vias possíveis de síntese do AA em diversos organismos vivos, desde fungos, protistas, plantas e animais (SMIRNOFF, 2018). As etapas iniciais da biossíntese de AA ocorrem no citosol. Entretanto, a última etapa acontece especificamente nas mitocôndrias, catalisada pela enzima L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) com participação da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTEm) (SMIRNOFF, 2018; DOURMAP, 2019).

A enzima GalLDH catalisa a reação de conversão do precursor imediato, L-galactona-1,4-lactona (GalL), em AA (WANG et al., 2015). Esta enzima está ligada física e funcionalmente ao complexo I (CI) da CTEm, o que permite correlacionar a biossíntese do AA com a respiração das mitocôndrias (BARTOLI et al., 2000; HERVÁS et al., 2013; SMIRNOFF, 2018). O AA é um importante antioxidante, que atua na degradação e mitigação das espécies reativas de oxigênio (ERO) que, em grandes quantidades, inibem a atividade respiratória (KIM et al., 2015). Este (GalL) na forma reduzida irá se oxidar, doando elétrons ao citocromo c (Cit c), constituinte da CTEm. Na forma reduzida, o Cit c será capaz de doar elétrons ao Cit c oxidase (COX), com consequente redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (WANG et al., 2015).

A atividade da CTEm leva à oxidação de equivalentes reduzidos [NAD(P)H e FADH<sub>2</sub>] e a transferência de elétrons que serão doados ao O<sub>2</sub> para a

redução desse ao H<sub>2</sub>O. Durante o transporte de elétrons até o O<sub>2</sub> há também a transferência de prótons (H<sup>+</sup>) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. O CI é o primeiro local de bombeamento de H<sup>+</sup> para o espaço intermembranar, iniciando assim a formação de um gradiente eletroquímico de prótons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). (MAILLOUX e HARPER, 2011; HIRST, 2013; NSIAH-SEFAA e MCKENZIE, 2016). Segundo estes autores, a transferência dos elétrons do equivalente reduzido (NADH) até a UQ, libera pequenas quantidades de energia. Isoladamente essa energia não é capaz de produzir ATP, mas sendo utilizada para transportar H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, será armazenada na forma de  $\Delta\mu\text{H}^+$ , a qual será posteriormente utilizada para a síntese do ATP, a partir de ADP e fosfato inorgânico.

A atividade mitocondrial de transferência de elétrons e a consequente formação do  $\Delta\mu\text{H}^+$ , em presença de O<sub>2</sub>, predispõem as mitocôndrias à ocorrência de danos oxidativos. As mitocôndrias, juntamente com os cloroplastos e peroxissomos, são o principal local de produção de ERO (SINHA et al., 2013; HUANG et al., 2016). A formação de ERO acontece, principalmente, devido à redução parcial do O<sub>2</sub> e essa formação de ERO pode ocorrer nos complexos III, II e I da CTEM (KOLOSSOV et al., 2015). A geração, por si só de ERO não pressupõe um estresse oxidativo, desde que esteja em equilíbrio o processo de formação e remoção das ERO dentro das células (MITTLER, 2017). Danos celulares acontecem quando a capacidade de remoção das ERO está aquém da capacidade de produção desses (FOYER, 2018).

Tendo em vista a localização e a relação de funcionalidade da GalLDH, a biossíntese do AA nas plantas é fortemente dependente da atividade respiratória (SMIRNOFF, 2018). Além disso, considerando que as mitocôndrias são o principal local de geração de ATP (ROGER et al., 2017), pode-se inferir sobre qual a relação entre a atividade da GalLDH e a síntese de ATP nas mitocôndrias.

Há indícios de que a GalLDH influencie o potencial de membrana das mitocôndrias, pois como ela doa elétrons diretamente para o Cit c, isso interromperia o fluxo de elétrons proveniente inicialmente do CI, interferindo na geração do  $\Delta\mu\text{H}^+$  que será formado pela transferência de H<sup>+</sup> da matriz para o espaço intermembranar. Desse modo, o presente trabalho objetiva analisar a influência da atividade GalLDH (e a síntese de AA) na geração do  $\Delta\mu\text{H}^+$  e na síntese de ATP em mitocôndrias isoladas da polpa do mamão.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Analisar a influência da atividade GalLDH na síntese de AA e na geração do  $\Delta\mu\text{H}^+$  em mitocôndrias isoladas da polpa do mamão.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

Avaliar a influência da atividade GalLDH no  $\Delta\mu\text{H}^+$ ;

Avaliar a influência da atividade GalLDH na síntese de AA;

Avaliar se a síntese de ATP sofre influência ao adicionar o substrato da GalLDH;

Avaliar a influência de estimuladores e inibidores da CTE<sub>m</sub> no  $\Delta\mu\text{H}^+$ , na síntese de ATP, na atividade GalLDH e na síntese de AA.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 As mitocôndrias e o processo respiratório

Possuindo um material genético único, mitocôndrias são organelas complexas essenciais para a respiração celular, já que produzem a maior parte da energia utilizada nos processos metabólicos das células, se comparada a outras organelas (ROGER et al., 2017). As mitocôndrias contam com duas membranas, uma interna e outra externa, que apresentam funcionalidades específicas e fundamentais no metabolismo desta organela. Enquanto a membrana externa separa o espaço intermembranar do citosol, a membrana interna separa o espaço intermembranar da matriz mitocondrial (VAN DER LAAN et al., 2016).

A membrana externa é mais permeável e menos seletiva se comparada com a membrana interna. Ela possui poros permitindo que íons e pequenas moléculas não carregadas atravessem livremente de um lado para o outro (KÜHLBRANDT, 2015). A membrana interna possui invaginações conhecidas como cristas mitocondriais, que aumentam significativamente a superfície desta membrana em relação à membrana externa (VAN DER LAAN et al., 2016). Esta membrana é impermeável a quase todos os íons e moléculas carregadas, possuindo numerosas proteínas transportadoras específicas com a função de selecionar o que deve ser transportado para o interior da mitocôndria, ou mesmo para sair da mitocôndria. A seletividade da membrana interna permite apenas a passagem de moléculas que fazem parte dos processos metabólicos que ocorrem na mitocôndria, estando ainda nela presente a CTE<sub>m</sub> (KÜHLBRANDT, 2015).

O processo respiratório é crucial para os seres vivos, pelo qual ocorre a maior parte da produção de energia na forma de ATP, necessária para a manutenção dos processos metabólicos das células, além de diversas outras moléculas orgânicas essenciais ao metabolismo vegetal (MILLAR et al., 2011; CHOO, 2019). A respiração acontece basicamente em dois locais na célula, sendo parte no citosol e parte no interior das mitocôndrias. No interior das mitocôndrias, a oxidação de substratos e equivalentes reduzidos dará início à transferência de elétrons através de carreadores especializados, os quais serão reduzidos e oxidados, sequencialmente, transportando elétrons através de vários complexos. Este processo de oxirredução resultará na transferência de elétrons até o  $O_2$ , o qual será reduzido a  $H_2O$  (TAIZ et al., 2017).

A produção de energia no interior das mitocôndrias acontece pelo processo conhecido como fosforilação oxidativa e ocorre na CTE<sub>m</sub>, localizada nas cristas mitocondriais. A CTE<sub>m</sub> é formada por uma sequência de pelo menos 4 complexos proteicos associados a vários componentes com funções específicas, são eles: NADH-ubiquinona oxidorreductase (complexo I), succinato-ubiquinona oxidorreductase (complexo II), ubiquinol-citocromo c oxidorreductase (complexo III) e o citocromo c oxidase (complexo IV – COX). Adicionalmente a estes 4 complexos principais, o *pool* de UQ e a proteína Cit c também fazem parte do processo de transporte de elétrons. Além dos complexos transportadores de elétrons, há também na membrana interna a ATP-sintase (complexo V), a qual está acoplada à CTE<sub>m</sub>, porém não fazendo parte diretamente do transporte de elétrons, sendo o complexo responsável pela formação do ATP (TAIZ et al., 2017).

Para a formação de ATP é necessário que haja um  $\Delta\mu H^+$  entre o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. O complexo V então utiliza esse  $\Delta\mu H^+$ , juntamente com o fosfato inorgânico e o ADP, para sintetizar ATP. Os complexos responsáveis pelo transporte de  $H^+$  da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, são CI, CIII e CIV, transportando 4, 4 e 2  $H^+$ , respectivamente (RODRÍGUEZ ROLDÁN et al., 2006; MAILLOUX e HARPER, 2011; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015).

Além dos complexos citados anteriormente, estão presentes nas mitocôndrias de plantas vias alternativas para o transporte de elétrons (HAO et al., 2015). As plantas possuem quatro NAD(P)H desidrogenases inseridas na

membrana interna da mitocôndria, sendo duas voltadas para a face da matriz e duas voltadas para o espaço intermembranar, além da AOX. A AOX recebe os elétrons diretamente do *pool* de UQ, transferindo estes elétrons para o O<sub>2</sub>, reduzindo-o a H<sub>2</sub>O, sendo, portanto, uma segunda oxidase terminal da CTEM, atuando paralelamente à COX (HAO et al., 2015; MANSILLA et al., 2019). Como citado anteriormente, a CTEM das plantas conta com componentes não encontrados em mitocôndrias de células de mamíferos. As NAD(P)H desidrogenases também são capazes de oxidar NADH, porém com menor bombeamento de H<sup>+</sup>, uma vez que o CI não participará desse processo. Dessa forma, parte da energia proveniente da oxidação do NADH não é conservada como ATP, e sim convertida em calor (BLACKER, 2016; TAIZ et al., 2017).

Também na membrana interna das mitocôndrias encontra-se a proteína desacopladora (UcP), que atua na transferência de H<sup>+</sup> do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, afetando o  $\Delta\mu\text{H}^+$ , sem a produção de ATP, sendo importante via de controle da produção de ERO, normalmente mais ativas quando as plantas passam por algum estresse (MAILLOUX e HARPER, 2011).

Essas ERO podem ser geradas no interior das mitocôndrias a partir da redução incompleta do O<sub>2</sub>, não resultando na formação de H<sub>2</sub>O. Isto acontece devido ao baixo trânsito de elétrons da CTEM (CHOUDHURY et al., 2013). As ERO não são necessariamente danosas ao metabolismo celular, mas ao contrário, em muitos casos são benéficas para as células, quando atuam como agentes sinalizadores (MITTLER, 2017). Porém, sob outra perspectiva, quando há um desequilíbrio entre a produção e sua extinção, isto é, em excesso no meio celular, as ERO irão agir como agentes oxidantes que poderão resultar na morte celular, dada pela degradação de lipídios, proteínas e DNA (DUNN, 2015).

Nesse sentido, a fim de evitar que a abundância de ERO ocasione danos à mitocôndria e assim resultar na morte celular, as plantas contam com mecanismos de defesa formados pela ação da AOX e da UcP, que agem eliminando esses agentes oxidantes (CHOUDHURY et al., 2013; MITTLER, 2017).

Nesse contexto, há uma enzima muito importante contra a ação oxidante das ERO, que está acoplada ao CI da CTEM, fisicamente associada como uma subunidade do CI: a enzima GaLLDH, que é responsável pela biossíntese do AA (MILLAR, 2011). É cabível destacar, que o produto sintetizado por esta se

apresenta como um forte agente antioxidante contra as ERO dentro das mitocôndrias (HERVAS et al., 2013).

### 3.2 CTEM: composição e função

#### 3.2.1 NADH:UQ oxidorreductase (Complexo I, CI)

O CI é o primeiro complexo enzimático da cadeia respiratória e trata-se do maior e de mais difícil compreensão da cadeia respiratória. Diversos trabalhos anteriores caracterizaram todas as subunidades do CI e clonaram os genes codificadores, todavia, as funções das subunidades individuais não são muito claras (GUERRERO-CASTILLO et al., 2017).

A primeira informação estrutural do CI foi adquirida pela microscopia eletrônica da enzima de *Neurospora crassa* (HOFHAUS et al., 1991), a partir de uma preparação solubilizada com detergente em cristais bidimensionais. Nesse estudo, o CI exibiu uma estrutura em forma de 'L' característica com dois braços distinguíveis. Um dos braços do CI que contém todas as subunidades codificadas pelo mtDNA é incorporado na membrana mitocondrial interna e o outro braço se projeta na matriz. Análises posteriores de microscopia eletrônica e bioquímica indicaram que esses dois braços estão reunidos e provavelmente surgiram evolutivamente independentes um do outro (WEISS et al., 1991).

Por função, o CI também pode ser dividido em três módulos: o módulo de entrada de elétrons ou o módulo da desidrogenase (módulo N) que aceita elétrons do NADH; o módulo de saída de elétrons, ou módulo da desidrogenase (módulo Q) que entrega elétrons à ubiquinona e o módulo de translocação de H<sup>+</sup> (módulo P), que bombeia H<sup>+</sup> através da membrana interna (LAZAROU et al., 2019). Enquanto os módulos N e Q são partes do braço da matriz, o módulo P está contido no braço da membrana interna (SHARMA et al., 2009).

Funcionalmente, o CI atua na oxidação do NADH que é gerado através do ciclo de Krebs na matriz mitocondrial, onde a ubiquinona reduzida em ubiquinol é reoxidada pelo complexo do citocromo bc1 e transfere elétrons para reduzir o oxigênio molecular à água na COX. Sendo assim, o CI serve de ponte na transferência de elétrons entre o NADH e a ubiquinona. Por conseguinte, cada um dos elétrons entregues pelo NADH é oxidado pelos componentes internos do CI, como proteínas ferro-enxofre (Fe-S), até que esses elétrons possam ser doados à

UQ para que esta seja reduzida a ubiquinol (UQH<sub>2</sub>) (MEYER et al., 2009; MAILLOUX e HARPER, 2011).

Durante todo o processo oxidativo do NADH, além dos elétrons são liberadas pequenas quantidades de energia. Entretanto, essa pouca quantidade não seria suficiente para a formação de ATP, sendo, portanto, essa energia utilizada pelo CI para a formação de um  $\Delta\mu\text{H}^+$ . Isso se dá por meio da utilização dessa pequena quantidade de energia para o transporte ativo de H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar. Então, a cada dois elétrons provenientes de uma molécula de NADH, são transferidos quatro H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (MAILLOUX e HARPER, 2011; JONES et al., 2017).

A rotenona atua como um forte inibidor do CI da cadeia respiratória mitocondrial (HEINZ et al., 2017). Classifica-se como um composto lipofílico de ocorrência natural, derivado principalmente das raízes e caules das espécies *Lonchocarpus spp* (embira de sapo) e *Derris spp*. A rotenona foi amplamente explorada na agricultura e piscicultura, dada sua propriedade pesticida (ZUBAIRI et al., 2016). O mecanismo de ação desse composto compreende a inibição da transferência de elétrons dos centros Fe-S do CI para a UQ, levando a um bloqueio da fosforilação oxidativa com síntese limitada de ATP (HEINZ et al., 2017). Além disso, a transferência incompleta de elétrons para o O<sub>2</sub> pode levar à formação de ERO. Essa produção de ERO induzida por rotenona, provoca danos aos componentes da mitocôndria, incluindo o DNA mitocondrial e pode, eventualmente, levar à apoptose (LI et al., 2003; FATO et al., 2009).

### 3.2.2 Ubiquinona (UQ)

A ubiquinona é um pequeno carregador de elétrons lipossolúvel localizada no interior da membrana mitocondrial interna. A UQ não está associada fortemente a nenhum complexo da CTE<sub>m</sub>, podendo se difundir no interior hidrofóbico da bicamada da membrana (TAIZ et al., 2017).

Os elétrons recebidos pelo CI, após passarem por várias proteínas ferro-enxofre (Fe-S) que compõem o CI, são doados à UQ, que irá receber dois elétrons oriundos da oxidação completa do NADH. Esses elétrons serão transferidos para a UQ um de cada vez. A UQ, após receber os dois elétrons,

receberá também dois  $H^+$  sendo totalmente reduzida formando o ubiquinol ( $UQH_2$ ) (DUTILLEUL et al., 2003; MEYER et al., 2009; MAILLOUX E HARPER, 2011).

A UQ pode também receber elétrons vindos do complexo succinato: UQ oxidoredutase (Complexo II, CII). Esses elétrons são provenientes da oxidação do  $FADH_2$  e serão transferidos também para a UQ (EUBEL et al., 2003).

Quando a UQ recebe elétrons diretamente do CI, isso indica que já se iniciou o transporte de quatro  $H^+$  por esse complexo, da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar (MAILLOUX e HARPER, 2011; JONES et al., 2017). Porém, ao receber os elétrons vindos diretamente do CII, sem que esses tenham passado pelo CI, não acontecerá a formação inicial do gradiente de  $H^+$ , já que o CII não é um transportador direto de  $H^+$  para o espaço intermembranar (BEZAWORK-GELETA et al., 2017). Assim, pela via do CII a formação do gradiente de  $H^+$  só será iniciada após a UQ transferir esses elétrons para o CIII, quando serão transferidos quatro  $H^+$  da matriz para o espaço intermembranar (MILLAR et al., 2011; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015).

### 3.2.3 Succinato: UQ oxidoredutase (CII)

O CII, também chamado de succinato desidrogenase (SDH) ou succinato: quinona oxidoredutase (SQR), está localizado na CTE<sub>m</sub>. Compõe-se por quatro subunidades agrupadas de flavoproteínas, uma subunidade composta da proteína Fe-S (SDH2) e duas subunidades inseridas na membrana (SDH3 e SDH4) (EUBE et al., 2003; MILLAR et al., 2004; MOOSAVI et al., 2019).

O CII é um componente do ciclo de Krebs, assim como da oxidação fosforilativa, ele faz uma importante ligação entre esses dois processos. Como já comentado anteriormente, diferentemente do CI, o CII não transporta  $H^+$  para o espaço intermembranar, por isso ele não irá participar diretamente da geração do potencial de membrana (BEZAWORK-GELETA et al., 2017). Porém, assim que ele transferir elétrons para a UQ, esta irá transferir elétrons para o CIII, que irá transportar os  $H^+$  da matriz para o espaço intermembranar (MILLAR et al., 2011; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015). Assim, quando o fluxo de elétrons é iniciado via CII, a geração do gradiente de  $H^+$  só irá se iniciar, quando a UQ transferir os elétrons para o CIII.

No ciclo de Krebs, o CII tem como função, oxidar o succinato a fumarato. Na oxidação fosforilativa, sua função é transferir elétrons do succinato, via  $FADH_2$

e um grupo de aglomerados de Fe-S para a ubiquinona (BEZAWORK-GELETA et al., 2017).

Atuando como um inibidor reversível do funcionamento do CII o malonato (VALLS-LACALLE et al., 2016) se une ao sítio ativo do CII no ciclo de Krebs, competindo com a oxidação do succinato.

#### 3.2.4 Ubiquinona: citocromo c oxidorreductase (Complexo III, CIII)

Composto por 10 subunidades o CIII também chamado de complexo citocromo bc<sub>1</sub>, é composto por um citocromo de 42-kDa com duas hemes tipo *b-type*, uma proteína Fe-S do tipo *Rieske* 27-kDa, um citocromo c<sub>1</sub> de 31-kDa, e cinco adicionais de polipeptídios. O CIII tem dois locais que se ligam a quinona, um capaz de reduzir a ubiquinona, Centro N, e o outro capaz de oxidar o ubiquinol, Centro P. A antimicina A é capaz de inibir o funcionamento desse complexo, ela se liga ao Centro N, bloqueando a redução da ubiquinona (BUCHANAN et al., 2015).

CIII é responsável por receber elétrons provenientes da UQH<sub>2</sub> e consequentemente transferi-los para o Cit c, reduzindo este. A partir da reoxidação de duas moléculas de UQH<sub>2</sub>, serão transferidos quatro elétrons para o CIII. A cada ciclo de elétrons que são transferidos pelo CIII até o Cit c, simultaneamente são transportados quatro H<sup>+</sup> para o espaço intermembranar. Porém, a passagem de elétrons pelo CIII não resulta na transferência direta dos elétrons, ligando UQH<sub>2</sub> ao Cit c. Antes que esses elétrons possam ser transferidos para o Cit c, alguns irão 'recircular' internamente no CIII, aumentando a eficiência do CIII no transporte de H<sup>+</sup> para o espaço intermembranar, reforçando o  $\Delta\mu\text{H}^+$  (MILLAR et al., 2011; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015).

#### 3.2.5 Citocromo c oxidase (Complexo IV, COX)

As espécies redox-ativas da COX incluem duas proteínas hemes do tipo a e dois centros contendo cobre (BUCHANAN et al., 2015). Sendo composta principalmente por três subunidades, COX1, COX2 e COX3, formando um núcleo catalítico com essas três subunidades (MANSILLA et al., 2018). A COX possui cofatores envolvidos nas reações de transferências de elétrons. Na COX2, há um centro de di-cobre que recebe elétrons provenientes do Cit c; esses elétrons são transportados para um grupo heme que está situado na COX1, posteriormente



para um grupo heme binuclear, nessa mesma subunidade e por fim para o oxigênio molecular (MANSILLA et al., 2018).

A COX é uma oxidase terminal que reduz o  $O_2$  a  $H_2O$ . Sendo a oxidase terminal principal da cadeia transportadora de elétrons, ela tem a função de receber elétrons provenientes do Cit c para assim, reduzir o  $O_2$  a  $H_2O$  (SOUSA et al., 2018; TIMÓN-GÓMEZ et al., 2018). Para bloquear sua função, existem inúmeros bloqueadores, sendo sensível ao íon cianeto ( $CN^-$ ), além do íon azida ( $N_3^-$ ), monóxido de carbono (CO), entre outros. Esse complexo também transfere  $H^+$  da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, o equivalente a dois  $H^+$ , assim contribuindo na geração do  $\Delta\mu H^+$ , como os CI e CIII (RODRÍGUEZ ROLDÁN et al., 2006; YOSHIKAWA e SHIMADA, 2015). Além disso, é essencial que esse complexo esteja oxidado para que possa ser reduzido pelo Cit c, que por sua vez, foi reduzido pela GalLDH, dessa forma, ele contribui também pela formação do potencial de membrana via oxidação do GalL (BARTOLI et al., 2005; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015; JONES et al., 2017).

### 3.2.6 Oxidase alternativa - AOX

A AOX desempenha uma função amplamente estudada em plantas, tendo sido citada pela primeira vez em 1925 (VANLERBERGHE, 2013). Esta enzima é composta de duas subunidades idênticas, ligadas entre si por uma ponte dissulfídica. É uma enzima homodimérica associada à membrana mitocondrial interna e voltada para a matriz (SIEDOW e UMBACH, 2000).

Como destacado anteriormente, a transferência de elétrons para o oxigênio é realizada, prioritariamente por intermédio da COX, transferindo dois  $H^+$  da matriz para o espaço intermembranar. Nas plantas, a AOX pode receber parte dos elétrons da oxidação da  $UQH_2$ , competindo por esses elétrons em detrimento da transferência desses para os complexos III e IV (MOORE et al., 2013).

Quando os elétrons deixam de passar pelos complexos III e IV, não ocorre o bombeamento de  $H^+$  por esses complexos. Nesse caso, a energia livre que seria conservada na forma de  $\Delta\mu H^+$  para ser usada na síntese de ATP, é dissipada em forma de calor. Portanto, a participação da AOX no fluxo de elétrons na CTE influencia diretamente na geração do  $\Delta\mu H^+$ . Esse consumo de  $O_2$  que ocorre por atividade da AOX é comumente denominado respiração resistente ao

cianeto, uma vez que diferentemente da COX, a AOX não é inibida pelo íon  $\text{CN}^-$  (MOORE et al., 2013).

Um ponto importante ocorre quando a AOX desvia elétrons que iriam para o CIII (MOORE et al., 2013), ela está automaticamente permitindo que a transferência de elétrons seja preferencialmente via GalLDH para o Cit c (VENKATESH e PARK, 2014), assim favorecendo a biossíntese do AA (MILLAR et al., 2011). Além disso, com o amadurecimento do fruto (frutos climatéricos), a atividade da COX tende a diminuir, porém há a necessidade de que a respiração não cesse, para que o desenvolvimento do fruto continue. Assim, a AOX é de suma importância nesse processo de respiração, já que em mamão, com a diminuição da atividade da COX a atividade da AOX sofre um aumento, se apresentando como uma via alternativa na respiração mitocondrial (OLIVEIRA et al., 2015; SILVA, 2016).

Com a atividade simultânea das duas oxidases terminais, COX e AOX, a velocidade na transferência de elétrons para o  $\text{O}_2$  tende a aumentar, diminuindo assim o potencial de geração de ERO dentro das mitocôndrias. Isso justifica, sua importância para o rendimento energético final e bom funcionamento da CTE<sub>m</sub> para a respiração celular (SCHEIBE, 2019). Há a possibilidade de evidenciar a atividade da AOX, um ativador utilizado para isto, seria o piruvato, mas existem outros, assim como o ditioneitol (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol, entre outros. Existem vários inibidores da atividade da AOX. Como exemplo pode-se citar o benzohidroxamato (BHAM), n-propil galato e temos a SHAM (ERDAL et al., 2015).

### 3.2.7 Citocromo c (Cit c)

Trata-se de uma proteína de peso molecular baixo, fracamente presa a superfície externa da membrana interna mitocondrial. O Cit c não está especificamente relacionado diretamente a nenhum dos complexos da CTE<sub>m</sub> (SWEETLOVE et al., 2010). O Cit c é um carregador de elétrons móvel que tem como função, fazer a transferência de elétrons entre o CIII e a COX, ou seja, o Cit c irá oxidar o CIII e reduzir a COX (LETTS et al., 2016).

Além disso, o Cit c é de extrema importância para que a GalLDH se associe funcionalmente à CTE<sub>m</sub>. Apesar da GalLDH estar acoplada ao CI (MAJED, 2016), ela não transfere elétrons para o CI, mas sim para o Cit c que fica responsável por receber elétrons vindos da GalLDH resultante da oxidação do

Gall em AA (BARTOLI et al., 2005). Porém, se o Cit c estiver reduzido pela atividade do CIII, este não será capaz de receber elétrons a partir da GalLDH, não ocorrendo assim a formação do AA (BARTOLI et al., 2009). Assim, a atividade da AOX é essencial para manter o Cit c oxidado, que a GalLDH oxide GalL à AA, transferindo elétrons para o Cit c, assim completando a síntese de AA (VENKATESH e PARK, 2014). Mesmo não participando diretamente do transporte de  $H^+$  da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, o Cit c irá reduzir a COX, fazendo assim com que ela transfira dois  $H^+$  da matriz para o espaço intermembranar, contribuindo para a formação do potencial de membrana (YOSHIKAWA e SHIMADA, 2015).

### 3.2.8 $F_0F_1$ -ATP-sintase (Complexo V, CV)

Localizado na membrana interna mitocondrial, o CV apresenta dois domínios principais, um denominado  $F_0$  e o outro,  $F_1$ . Sendo sensível à oligomicina, o domínio  $F_0$  é um complexo proteico, inserido totalmente na membrana interna e apresenta de 8 a 9 polipeptídios diferentes, com 3 subunidades primárias (ALEKSEEVA et al., 2015). Esses polipeptídios formam um canal de passagem para os  $H^+$  atravessarem a membrana interna, sendo transferidos do espaço intermembranar para a matriz (BUCHANAN et al., 2015). O segundo domínio do CV,  $F_1$ , se apresenta como um complexo proteico periférico da membrana, voltado para o lado da matriz mitocondrial. Composto por pelo menos 5 polipeptídios diferentes, é nele que contém o sítio catalítico para a conversão do ADP e fosfato inorgânico em ATP (BUCHANAN et al., 2015). Para a síntese de uma molécula de ATP são utilizados pelo menos quatro  $H^+$  acumulados no espaço intermembranar (ALEKSEEVA et al., 2015, BUCHANAN et al., 2015).

Os domínios  $F_0$  e  $F_1$  da ATP-sintase permitem a passagem de  $H^+$  através desses componentes, realizando assim, a síntese continuada de ATP, utilizando o  $\Delta\mu H^+$  gerado através da membrana em decorrência da atividade da CTEM. Portanto, com a síntese de ATP há uma diminuição do  $\Delta\mu H^+$ , permitindo que a CTEM continue normalmente seu transporte de elétrons. Assim, pode dizer que o fluxo de elétrons é estimulado pela quantidade de ADP disponível para a atividade catalítica do CV (ALEKSEEVA et al., 2015).

Quando as mitocôndrias são isoladas para estudo, pode-se controlar a taxa da respiração adicionando ADP. *In vivo*, a respiração sofre influência pela razão ATP/ADP citosólica, dependendo assim tanto da concentração de ADP disponível quanto da taxa de utilização de ATP (BUCHANAN et al., 2015). As ATPases apresentam uma função inversa à ATP-sintase, realizando a hidrólise de ATP. Elas também realizam o transporte de H<sup>+</sup>, porém não participam da CTE<sub>m</sub> (BUCHANAN et al., 2015). Existem dois tipos, a V-ATPase, presente no tonoplasto, cuja razão de H<sup>+</sup> translocados de um lado para o outro do tonoplasto é de dois H<sup>+</sup> para cada ATP hidrolisado (BUCHANAN et al., 2015). O outro tipo é a P-ATPase, presente na membrana plasmática, que diferentemente da V-ATPase, bombeia apenas um H<sup>+</sup> para cada ATP hidrolisado (BUCHANAN et al., 2015).

A ATP-sintase é essencial para o funcionamento das vias metabólicas, já que é responsável por produzir energia para as funções celulares dos organismos. Resumidamente, o CV sintetiza ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. A passagem de H<sup>+</sup> pelo canal do domínio F<sub>o</sub> promove uma rotação na conformação do domínio F<sub>1</sub>, liberando o ATP que está ligado fortemente a um dos sítios ativos deste domínio F<sub>1</sub>. Devido à baixa permeabilidade da membrana interna a esses H<sup>+</sup>, a ATP sintase se beneficia desse  $\Delta\mu\text{H}^+$  para realizar a síntese de ATP, dissipando o  $\Delta\mu\text{H}^+$  gerado (TAIZ et al., 2017).

### 3.2.9 Proteína desacopladora (UcP)

Existe também nas mitocôndrias outra proteína inserida na membrana interna que interfere na formação do  $\Delta\mu\text{H}^+$ , que por consequência influenciará na geração de ATP. Esta é a proteína desacopladora (UcP) capaz de aumentar a permeabilidade da membrana a H<sup>+</sup>, interferindo assim, no  $\Delta\mu\text{H}^+$  e por consequência na produção de ATP (MAILLOUX E HARPER, 2011). O retorno dos H<sup>+</sup> para a matriz mitocondrial impulsiona o CV a produzir ATP. Dessa forma, pode-se considerar que a atividade UcP pode ocorrer sem prejuízos para a capacidade de síntese de ATP pelas mitocôndrias, desde que esta (UcP, bombeando H<sup>+</sup> de volta à matriz) esteja aquém da taxa do bombeamento de H<sup>+</sup> para o espaço intermembranar pela CTE<sub>m</sub> (BOUILLAUD et al., 2016).

O transporte de H<sup>+</sup> através da UcP, é ativado por ácidos graxos. Alguns autores propuseram uma hipótese de que a UcP trabalha da seguinte forma no desacoplamento de H<sup>+</sup>: quando ácidos graxos protonados giram internamente na

bicamada fosfolipídica da membrana, isso resulta no transporte de  $H^+$  do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial (BOUILLAUD et al., 2016). Essa hipótese é conhecida como “ciclagem dos ácidos graxos”. Com o transporte dos  $H^+$  para a matriz mitocondrial, sem passar pela ATPase, a Ucp atua dissipando parte da energia acumulada na forma de  $\Delta\mu H^+$ , o que em condição de super-redução da CTEM, pode acelerar o fluxo de elétrons e minimizar a geração de ERO (MAILLOUX E HARPER, 2011).

A ação da Ucp é estimulada por ERO e induzida por estresse (BUSIELLO et al., 2015). Ela é importante para prevenir que a CTEM sofra danos oxidativos irreversíveis. Sendo assim, seu funcionamento impede a hiperredução da CTEM e a produção das ERO, que causam danos na membrana mitocondrial (BUSIELLO et al., 2015). A atividade da Ucp, pode ser afetada pelo pH, ou seja, um pH ácido leva a inibição da Ucp (BOUILLAUD et al., 2016). Outro inibidor eficiente na atividade da Ucp é a albumina sérica bovina (BSA) (MACHER et al., 2018).

### 3.3 Biossíntese do ácido ascórbico e sua relação com a CTEM

O AA pode ser encontrado no tecido vegetal em sua forma reduzida, o ácido L-ascórbico (forma ativa), ou em sua forma oxidada, inativa, o ácido dehidroascórbico (FOYER, 2017). O AA se encontra em sua forma ativa quando ele tem atividade antioxidante, ou seja, ele é capaz de agir sobre as ERO, que como dito anteriormente são muito danosas em grande quantidade, reduzindo-os de modo geral a  $H_2O$ . O AA participa da eliminação das ERO basicamente de duas formas: uma enzimática e outra não enzimática (HOSSAIN et al., 2015). Na forma não enzimática, o próprio AA reage diretamente com a ERO se oxidando e reduzindo a ERO formando  $H_2O$ . Neste caso, o AA se converte em ácido dehidroascórbico (ADH), sua versão inativa (HOSSAIN et al., 2015). Já no processo enzimático, a participação do AA se dá junto com enzimas que o auxiliarão a extinguir as ERO. Um exemplo destas enzimas é a ascorbato peroxidase (APX). A APX usa o AA como um cofator para extinção de uma molécula de ERO e assim, novamente, o AA se transforma em ADH (HOSSAIN et al., 2015).

No caso dos frutos, durante a fase do amadurecimento ocorre um aumento natural na produção de ERO, principalmente no interior das mitocôndrias devido ao processo de respiração. Por consequência, com o aumento da

respiração celular há o aumento na taxa de produção de AA, ajudando assim no controle do possível excesso de ERO gerado (LANDI et al., 2015).

O AA também atua na síntese dos fitormônios, etileno e giberelina, auxiliando o metabolismo vegetal como um cofator enzimático. Esses fitormônios são essenciais no desenvolvimento das plantas, além disso, o AA atua na síntese das antocianinas, hidroxiprolina entre outros metabólitos secundários (FOYER, 2017).

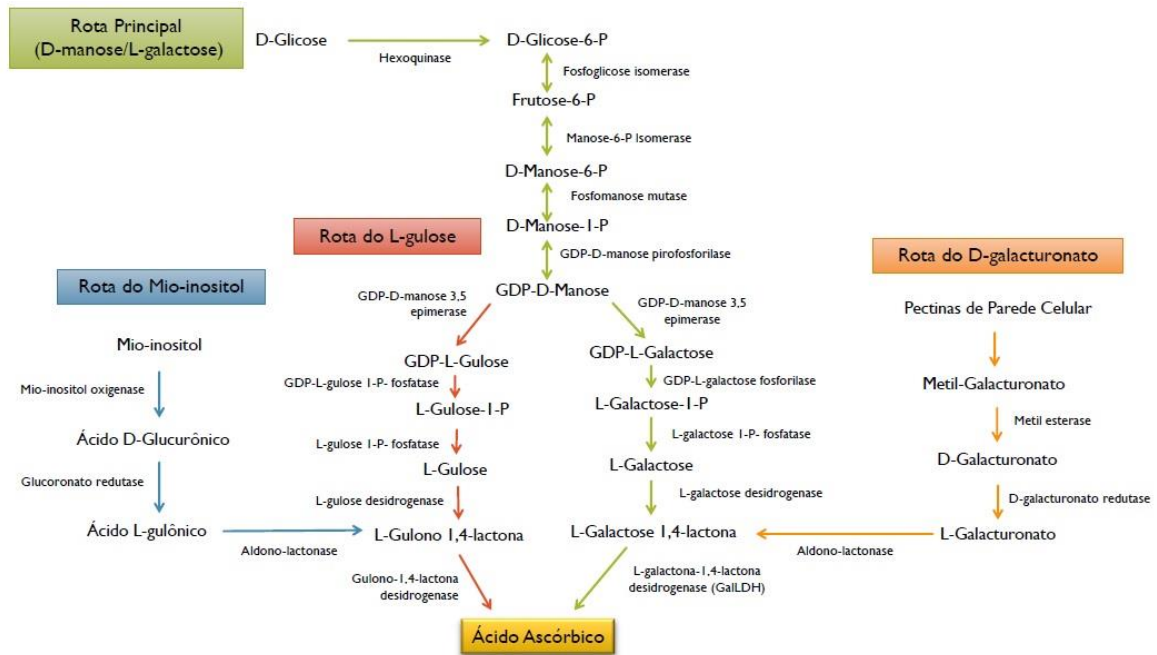


Figura 1: Vias biossintéticas do ácido ascórbico. 1) via Wheeler-Smirnoff, a partir da D-glicose; 2) via a partir da GDP-L-gulose; 3) via a partir do Myo-Inositol e 4) via a partir do ácido D-galacturônico, componente principal das pectinas da parede celular.

Pode-se dizer que existem, hoje, pelo menos 4 rotas conhecidas da síntese de AA. A rota número 1 que é chamada de “rota da D-Glicose”, a número 2 que é a “rota da GDP-D-mannose 3,5-epimerase”, a rota 3 que é chamada de “rota da Mio-Inositol”, a rota número 4 é chamada de “rota do ácido D-galacturônico, componente principal das pectinas da parede celular, que inicia o processo de degradação dessas paredes (Figura 1). Nos vegetais, a biossíntese de AA é relacionada com a degradação de polissacarídeos na parede celular, essa degradação ocorre principalmente na etapa de amadurecimento dos frutos, o que ocasiona o amolecimento da polpa em frutos carnosos (DIETZ, 2016). O GalL é o precursor da GalLDH no processo de biossíntese do AA. Esse precursor tem a

capacidade de transitar entre as membranas, portanto, depois de sua formação, ele migra para as mitocôndrias e assim participa da etapa final da síntese do AA (BARTOLI et al., 2009; MILLAR et al., 2011; VENKATESH e PARK, 2014).

No interior da mitocôndria, mais especificamente através da enzima GalLDH, o precursor GalL será oxidado, gerando AA. Assim, simultaneamente, isso ocasionará a redução do Cit c, componente chave na fosforilação oxidativa. Quando o AA é gerado há a doação de elétrons do GalL para o Cit c, reduzindo-o. O Cit c reduzido, a seguir, será capaz de se oxidar doando elétrons para a COX. A COX em sua forma reduzida após receber esses elétrons irá reduzir o O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O na última etapa da CTE<sub>m</sub> no processo respiratório mitocondrial (BARTOLI et al., 2009; MILLAR et al., 2011; VENKATESH e PARK, 2014). Com esse transporte de elétrons via GalLDH, se inicia também a transferência de H<sup>+</sup> da matriz para o espaço intermembranar, via COX. Assim, o potencial de membrana será ampliado a partir da atividade da GalLDH (BARTOLI et al., 2005; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015).

### 3.3.1 L-galactona-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH)

A enzima GalLDH é uma aldonolactona oxidorreductase do grupamento vanilil-álcool oxidase, da família das flavoproteínas (LEFERINK et al., 2008a). Em plantas ela foi identificada primordialmente no ano de 1954 (ISHERWOOD et al., 1954; MAPSON et al., 1954) e desde então já ocorreram muitos estudos para melhor compreensão da atividade e propriedades da GalLDH (RODRÍGUEZ-RUIZ et al., 2017).

Uma grande parte das flavoproteínas possui um grupamento FAD covalentemente ligado à sua estrutura. Esse grupamento age como oxidases, que utilizam moléculas de oxigênio para reoxidar a flavina, o que resulta na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (LEFERINK et al., 2008b). A GalLDH também contém um grupamento FAD ligado à sua estrutura, porém ela tem baixa afinidade com moléculas de oxigênio, por isso a GalLDH não é considerada uma oxidase e sim uma desidrogenase (LEFERINK et al., 2008b).

Foram realizados estudos com mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, onde pôde-se averiguar que a atividade da GalLDH influencia diretamente no processo respiratório. A relação da GalLDH com a respiração celular permite sugerir que a mesma se localiza na membrana interna das mitocôndrias, estando

a mesma acoplada à CTE<sub>m</sub> (BARTOLI et al., 2000). Mais especificamente, ela apresenta uma associação direta com o CI da CTE<sub>m</sub> (MAJED, 2016).

A última etapa da biossíntese do AA é catalisada pela GalLDH, uma via conhecida pelo nome "Smirnof-Wheeler", acontece no interior das mitocôndrias sendo marcada pela oxidação da GalL ao AA (BARTOLI et al., 2000; MILLAR et al., 2003; LANDI et al., 2015). Segundo Ôba et al. (1995) e Bartoli et al. (2005), o Cit c recebe elétrons transferidos diretamente da GalLDH, assim o Cit c irá reduzir a COX para que esta, possa reduzir o O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O.

A GalLDH é uma enzima muito importante, já que é responsável pela geração do AA. Ela se constitui em um monômero composto por uma cadeia de 598 aminoácidos, em um peso molecular de 57 Da (PATERAKI et al., 2004). Ainda segundo Pateraki et al. (2004), possivelmente possui três regiões transmembranares e uma identidade análoga em espécies diferentes, podendo chegar a 80% de identidade análoga, dados comprovados por eles nos estudos de *Arabidopsis*, batata, morango, tomate, couve-flor e batata-doce.

De acordo com Bartoli et al. (2000), a localização da GalLDH nas mitocôndrias é na membrana interna delas, fixada à CTE<sub>m</sub>, etapa final da respiração. O GalL transportado do citosol é oxidado facilmente devido ao sítio ativo da GalLDH, já que ele está voltado para a fase externa das cristas mitocondriais. Foi realizado um estudo com mitocôndrias de tubérculos de batata, onde revelou que a GalLDH influencia diretamente no processo respiratório. O estudo mostrou que com a adição de 5 mM de GalL e também de outros substratos da respiração mitocondrial, como o NADH e o ADP, o consumo de O<sub>2</sub> subiu cerca de 20%, assim como se elevou a produção de AA (BARTOLI et al., 2000).

Outros estudos revelaram que a atuação da GalLDH também é relevante no trânsito de elétrons via CI em mitocôndrias de plantas (PINEAU et al., 2008). Já que ela reage diretamente com o Cit c, sua atuação estaria impedindo que a via principal de elétrons ocorresse em sua totalidade (BARTOLI et al., 2005). Com o Cit c reduzido pela GalLDH, seria impedido de receber elétrons provenientes inicialmente do CI e CIII, impedindo o transporte de H<sup>+</sup> da matriz para o espaço intermembranar que esses complexos realizam (SAREWICZ e OSYCZKA, 2015; JONES et al., 2017). A AOX estando ativa permite o recebimento dos elétrons vindos do CI, mantendo o bombeamento de H<sup>+</sup> ativo pelo CI (YOSHIKAWA e



SHIMADA, 2015). Porém, com esta atividade da AOX, ela não permite que esses elétrons passem para o CIII, então ela evita que o CIII bombeie esses H<sup>+</sup> para o espaço intermembranar (YOSHIKAWA e SHIMADA, 2015). Dessa maneira, com o CIII sem receber elétrons, não haverá transferência de elétrons para o Cit c, assim, a atividade GalLDH será efetiva na redução do Cit c (BARTOLI et al. 2005). O Cit c, então, poderá reduzir o CIV permitindo assim o transporte de dois H<sup>+</sup> da matriz para o espaço intermembranar (BARTOLI et al., 2005; TAIZ et al., 2017). Assim sendo, a atividade GalLDH vai interferir na criação do  $\Delta\mu\text{H}^+$ , causando uma alteração no potencial de membrana.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e padronização do material vegetal

Foram utilizados frutos de mamão 'Golden' (*Carica papaya* L.) obtidos em um mercado de Campos dos Goytacazes, RJ. Os frutos selecionados estavam maduros fisiologicamente, correspondendo ao estágio 1 de amadurecimento (fruto com no máximo 15% da superfície da casca amarelada, rodeada de verde claro) (RITZINGER e SOUZA, 2000).

Os frutos de mamão foram então previamente higienizados e a firmeza foi avaliada utilizando um texturômetro (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<sup>-1</sup>, com ajuste de 0,1961 N.

A coloração da casca foi determinada a partir da medição do ângulo de cor *hue* (0° = vermelho, 90° = amarelo, 180° = verde, 360° = azul), utilizando um colorímetro portátil (Croma meter, modelo CR-300, Minolta, Japão), sendo realizadas três medições equidistantes por fruto, diretamente sobre a casca, sempre na região equatorial (McGUIRE, 1992).

### 4.2 Extração e purificação das mitocôndrias em extrato de polpa de mamão

O procedimento para extração e purificação das mitocôndrias seguiu o protocolo estabelecido por Oliveira et al. (2015). Todo o procedimento foi realizado a 4 °C, utilizando aproximadamente 300 g de tecido da polpa, o qual foi

homogeneizado em solução tampão com o auxílio de uma centrífuga (Juicer, Walita R16720). A solução tampão para a extração foi composta de 0,4% (p/v) PVP-25, manitol 0,35 moles.L<sup>-1</sup>, BSA 0,1% (p/v), MOPS 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, EDTA 3 mmoles.L<sup>-1</sup>, Cys 8 mmoles.L<sup>-1</sup>, o pH desta solução foi ajustado para 7,4. Após a homogeneização da polpa do mamão com a solução tampão, o material foi filtrado em uma camada de Miracloth (Calbiochem, CA, USA) e duas camadas de gaze. O material foi centrifugado por 15 minutos a 1.500 *g*, sendo o *pellet* descartado e o sobrenadante centrifugado novamente por 15 minutos a 15.000 *g*. Desta centrifugação foi aproveitado o *pellet*, o qual foi resuspenso utilizando tampão de lavagem composto de BSA 0,1% (p/v), EDTA 0,5 mmoles.L<sup>-1</sup>, manitol 0,35 moles.L<sup>-1</sup>, MOPS 10 mmoles.L<sup>-1</sup> sendo ajustado seu pH para 7,2. O material que foi resuspenso passou por mais uma centrifugação de 8 minutos a 1.000 *g*, sendo descartado o *pellet* e aproveitado o sobrenadante. O sobrenadante foi centrifugado novamente, por 15 minutos a 9.000 *g*, sendo obtidas, no precipitado, a fração de mitocôndrias lavadas, com descarte do sobrenadante.

O extrato de mitocôndrias lavadas passou por um processo de purificação, para aumentar a concentração de mitocôndrias íntegras no extrato e que seja garantido o mínimo possível de resíduos descartáveis, como mitocôndrias rompidas com o processo de lavagem ou até mesmo fragmentos de outras organelas. Nesse processo, o precipitado foi desprendido do recipiente com o auxílio de 1 mL da solução tampão de lavagem e um pincel com cerdas macias, sendo realizados movimentos leves de fricção deste precipitado contra a parede do tubo de centrifugação.

Para a purificação foi utilizado um gradiente *Percoll* contendo o precipitado com a fração de mitocôndrias lavadas e o gradiente *Percoll*. Este gradiente é composto de tampão de purificação contendo 22,5 % de *Percoll* (v/v), manitol 0,6 mmoles.L<sup>-1</sup>, MOPS 10 mmoles.L<sup>-1</sup>, BSA 0,5% (p/v) pH 7,2. Este extrato com as mitocôndrias lavadas foi centrifugado novamente, por 45 minutos a 12.000 *g*. Para identificar a presença das mitocôndrias na solução, foi observado no tubo de centrifugação a formação de um halo com coloração castanha, na região de interface entre o terço inferior e o mediano. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, descartou-se todo o líquido superior e inferior a esse halo. Esse halo com a fração de mitocôndrias purificadas foi transferido para outro tubo utilizando uma pipeta Pasteur, com cuidado para que as mitocôndrias não fossem rompidas. Foi

acrescentada a esse tubo, uma solução tampão de lavagem com aproximadamente 10 mL e em seguida centrifugado por 15 min a 10.000 g, coletando o precipitado com as mitocôndrias purificadas. A concentração de proteínas foi analisada utilizando um comprimento de onda igual a 595 nm no espectrofotômetro seguindo os padrões descritos por Bradford (1976).

Em todos os ensaios de atividade respiratória foram utilizados extratos mitocondriais com no mínimo 70% de mitocôndrias íntegras. A integridade mitocondrial foi avaliada a partir da atividade da COX pela adição do Cit c conforme método proposto por Sweetlove et al. (2007). A COX está localizada na membrana mitocondrial interna e necessita do Cit c em sua forma reduzida como doador de elétrons. Por se tratar de uma proteína de grande peso molecular, o Cit c não é capaz de atravessar a membrana intacta de uma mitocôndria. Sendo assim, a atividade da COX não deve ser alterada significativamente quando mitocôndrias íntegras são incubadas com o Cit c. Assim, para estimar a integridade mitocondrial foi feita a comparação da atividade da COX, na ausência e presença de Triton X-100, um detergente capaz de romper a membrana (SWEETLOVE et al., 2010). A atividade da COX foi quantificada em extrato mitocondrial em meio de reação contendo Cit c, a partir do consumo de O<sub>2</sub> utilizando um eletrodo de O<sub>2</sub> do tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK).

O ensaio foi conduzido na temperatura de 25°C. Foi adicionado ao eletrodo de O<sub>2</sub> do tipo Clark 500 µL de solução de leitura e 100 µL de mitocôndrias purificadas. A reação iniciou com a adição de 20 µL de AA 500 mmol.L<sup>-1</sup>, sendo registrada a taxa respiratória (a) e anotado para utilizar no cálculo abaixo. Depois foi adicionado 10 µL de Cit c 5 mmol.L<sup>-1</sup> e também foi registrada a taxa respiratória (b). Por último, foram adicionados 5 µL Triton X-100 10% (v/v), registrando a taxa respiratória novamente (c). Dessa forma, foi possível calcular a integridade de membrana a partir da atividade respiratória nas condições descritas acima, segundo o método proposto por Sweetlove et al. (2007). O percentual de integridade de membrana mitocondrial foi dado pela equação a seguir:

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

#### 4.3 Aplicação dos tratamentos e quantificação da taxa respiratória em mitocôndrias purificadas

A taxa respiratória foi determinada pelo consumo de  $O_2$  em extratos de mitocôndrias purificadas extraídas da polpa do mamão com o auxílio de um eletrodo de  $O_2$  do tipo Clark (Hansatech, Respire 1, UK), em meio aquoso. A temperatura para essa avaliação foi de  $25^\circ C$ . Utilizando 1 mg de mitocôndria purificada, por ensaio, em 1 mL de meio de reação contendo: manitol  $0,35 \text{ moles.L}^{-1}$ , tampão fosfato  $10 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , KCl  $10 \text{ mmoles.L}^{-1}$ ,  $MgCl_2$   $5 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , BSA 0,5% (p/v), com pH 7,2.

A atividade respiratória foi medida com a adição de 10  $\mu L$  de NADH  $8 \text{ mmoles.L}^{-1}$ . Para verificar a taxa de fosforilação foi adicionado 100 nmoles de ADP. Após o consumo de todo ADP, pode-se então obter o coeficiente respiratório (CR), medindo a razão entre o consumo de oxigênio antes e após a adição de ADP, que representa a eficiência de fosforilação das mitocôndrias.

Após a medição da atividade respiratória, foi medida a participação das vias que consomem oxigênio, para isso após o consumo de todo ADP foram feitas adições sequenciais de ácido salicílico hidroxâmico (SHAM)  $4 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , para inibir a AOX e azida de potássio ( $KN_3$ )  $3 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , para inibir a COX. Após adição de SHAM e  $KN_3$  todas as oxidases terminais se encontram inibidas e qualquer consumo de  $O_2$  é considerado respiração residual, não sendo devida à COX, nem à AOX.

A partir dessas adições de substratos e inibidores foi possível obter os traçados a partir do software Oxytherm (Hansatech, UK) para a determinação das taxas respiratórias, específicas, da preparação mitocondrial. Com isto, foi possível determinar e comparar os percentuais de consumo de  $O_2$  total, a respiração referente à atividade AOX e a participação da via COX.

Foi feita também a medição da respiração a partir do estímulo à atividade da GalLDH como principal rota para o fornecimento de elétrons para a CTEM. Para isso foram utilizados tratamentos semelhantes aos citados anteriormente, acrescido de GalL  $5 \text{ mmoles.L}^{-1}$ , como substrato para a GalLDH que irá reduzir o Cit c e alimentar a redução de  $O_2$  pela via COX da CTEM (ÔBA et al., 1995). Neste ensaio foram utilizados os inibidores, rotenona e difenileniodônio (DPI), para inibir, respectivamente, o CI e a GalLDH. Assim, foram montados os

seguintes tratamentos, sendo registrado o consumo de O<sub>2</sub> por cerca de 3 min após cada adição:

Tratamento 1: *Respiração a partir do uso de Gall como único substrato*

Gall 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup> e KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>;

Tratamento 2: *Respiração a partir do uso de NADH como único substrato*

NADH 8 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup> e KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>;

Tratamento 3: *Efeito da inibição do complexo I na respiração a partir do uso de Gall como único substrato*

Rotenona 4 mmoles.L<sup>-1</sup>, Gall 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup> e KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>;

Tratamento 4: *Efeito da inibição do complexo I na respiração a partir do uso de NADH como único substrato*

Rotenona 4 mmoles.L<sup>-1</sup>, NADH 8 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup> e KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>;

Tratamento 5: *Efeito da inibição da atividade GalLDH na respiração a partir do uso de Gall como único substrato*

DPI 2 mmoles.L<sup>-1</sup>, Gall 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup> e KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>;

Tratamento 6: *Efeito da inibição da atividade GalLDH na respiração a partir do uso de NADH como único substrato*

DPI 2 mmoles.L<sup>-1</sup>, NADH 8 mmoles.L<sup>-1</sup>, ADP 50 mmoles.L<sup>-1</sup>, SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup> e KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>.

#### 4.4 Determinação da atividade da GalLDH em extrato de mitocôndrias purificadas

A atividade da GalLDH foi avaliada por espectrofotometria, utilizando o método proposto por Ôba et al. (1995), com algumas modificações.

O método tem como princípio a detecção da redução do Cit c utilizando o Gall como substrato. As mitocôndrias purificadas foram adicionadas em tampão Tris 50 mmoles.L<sup>-1</sup> com pH 7,8 contendo Cit c 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, Gall 5 mmoles.L<sup>-1</sup> e detergente Triton® 5% para possibilitar a entrada de Cit c no interior da organela. Também estava presente no meio de reação KN<sub>3</sub> 5 mmoles.L<sup>-1</sup>, para manter a redução de Cit c facilitando a atividade da GalLDH. A redução de Cit c por Gall

foi monitorada por 2 minutos, em intervalos de 10 segundos, no comprimento de onda de 550 nm. Foram utilizados os mesmos tratamentos citados anteriormente. Os dados foram expressos como  $\mu\text{mol Cit c reduzido min}^{-1}\text{mg prote\text{í}na}^{-1}$ .

#### 4.5 Produção de AA em extrato de mitocôndrias purificadas

As mitocôndrias purificadas foram utilizadas para a quantificação da produção de AA, sendo 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). O cromatógrafo foi equipado com uma coluna “Spherisorb ODS C18”. Os resultados foram apresentados em mg ácido ascórbico  $100\text{ g massa fresco}^{-1}$ , seguindo o método proposto por Benlloch et al. (1993).

É importante frisar que para realizar a análise no HPLC, a quantidade máxima de amostra deve ser de 250  $\mu\text{l}$ , incluindo o extrato mitocondrial e os demais componentes do meio de reação. Os tratamentos foram acondicionados em tubos eppendorf de 1,0 mL conforme descrição anterior, sendo mantidos em repouso por 2 horas antes de iniciada as determinações. Após 2 h os tubos foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos, a 4 °C. Após centrifugação foi coletado o sobrenadante e transferido para outro recipiente, sendo adicionado dois sais 100  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , pH 3,0 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) e 100  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , pH 10,4 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) que quando misturados se tornaram uma solução tampão, deixando descansar por 10 minutos. Após esse descanso, foi adicionado ácido trifluoroacético (TFA) 5% (v/v) para parar a reação. Após isso, os extratos foram levados para a leitura em HPLC. Foram utilizados os mesmos tratamentos citados anteriormente.

As amostras foram filtradas com o auxílio de uma seringa e com filtro de nylon em PVDF, com diâmetro de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  e 0,45  $\mu\text{m}$ . Para a leitura, o aparelho HPLC utilizou uma solução tampão, contendo os dois sais  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 100  $\text{mmoles.L}^{-1}$  pH 7,0. Das amostras, 20  $\mu\text{L}$  foram injetados no cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) para leitura do pico de AA. O tempo de corrida foi de 10 minutos, sendo que o pico de AA foi identificado entre 3 e 5 minutos de corrida. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol.mg prote\text{í}na}^{-1}$ .

#### 4.6 Determinação do $\Delta\Psi$ em extrato de mitocôndrias purificadas

Para determinar o  $\Delta\Psi$  foi utilizado o marcador afranina O, um corante que é distribuído eletroforicamente na mitocôndria. Essa distribuição da afranina está relacionada aos grupos que são hidrofóbicos com cargas negativas, que estão presentes na membrana mitocondrial interna. Quando a célula oxida substratos e em consequência disso começa a gerar um  $\Delta\Psi$ , irá ocorrer a mudança no espectro de absorção da safranina. Sendo assim, a fluorescência da safranina irá diminuir de acordo com o potencial de membrana gerado (AKERMAN E WIKSTRÖM, 1976). Assim sendo, a formação do  $\Delta\Psi$  está relacionada com a redução no valor de fluorescência obtido, quanto menor o valor de fluorescência registrado, maior será o  $\Delta\Psi$  real.

A leitura da fluorescência foi realizada em leitor de placas de "Elisa" utilizando os comprimentos de onda de excitação de 490 nm e emissão de 590 nm, em um espectrofluorímetro (Hitachi, F-4500, Japan). Os ensaios foram constituídos de tampão de reação, 5  $\mu\text{L}$  de mitocôndrias purificadas, ADP 50  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , SHAM 5  $\text{mmoles.L}^{-1}$ ,  $\text{KN}_3$  5  $\text{mmoles.L}^{-1}$  e SHAM 5  $\text{mmoles.L}^{-1}$  +  $\text{KN}_3$  5  $\text{mmoles.L}^{-1}$ . Também foi adicionado o carbonilcianida-3-clorofenilhidrazona (CCCP) 100  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , como desacoplador, o que possibilitou confirmar a integridade da membrana.

Os ensaios para medir o  $\Delta\Psi$  foram os mesmos propostos para medir a taxa respiratória, com a exceção dos com rotenona e DPI. Porém, vale ressaltar que foi necessário acrescentar um ensaio controle, composto de apenas mitocôndrias purificadas, meio de reação e safranina 5  $\text{mmoles.L}^{-1}$ . Assim, diferente dos outros tratamentos da quantificação da taxa respiratória, a safranina 5  $\text{mmoles.L}^{-1}$  foi adicionada em todos os ensaios do  $\Delta\Psi$ .

Para avaliar a influência da atividade da GalLDH sobre a geração do  $\Delta\Psi$ , foram montados dois tratamentos. O tratamento número um, onde foi utilizado NADH como substrato da CTEM a ser oxidado pelo CI. E, o tratamento número dois, onde foi utilizado GalL como substrato da CTEM a ser oxidado pela GalLDH. O primeiro ensaio intitulado de 'Controle' foi empregado de forma que a mitocôndria estivesse em seu estado basal, não sendo acrescentado nenhum substrato nem inibidor, sendo utilizado como comparativo para os demais, quando foram acrescentados substratos e inibidores da CTEM. Neste ensaio estavam



presentes 5  $\mu\text{L}$  de mitocôndrias purificadas, safranina 5  $\text{mmoles.L}^{-1}$  e meio de reação contendo manitol 0,35  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , tampão fosfato 10  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , KCl 10  $\text{mmoles.L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  5  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , BSA 0,5% (p/v), com pH 7,2.

Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF).

#### 4.7 Quantificação da produção de ATP

Para medir a capacidade da mitocôndria em sintetizar ATP concomitante à síntese de AA foi utilizado o método proposto por Yamamoto et al. (2002) com adaptações. Foram incubados 50  $\mu\text{g}$  de mitocôndrias purificadas em um meio de reação contendo sacarose 150  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , MOPS 10  $\text{mmoles.L}^{-1}$ ,  $\text{MgCl}_2$  5  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , KCl 7,5  $\text{mmoles.L}^{-1}$ ,  $\text{KHPO}_4$  7,5  $\text{mmoles.L}^{-1}$  e GalL 5  $\text{mmoles.L}^{-1}$  durante 10 min. A reação foi iniciada com a adição de 50  $\mu\text{moles.L}^{-1}$  de ADP e 10  $\text{mmoles.L}^{-1}$  de malato, e seguiu incubado por 30 minutos a 25°C. Foram realizadas reações controle, conduzidas sem a presença de malato, ADP e GalL 5  $\text{mmoles.L}^{-1}$ . Após período de incubação o extrato mitocondrial foi resfriado a 4 °C, seguido de centrifugação a 9.000 g por 15 minutos. Uma amostra de 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi utilizada para a quantificação do ATP, expresso pelo ensaio bioluminescente baseado no método luciferina-luciferase (Sigma-Aldrich, FLAA-1KT), utilizando um espectrofotômetro de luminescência (Shimadzu, RF5301PC, Japan), com comprimento de onda de emissão de 560 nm.

A reação iniciou com a adição de 10  $\mu\text{L}$  da mistura para o ensaio bioluminescente (Sigma-Aldrich, FLAAM) em um meio contendo 1.890  $\mu\text{L}$  de tampão de ensaio (tampão tricino 50  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , BSA 0,01% (p/v), EDTA 1  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , DTT 1  $\text{mmoles.L}^{-1}$  e  $\text{MgSO}_4$  10  $\text{mmoles.L}^{-1}$ , pH 7,8) e 100  $\mu\text{L}$  da amostra. Essa reação foi monitorada por 1 min. Previamente foi realizada uma curva de calibração com concentração da solução padrão de ATP variando de 0,1 a 10  $\mu\text{mol}$ , para a expressão dos dados de análise. Os dados foram expressos em  $\text{nmol ATP } \mu\text{g proteína}^{-1}$ .

#### 4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se pelo menos 5 preparações mitocondriais distintas. Após a coleta, os dados foram submetidos a ANOVA e as médias desses dados foram comparados pelo teste de Tukey em nível de 5% de

probabilidade, com o auxílio do programa estatístico R Studio. Os dados foram apresentados com média  $\pm$  erro padrão. Os pressupostos da análise de variância foram verificados a fim de garantir confiabilidade na análise de variância, sendo eles homocedasticidade, normalidade e independência dos resíduos e esfericidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento e purificação de mitocôndrias, por meio de um gradiente de Percoll, possibilitou a obtenção de extratos com mais de 80% de mitocôndrias íntegras. Ainda, as preparações apresentaram um coeficiente respiratório (CR) de 2,3, indicando um nível satisfatório de acoplamento mitocondrial na oxidação do NADH (OLIVEIRA et al., 2017).

A caracterização quanto à coloração da casca e firmeza dos frutos de mamão 'Golden' está representada na Figura 2.

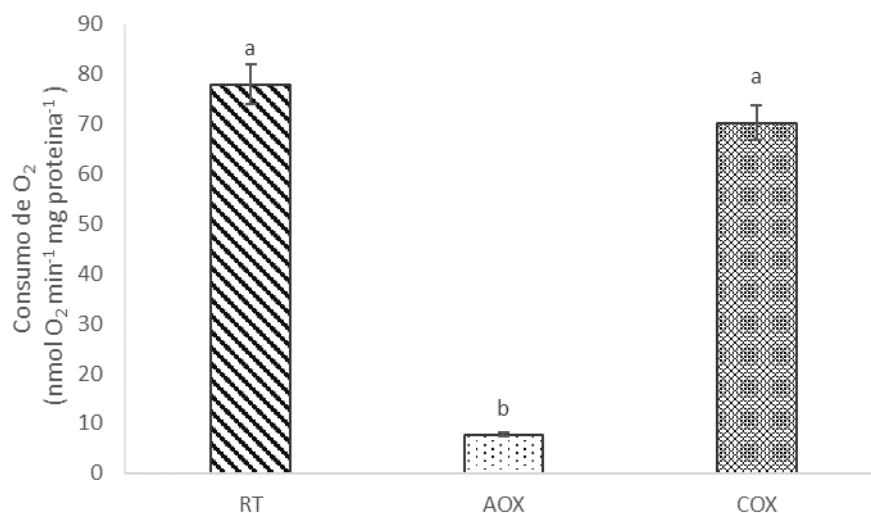


**Ângulo de cor *hue* (°h):  $113,2 \pm 2,5$ ; Firmeza (N):  $17,4 \pm 1,5$**

**Figura 2:** Foto ilustrativa dos frutos de mamão 'Golden' usados para as análises de coloração da casca, firmeza da polpa e extração das mitocôndrias. Apresentados os valores médios do ângulo de cor *hue* casca e firmeza dos frutos.  $n = 10$ .

Para que se possa caracterizar o estágio de amadurecimento dos frutos, foram necessárias as medidas quanto a firmeza do fruto e o ângulo de cor *hue* da casca. Neste trabalho foram obtidos valores médios de 113,2 °h para o ângulo de cor *hue* e 17,4 N para a firmeza do fruto (Figura 2). Souza et al. (2014) realizaram experimentos com mamão 'Golden' entre o primeiro e o terceiro dia após a colheita e obtiveram resultados parecidos para o ângulo *hue*, o qual variou entre 112,1 °h e 104,3 °h.

O consumo de O<sub>2</sub> total e a participação da COX e AOX utilizando NADH 8 mmoles.L<sup>-1</sup> como substrato respiratório estão representados na Figura 3. A respiração total foi de 77,9 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos demonstram que a participação da COX em consumir O<sub>2</sub> foi de aproximadamente 90% enquanto que a da via AOX foi de apenas 10% nos frutos de mamão utilizados no experimento (Figura 3). A menor participação da via AOX no consumo de O<sub>2</sub> nas amostras de mitocôndrias analisadas está relacionada ao estágio verde de maturação do mamão.



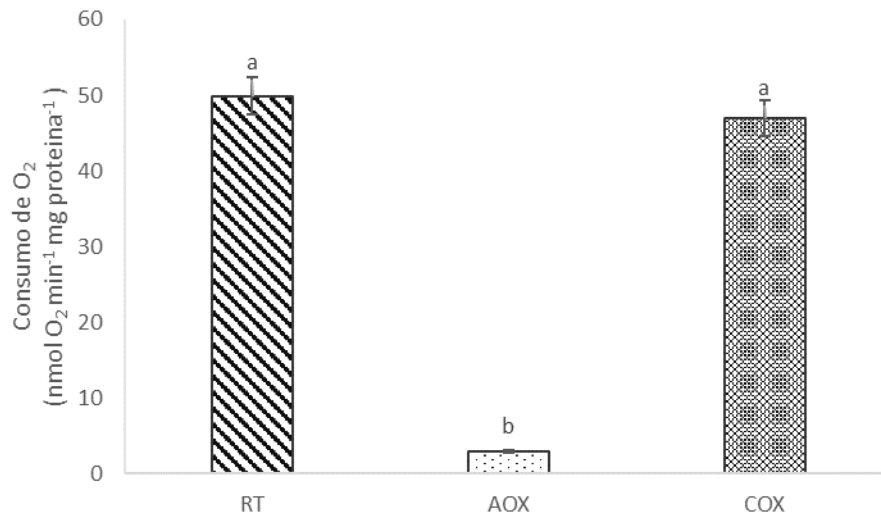
**Figura 3:** Taxa de consumo total de O<sub>2</sub> (RT), consumo de O<sub>2</sub> da AOX (respiração resistente a KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>) e consumo de O<sub>2</sub> da COX (respiração resistente ao SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup>) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', utilizando NADH 8 mmoles.L<sup>-1</sup> como substrato respiratório. As barras representam a média de 5 extrações independentes com o erro padrão. Letras iguais sobre as barras representam médias iguais pelo teste Tukey, p<0,05.

Os resultados obtidos corroboram com as características do material vegetal, que se encontra no estágio 1 de amadurecimento. Dados semelhantes

foram obtidos por Silva et al. (2015) com mamões UENF/Caliman01 e Tainung 01 quando se verificou que a participação da via COX no consumo de O<sub>2</sub> foi maior que da via AOX, sendo de 65% e 35%, respectivamente. Este é um evento normalmente observado em frutos considerados climatéricos, onde a diminuição na atividade da via COX irá favorecer a elevação da participação da via AOX no consumo de O<sub>2</sub>, o que indica que esse órgão está entrando ou está na fase de transição para a fase de senescência (CONSIDINI et al., 2001; MAZORRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2015).

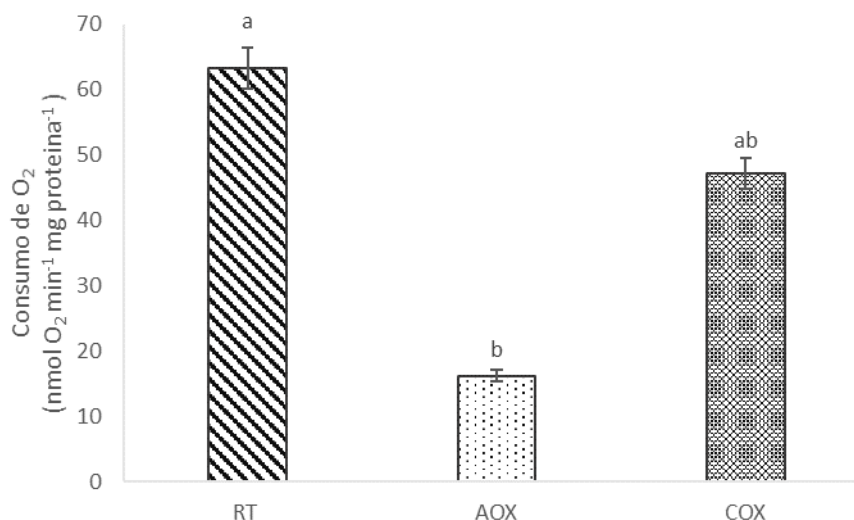
No processo de amadurecimento, a participação da AOX tende a aumentar significativamente, proporcionando um aumento na taxa respiratória (OLIVEIRA et al., 2015). A maior participação da AOX pode prevenir a super redução dos complexos da CTEM, evitando a produção de ERO. Um ponto importante da síntese de ATP, é que se for sintetizado em grande quantidade ele pode inibir o processo respiratório (RAMZAN et al., 2010). Sendo assim, o aumento na atividade da AOX pode ser interpretado também, como uma alternativa para a manutenção do trânsito de elétrons da CTEM, diminuindo assim a síntese de ATP e um possível bloqueio do processo respiratório.

A aplicação de rotenona junto com o substrato NADH resultou em diminuição no consumo de O<sub>2</sub> na comparação com o tratamento com apenas NADH (Figura 4). Quando estavam presentes no meio de reação NADH + rotenona o consumo total de O<sub>2</sub> foi de 49,9 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, o que mostra uma queda de pouco mais de 37% na taxa de respiração total do extrato mitocondrial devido à presença do inibidor do CI (Figura 4). Pode-se observar então que a participação do CI foi menor se comparado com o tratamento anterior, devido à presença de rotenona, seu inibidor, nesse tratamento. Na presença de rotenona a participação da via COX foi de aproximadamente 93%, contra apenas 7% da participação da AOX (Figura 4). A inibição do CI interferiu na participação das duas oxidases terminais, diminuindo a participação da via AOX e aumentando a participação da via COX. A participação da AOX foi 30% menor do que quando não estava presente no meio a rotenona (Figura 4).



**Figura 4:** Taxa de consumo total de O<sub>2</sub> (RT), consumo de O<sub>2</sub> da AOX (respiração resistente a KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>) e consumo de O<sub>2</sub> da COX (respiração resistente ao SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup>) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', utilizando NADH 8 mmoles.L<sup>-1</sup> como substrato respiratório acrescido de rotenona 4 mmoles.L<sup>-1</sup> como inibidor do CI. As barras representam a média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi avaliado também, o efeito da aplicação de DPI no meio de reação juntamente com o NADH. Os resultados obtidos demonstraram que o consumo total de O<sub>2</sub> foi de 60,8 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> quando estava presente o DPI (Figura 5), valor este diferente dos 77,9 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> na presença apenas de NADH (Figura 3). Na presença de DPI verifica-se uma alteração na participação da COX no consumo de O<sub>2</sub> na comparação com a condição onde estava presente apenas o NADH, sendo a mesma de aproximadamente 75%, enquanto a participação da via AOX foi de 25% (Figura 5). A inibição da GAILDH favoreceu o aumento na participação da AOX, que saiu de 7% para 25% depois da aplicação do DPI no meio de reação.

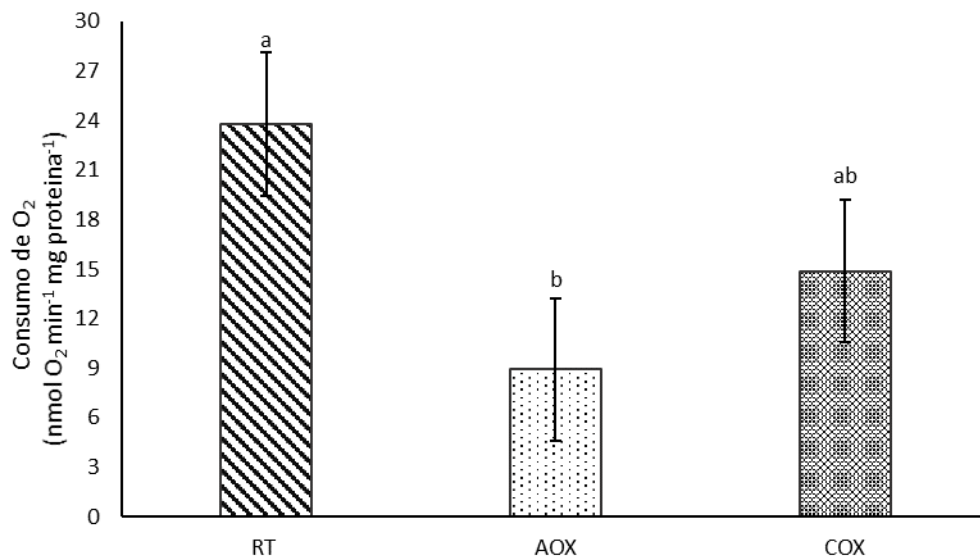


**Figura 5:** Taxa de consumo total de O<sub>2</sub> (RT), consumo de O<sub>2</sub> da AOX (respiração resistente a KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>) e consumo de O<sub>2</sub> da COX (respiração resistente ao SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup>) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão ‘Golden’, utilizando NADH 8 mmoles.L<sup>-1</sup> como substrato respiratório acrescido de DPI 2 mmoles.L<sup>-1</sup> como inibidor da atividade da GalLDH. As barras representam a média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Sendo assim, tais resultados confirmariam a hipótese de Schimmeyer et al. (2016) de que a GalLDH seria uma enzima de dupla função na célula e com Rodríguez-Ruiz et al. (2017), que sugeriram que a enzima interage com as vias oxidases respiratórias. Alhag Dow et al. (2007) demonstraram que o silenciamento do gene que codifica a GalLDH em tomate (*Solanum lycopersicum*) não alterou a concentração de AA, mas influenciou no crescimento das plantas e frutos. Os autores concluíram que a GalLDH além de sintetizar AA, teria papel importante na regulação de processos relacionados ao crescimento celular nas plantas. Portanto, com a GalLDH inibida pelo DPI, a via AOX intensificou sua atividade no papel de crescimento das plantas, já que uma de suas funções está relacionada com a proteção contra estresse (GÓMEZ et al., 2008; ASGHARI AND AGHDAM, 2010; WANG et al., 2013; PEROTTI et al., 2014). Segundo Vanlerberghe et al. (2020), a AOX tem participação importante na alocação de carbono nas plantas, com efeito no crescimento vegetal, principalmente sob condições de estresse abiótico, sendo considerada um “alvo” para estudos que visam à melhoria na produção agrícola.

Quando foi utilizado o GalL como substrato respiratório, a taxa de consumo total de O<sub>2</sub> foi de 23,8 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, enquanto o consumo

de  $O_2$  da AOX e COX foi de  $8,9 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$  e  $14,8 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ , respectivamente (Figura 6), aproximadamente três vezes menor que aquela verificada quando se utilizou NADH como substrato respiratório (Figura 3). O GalL pode ser considerado um substrato respiratório, uma vez que o mesmo ao ser oxidado pela GalLDH para formar AA necessariamente contribui com a redução de Cit c que, por consequência, irá doar estes elétrons à COX (ÔBA et al., 1995; SZARKA et al., 2013).



**Figura 6:** Taxa de consumo total de  $O_2$  (RT), consumo de  $O_2$  da AOX (respiração resistente a  $KN_3$   $3 \text{ mmoles.L}^{-1}$ ) e consumo de  $O_2$  da COX (respiração resistente ao SHAM  $4 \text{ mmoles.L}^{-1}$ ) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', utilizando GalL  $5 \text{ mmoles.L}^{-1}$  como substrato respiratório. As barras representam a média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Apesar de diminuir a taxa de consumo total de  $O_2$  no extrato mitocondrial, a utilização de GalL como substrato respiratório aumentou significativamente a participação da AOX no consumo de  $O_2$ , passando de 10% quando foi utilizado o NADH (Figura 3) como único substrato para 37% (Figura 6). Segundo Souza et al. (2014) e Oliveira et al. (2015), estudos indicaram participação evidente da via AOX em frutos climatéricos mostrando como ela pode aumentar sua atividade conforme esses órgãos se aproximam da senescência. A respiração total foi estatisticamente semelhante a COX, porém não foi semelhante a AOX em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Entretanto, como se pode visualizar na figura



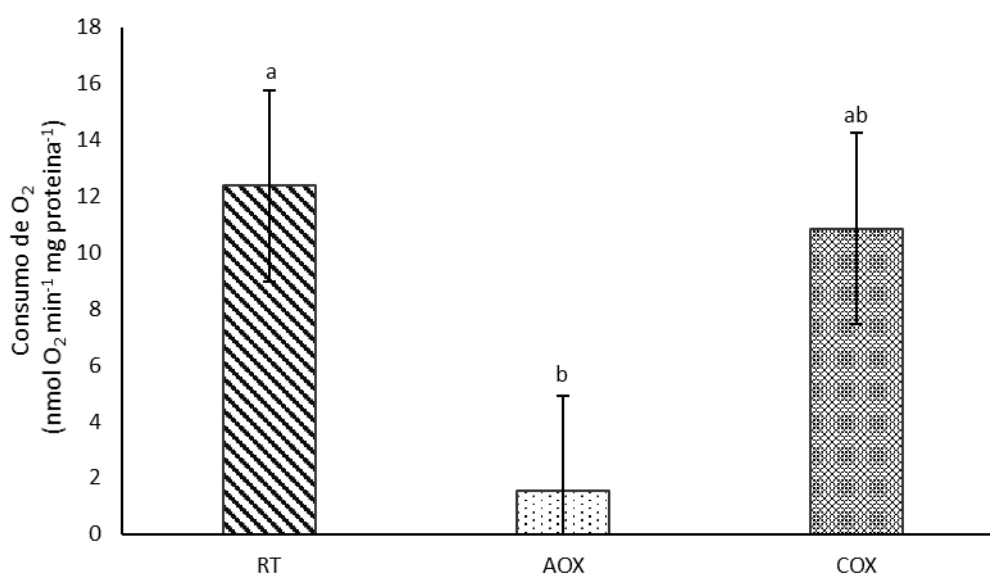
6, COX e AOX não apresentam diferença estatística em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Algumas funções da AOX já foram detectadas durante a fase de amadurecimento, funções essas que podem explicar sua maior atividade e participação no consumo de O<sub>2</sub>. A via AOX pode servir como controladora da respiração levando ao climatério, ou até mesmo controlando o consumo de O<sub>2</sub>. Ela também pode favorecer a senescência em algumas espécies e causa uma influência positiva no sistema II da biossíntese do etileno, reduzindo a vida útil destes órgãos depois da colheita (GÓMEZ et al., 2008; ASGHARI AND AGHDAM, 2010; WANG et al., 2013; PEROTTI et al., 2014), o que pode explicar a maior participação dessa via.

De acordo com os resultados apresentados, a taxa respiratória total utilizando o Gall como substrato, não diferiu estatisticamente na presença de KN<sub>3</sub>, bloqueador da COX; porém na presença de SHAM, bloqueador da AOX, foi diferente ( $P < 0,05$ ) (Figura 6). A inclusão do DPI no meio de reação contendo apenas Gall como substrato respiratório mostrou redução expressiva na taxa respiratória das mitocôndrias isoladas. O consumo total de O<sub>2</sub> foi de 12,4 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> (Figura 7), aproximadamente metade do que foi registrado (23,8 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>) pelas mitocôndrias consumindo Gall na ausência de DPI (Figura 6).

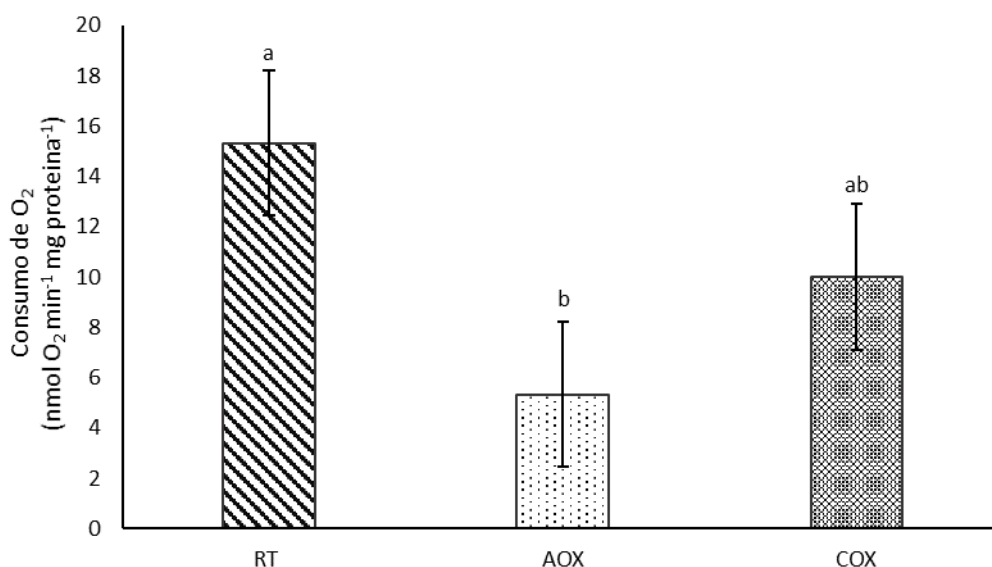
A presença de DPI no meio de reação alterou a participação da AOX e da COX no consumo de O<sub>2</sub> das mitocôndrias, se comparado com o registrado na ausência deste. Foram verificados na presença de DPI os valores do consumo de O<sub>2</sub> das vias terminais AOX e COX, 1,5 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> e 10,8 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 7). O consumo de O<sub>2</sub> das vias AOX e COX na ausência de DPI foi maior, sendo 8,9 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> e 14,8 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 6). O DPI é um inibidor de flavoenzimas (O'DONNELL et al., 1994; YOKAWA et al., 2016), usado para inibir a enzima GalLDH, que possui um grupo flavina em sua estrutura (LEFERINK et al., 2008b). Assim, haverá menor oxidação do Gall para a redução de Cit c e consequentemente menor entrada de elétrons na CTE<sub>m</sub> e queda no consumo total de O<sub>2</sub> (Figura 7). Segundo Ôba et al. (1995) e Bartoli et al. (2005), a participação do Cit c é fundamental para a atividade da GalLDH, quando o Cit c recebe elétrons transferidos diretamente da GalLDH, para depois reduzir a COX e

assim ela possa reduzir o  $O_2$  a  $H_2O$ . Assim como mencionado em relação aos dados da respiração na presença de GalL como substrato respiratório (Figura 6), a adição de DPI no meio de reação não mudou a proporção na participação das vias AOX e COX (Figura 7). A respiração total não diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) à COX, mas diferente ( $P < 0,05$ ) da AOX. Por outro lado, a participação da COX não diferiu ( $P < 0,05$ ) à da AOX.



**Figura 7:** Taxa de consumo total de  $O_2$  (RT), consumo de  $O_2$  da AOX (respiração resistente a  $KN_3$  3 mmoles.L $^{-1}$ ) e consumo de  $O_2$  da COX (respiração resistente ao SHAM 4 mmoles.L $^{-1}$ ) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', utilizando GalL 5 mmoles.L $^{-1}$  como substrato respiratório e DPI 2 mmoles.L $^{-1}$  como inibidor da atividade da GalLDH. As barras representam a média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

As medidas da taxa respiratória quando havia GalL como substrato respiratório e na presença do inibidor rotenona também representaram decréscimo se comparado ao meio com GalL apenas, sendo registrado consumo total de  $O_2$  de 15,3 nmol  $O_2$  min $^{-1}$  mg proteína $^{-1}$ . O consumo de  $O_2$  pela COX e pela via AOX foi de 10 nmol  $O_2$  min $^{-1}$  mg proteína $^{-1}$  e de 5,3 nmol  $O_2$  min $^{-1}$  mg proteína $^{-1}$ , respectivamente. Silva (2016) verificou que a atividade da GalLDH é influenciada não apenas pela adição de seu inibidor direto, mas também pela adição de alguns inibidores dos complexos da CTE<sub>m</sub>, sendo mencionada a rotenona entre eles. A participação da COX foi semelhante ( $P < 0,05$ ) à da AOX e da respiração total. Entretanto, a participação da AOX é menor ( $P < 0,05$ ) à da respiração total (Figura 8).

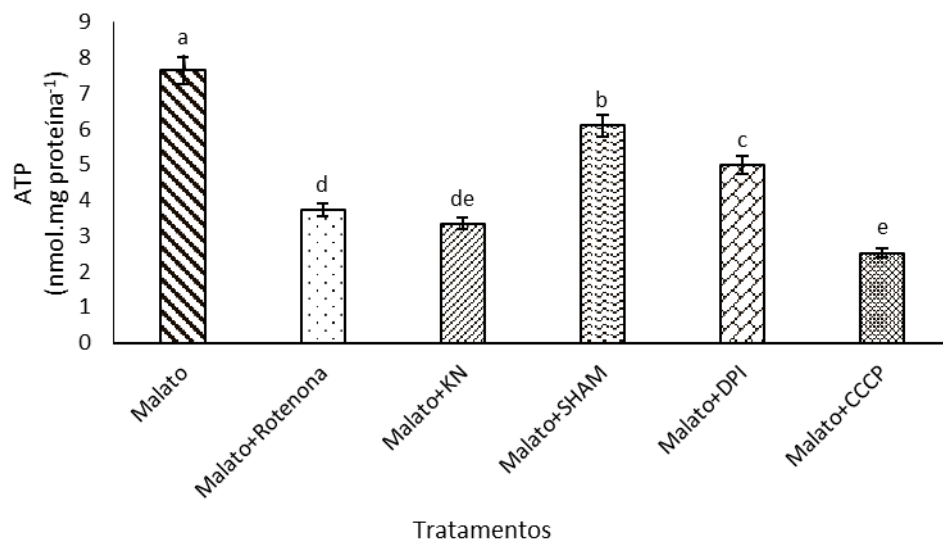


**Figura 8:** Taxa de consumo total de O<sub>2</sub> (RT), consumo de O<sub>2</sub> da AOX (respiração resistente a KN<sub>3</sub> 3 mmoles.L<sup>-1</sup>) e consumo de O<sub>2</sub> da COX (respiração resistente ao SHAM 4 mmoles.L<sup>-1</sup>) em mitocôndrias purificadas de polpa de mamão 'Golden', utilizando GalL 5 mmoles.L<sup>-1</sup> como substrato respiratório acrescido de rotenona 4 mmoles.L<sup>-1</sup> como inibidor do CI. As barras representam a média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O tratamento com malato foi o que mais proporcionou a síntese de ATP, devido ao fato de ser um substrato que introduz elétrons na CTE<sub>m</sub> a partir do CI. Portanto, quando utilizado como substrato respiratório, além de alimentar a CTE<sub>m</sub> com o fluxo de elétrons, haverá paralelamente o transporte de H<sup>+</sup>, sendo transportados no total dez H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, uma vez que todos os elétrons da CTE<sub>m</sub> sejam usados pela COX (MILLAR et al., 2011; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015). Sabe-se que a capacidade fosforilativa, razão ADP:O, teórica para a completa oxidação do malato na CTE<sub>m</sub> é de 2,4 ATP, considerando que todas as vias alternativas estejam inibidas (TAIZ et al., 2017).

Com a oxidação do malato, o fluxo de elétrons via CI será transferido até a UQ que os encaminhará parte para a AOX, e parte para a COX, neste caso, antes passando pelo CIII, sendo utilizados estes elétrons (tanto na AOX, como na COX) para a redução do O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O (MAILLOUX e HARPER, 2011; JONES et al., 2017).

Devido ao fluxo de elétrons passar por todos os transportadores da CTEM que estão acoplados com o transporte de  $H^+$  para a matriz mitocondrial, a oxidação de substrato como o malato, tem um alto potencial de geração de ATP. Esse tratamento em teoria é o de maior capacidade para a síntese de ATP, já que o fluxo de elétrons está ocorrendo normalmente passando por todos os complexos que transferem  $H^+$ . Isso pode ser confirmado pelos resultados obtidos e apresentados na Figura 9, onde o tratamento com malato foi o que mostrou maior produção de ATP em 5% de probabilidade pelo teste Tukey.



**Figura 9.** Capacidade de síntese de ATP em mitocôndrias isoladas de polpa de mamão avaliada a partir da adição de ADP  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  na presença de malato  $10 \text{mmol.L}^{-1}$  (em todos os ensaios) como substratos respiratórios e em função da adição de rotenona  $4 \text{mmol.L}^{-1}$  (inibidor do complexo I),  $\text{KN}_3$   $3 \text{mmol.L}^{-1}$  (inibidor da COX), SHAM  $4 \text{mmol.L}^{-1}$  (inibidor da AOX), DPI  $2 \text{mmol.L}^{-1}$  (inibidor da GalDH) e CCCP  $100 \text{mmol.L}^{-1}$  (desacoplador mitocondrial). As barras representam a média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ao inibir o CI, com a adição de rotenona ao meio, a síntese de ATP caiu praticamente pela metade (Figura 9). Porém, mesmo assim, houve a produção de ATP, o que pode significar que o malato foi utilizado como substrato pelas NADH desidrogenase alternativas. Essas NADH desidrogenase irão oxidar o malato e transferir elétrons para a UQ (TAIZ et al., 2017). O fato de a síntese de ATP ter diminuído, é devido à inibição do CI que deixou de transferir quatro  $H^+$  para o espaço intermembranar, reduzindo assim o  $\Delta\Psi$  e a síntese de ATP.

Similar ao resultado obtido com a inibição do CI ocorreu quando foi inibido o CIV com a adição de  $\text{KN}_3$  ao meio contendo o extrato de mitocôndrias. Por esse complexo estar inibido, ele deixará de transferir  $\text{H}^+$  de um lado para o outro da CTE<sub>m</sub> e também interromperá o fluxo de elétrons provenientes de Cit c. Assim, além de não transferir  $\text{H}^+$  no CIV, também irá cessar o transporte de  $\text{H}^+$  pelo CIII, diminuindo assim a eficiência da CTE<sub>m</sub>. Neste caso, a única via que está com fluxo de elétrons na CTE<sub>m</sub> é a via AOX, pois o Cit c estará reduzido interrompendo o fluxo contínuo de elétrons por aquela via.

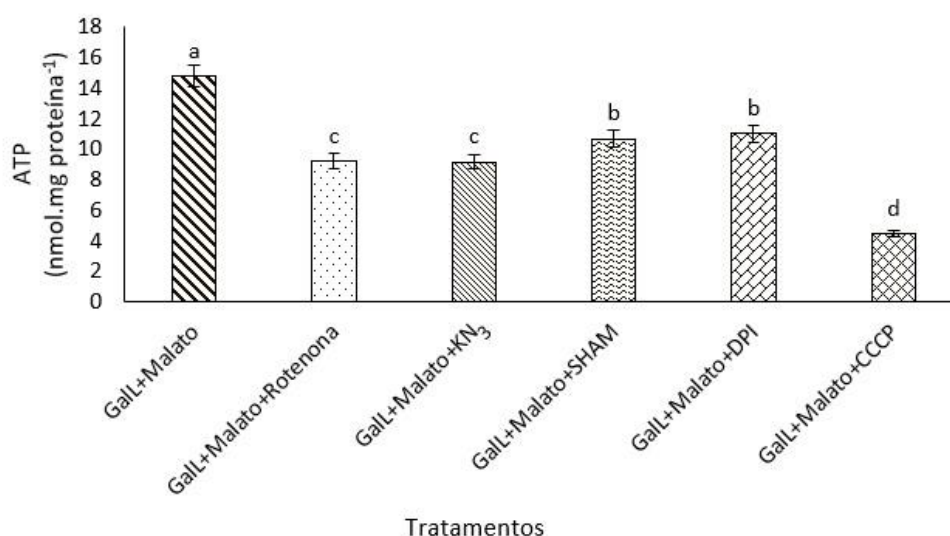
Com a inibição da AOX, ocorreu pequena redução na síntese de ATP se comparado ao meio que continha apenas malato. Ao inibir apenas a AOX os complexos que transferem  $\text{H}^+$  ainda continuam ativos, por isso ocorreu síntese significativa de ATP. A inibição da GalLDH, com a adição de DPI também provocou decréscimo na síntese de ATP (Figura 9). Apesar da GalLDH, a princípio, não estar participando da transferência de elétrons, pois não houve adição de substrato oxidável pela mesma (no caso, o GalL), muitos autores defendem que para um bom funcionamento do CI, a GalLDH deve estar ativa, sendo capaz de oxidar substratos (PINEAU et al., 2008; MAJED, 2016). Então, estando a mesma inibida, provavelmente houve redução na eficiência do CI, reduzindo o fluxo de elétrons pela CTE<sub>m</sub>, a transferência de  $\text{H}^+$  e, por consequência, a síntese de ATP.

Com a adição de CCCP a síntese de ATP caiu drasticamente (Figura 9). O CCCP agindo como um desacoplador mitocondrial tornou a membrana interna da mitocôndria permeável para  $\text{H}^+$  que estariam no espaço intermembranar. Assim, diminuindo o  $\Delta\mu\text{H}^+$  e a síntese de ATP (TAIZ et al., 2017).

Quando foi acrescentado GalL como substrato respiratório, juntamente com o malato, a síntese de ATP foi maior que quando estava presente apenas malato (Figura 10). Na presença de GalL e malato, a síntese de ATP praticamente duplicou, independente da presença dos inibidores adicionados ao meio. Estes resultados confirmam o que foi descrito anteriormente, que o funcionamento da GalLDH é imprescindível para o bom funcionamento do CI e, portanto, favorece o fluxo de elétrons provenientes do CI (PINEAU et al., 2008; MAJED, 2016). Assim, como o estímulo à atividade do CI e da GalLDH, a síntese de ATP duplicou em todos os tratamentos, assim como também se observou que o efeito dos

inibidores e do desacoplador de membrana (CCCP), teve a mesma resposta observada na ausência de Gall (Figura 9).

A inibição da AOX ou da GalLDH reduziu a produção de ATP pelo extrato mitocondrial na mesma proporção, não sendo verificado diferença ( $P < 0,05$ ) entre estes dois tratamentos (Figura 10). Cabe ressaltar que a precisão experimental das análises pode ser considerada satisfatória, pois foi encontrado coeficiente de variação de 10%. Também foi verificado que a inibição do CI e da COX não diferiu entre si ( $P < 0,05$ ), mas resultou em menor ( $P < 0,05$ ) produção de ATP em relação ao meio onde foram inibidos a AOX e a GalLDH e menor ainda ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle (na presença apenas dos substratos, Gall e malato) (Figura 10).



**Figura 10.** Capacidade de síntese de ATP em mitocôndrias isoladas de polpa de mamão avaliada a partir da adição de ADP  $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$  na presença de malato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$  (em todos os ensaios) e Gall  $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  como substratos respiratórios e em função da adição de rotenona  $4 \text{ mmol.L}^{-1}$  (inibidor do complexo I),  $\text{KN}_3$   $3 \text{ mmol.L}^{-1}$  (inibidor da COX), SHAM  $4 \text{ mmol.L}^{-1}$  (inibidor da AOX), DPI  $2 \text{ mmol.L}^{-1}$  (inibidor da GalLDH) e CCCP  $100 \text{ mmol.L}^{-1}$  (desacoplador mitocondrial). As barras representam a média com o erro padrão e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Na Tabela 1 pode-se observar os resultados do  $\Delta\Psi$  em resposta à aplicação de inibidores e um desacoplador em extrato mitocondrial em função do substrato utilizado. Inicialmente no meio há apenas mitocôndrias purificadas em meio de reação e a safranina utilizada para a medição do  $\Delta\Psi$ , nesta condição a mitocôndria está em estado basal, sendo mínimo o  $\Delta\Psi$  registrado. Com a adição

dos substratos, individualmente por tratamento, observa-se a formação do  $\Delta\Psi$ , sendo este maior quando foi usado NADH em comparação ao meio contendo GalL (Tabela 1). Isso se deve ao local de oxidação dos substratos na CTE<sub>m</sub>, o que favorece a formação do  $\Delta\Psi$  quando é utilizado o NADH que introduz elétrons na CTE<sub>m</sub> a partir do CI, diferentemente da oxidação do GalL que introduz elétrons, via GalLDH, a partir do Cit c, ou seja, contribuindo menos para a formação do  $\Delta\Psi$ . O CI é responsável por oxidar o NADH e nessa oxidação ele transfere diretamente H<sup>+</sup> da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, contribuindo com a formação do potencial de membrana por essa transferência de H<sup>+</sup>. Depois disso, esses elétrons serão transportados dentro da CTE<sub>m</sub> e passarão por outros complexos. Estes também transferem H<sup>+</sup> da matriz para o espaço intermembranar, sendo eles, o CIII transferindo quatro H<sup>+</sup> (MILLAR et al., 2011; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015) e a COX que transfere mais dois H<sup>+</sup> (RODRÍGUEZ ROLDÁN et al., 2006; YOSHIKAWA e SHIMADA, 2015) totalizando dez H<sup>+</sup> na oxidação do NADH.

Tabela 1. Valores médios do potencial elétrico de membrana ( $\Delta\Psi$ ) em mitocôndrias isoladas de polpa de mamão 'Golden'. Utilizando NADH 8 mmol.L<sup>-1</sup> e GalL 5 mmol.L<sup>-1</sup> como substratos respiratórios. Na presença de KN<sub>3</sub> 3 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor da COX), SHAM 4 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor da AOX) e CCCP 100 mmol.L<sup>-1</sup> (desacoplador mitocondrial). Os valores foram representados em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF)

Tratamentos	$\Delta\Psi$ (UAF)/substrato	
	NADH	GalL
Mitocôndria	3,1517 fA	3,3151 dA
Substrato NADH ou GalL	1,9773 bA	2,7942 aB
ADP	2,8961 eA	3,3037 cdA
SHAM	2,1351 cA	3,0178 bB
KN <sub>3</sub>	2,8061 dA	3,2427 cA
SHAM+KN <sub>3</sub>	1,8906 aA	2,9951 bB
CCCP	3,1643 fA	3,3387 dA

A medida de fluorescência é inversamente proporcional à geração do potencial de membrana. Ou seja, a letra "a" representa o menor valor de fluorescência e, portanto, o maior potencial de membrana. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não difere entre si, pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

Para deixar claro, na presença de NADH como substrato respiratório os tratamentos que resultaram em maior potencial de membrana foram, em ordem decrescente, SHAM+KN<sub>3</sub> > NADH > SHAM > KN<sub>3</sub> > ADP > CCCP. Já quando foi utilizado apenas GalL como substrato, os tratamentos que produziram maior potencial de membrana foram, em ordem decrescente, GalL > SHAM+KN<sub>3</sub> = SHAM > KN<sub>3</sub> = ADP. O potencial de membrana no tratamento com ADP foi igual ao do tratamento com CCCP, mas entre os tratamentos com KN<sub>3</sub> e CCCP, esse último foi o que resultou em menor potencial de membrana.

A utilização de ADP tanto na presença de NADH quanto para GalL, resultou na redução do  $\Delta\Psi$  (Tabela 1). Na presença de GalL o  $\Delta\Psi$  resultante foi semelhante ( $P < 0,05$ ) àquele verificado na mitocôndria em seu estado basal, antes da adição do substrato. Isto se deve provavelmente à disponibilidade de prótons para a síntese de ATP ser bem menor, pois somente um complexo está transferindo esses H<sup>+</sup>, como citado anteriormente. Já com NADH, a adição de ADP também desfez o  $\Delta\Psi$ , porém a ação dele foi menor do que na presença de GalL. Então, aparentemente, pela quantidade adicionada de ADP, a quantidade de H<sup>+</sup> disponível foi mais que o suficiente para a síntese de ATP (AKERMAN E WIKSTRÖM, 1976). E, assim, possivelmente nem todos os H<sup>+</sup> do espaço intermembranar foram utilizados, por isso o  $\Delta\Psi$  não se desfez completamente.

Com a inibição da AOX a formação do  $\Delta\Psi$  na presença de GalL foi um pouco menor se comparado ao  $\Delta\Psi$  verificado quando estava sendo utilizado o NADH como substrato (Tabela 1). Isso confirma que quanto mais componentes da CTE<sub>m</sub> transportando elétrons, maior a capacidade de formação do  $\Delta\Psi$ . Em se tratando da formação do  $\Delta\Psi$ , quanto maior a participação dos complexos transportadores de H<sup>+</sup>, sendo eles CI, CIII e COX, em sintonia com os demais componentes da CTE<sub>m</sub>, maior será o  $\Delta\Psi$  formado (RODRÍGUEZ ROLDÁN et al., 2006; MILLAR et al., 2011; SAREWICZ e OSYCZKA, 2015; YOSHIKAWA e SHIMADA, 2015). Então, quando um destes componentes da CTE<sub>m</sub> é inibido, nesse caso a AOX, o fluxo de elétrons não será o mesmo, assim como a formação do  $\Delta\Psi$ . A inibição da AOX restringiu o fluxo de elétrons apenas para a via COX. Isso causou menor velocidade no fluxo de elétrons na CTE<sub>m</sub> e maior redução da UQ, diminuindo a geração do  $\Delta\Psi$ . Ao utilizar GalL, a formação do  $\Delta\Psi$  que já era menor, foi ainda mais afetada com a inibição da AOX (Tabela 1). Isto



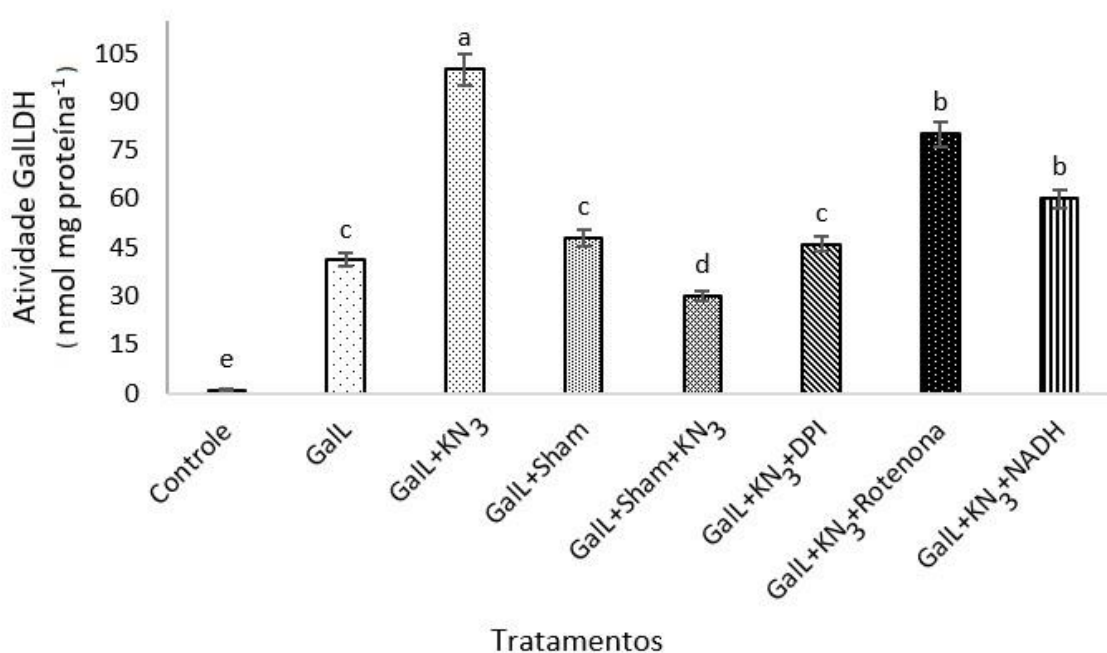
se deve à menor atividade GalLDH devido ao fluxo de elétrons estar todo na via COX, aumentando a redução de Cit c, que precisa estar oxidado para poder permitir a oxidação da GalL via GalLDH (Millar et al., 2003). Santana (2019) encontrou resultados que mostram que a presença de SHAM diminui a atividade GalLDH, o que poderia explicar o fato desse tratamento com SHAM, não ter gerado  $\Delta\Psi$ .

Na presença de NADH, a inibição da COX não inibiu completamente a geração de  $\Delta\Psi$  já que os complexos I e III permaneceram ativos. Entretanto, o CIII não terá como se oxidar, uma vez que estando a COX inibida, não há como reoxidar Cit c, necessário para manter o fluxo de elétrons pelo CIII. Nesta situação, o  $\Delta\Psi$  estará sendo formado apenas pela atividade do CI, o que explica o menor  $\Delta\Psi$  verificado na presença de  $\text{KN}_3$  (Tabela 1). Em contrapartida, quando estava presente GalL, a inibição da COX inibiu a formação do  $\Delta\Psi$  (Tabela 1). Neste caso, como não havia estímulo à atividade do CI, como no caso anterior onde foi usado NADH e com a COX inibida, não há bombeamento de  $\text{H}^+$  para a formação do  $\Delta\Psi$ . Além disso, não havendo a reoxidação de Cit c, não há atividade GalLDH, não havendo a oxidação da GalL, também, não ocorrendo a formação do  $\Delta\Psi$ . Com a inibição da AOX e COX em conjunto, verificou-se uma significativa formação do  $\Delta\Psi$  na presença de NADH, maior ( $P < 0,05$ ) inclusive daquele verificado quando havia no meio apenas NADH e nenhum inibidor das oxidases terminais (Tabela 1).

Por último, com a adição de CCCP tanto na presença de NADH, como GalL, não ocorreu a formação do  $\Delta\Psi$ , sendo os resultados de  $\Delta\Psi$  semelhantes ( $P < 0,05$ ) ao verificado quando a mitocôndria estava em seu estado basal, sem a adição de nenhum substrato e, ou inibidor (Tabela 1). Não é possível formar um  $\Delta\Psi$  quando essa membrana que separa o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial está desacoplada. Ou seja, de acordo com a Tabela 1 a aplicação do CCCP, dissipou o  $\Delta\Psi$  das mitocôndrias energizadas com NADH e GalL.

Avaliando a atividade da GalLDH, foi observado que quando a AOX foi inibida, a atividade da GalLDH foi menor ( $P < 0,05$ ) mesmo se comparado ao meio onde a COX estava inibida (Figura 11). Enquanto a inibição da COX intensificou ( $P < 0,05$ ) a atividade GalLDH, este efeito é revertido, quando a AOX está inibida, diminuindo ( $P < 0,05$ ) a atividade GalLDH (Figura 11). Silva (2016) estudou

mitocôndrias isoladas de mamão, morango e tomate e também verificou redução na atividade da enzima GalLDH ao inibir a AOX com SHAM. Também foi verificada uma redução ( $P < 0,05$ ) na atividade GalLDH quando foi adicionada ao meio DPI. Mesmo assim, pode-se observar que a inibição da GalLDH não foi completa, sendo registrado atividade de pelo menos 50% da atividade do tratamento contendo Gall+KN<sub>3</sub>, quando se registrou a maior atividade GalLDH (Figura 11).

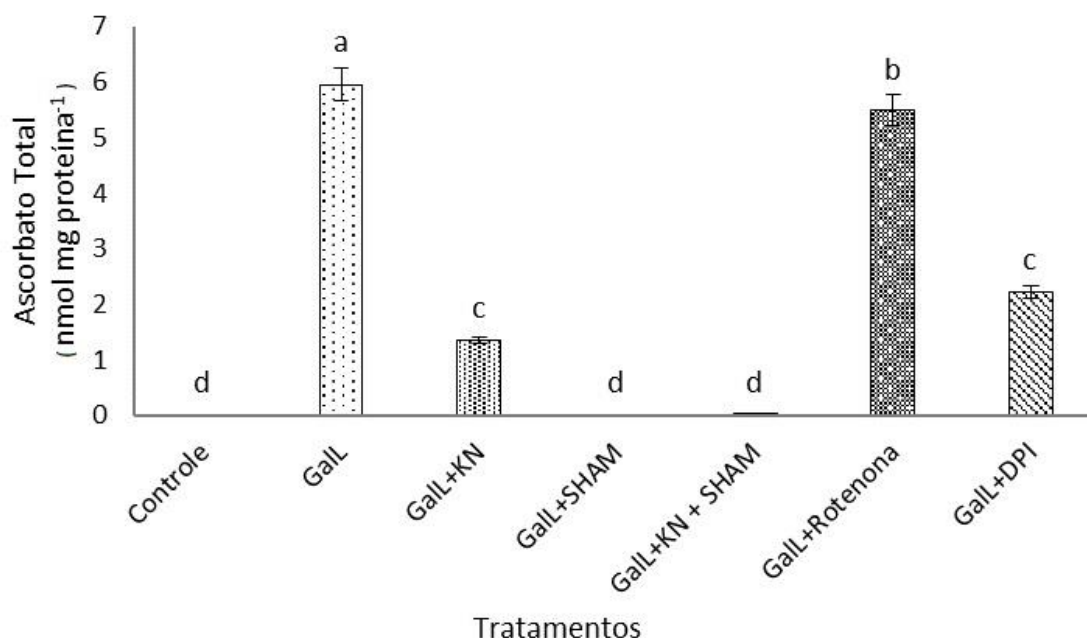


**Figura 11.** Atividade GalLDH avaliada a partir da redução de Cit c em mitocôndrias isoladas de polpa de mamão 'Golden', na presença de KN<sub>3</sub> (inibidor da COX) para manter a redução de Cit c. Foi montado um ensaio Controle (contendo apenas mitocôndrias isoladas e meio de reação). Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram Gall 5 mmol.L<sup>-1</sup> (substrato da GalLDH), rotenona 4 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor do complexo I), DPI 2 mmol.L<sup>-1</sup> (como inibidor da atividade da GalLDH), NADH 8 mmol.L<sup>-1</sup> (substrato do complexo I), SHAM 4 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor da via AOX) e KN<sub>3</sub> 3 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor da via COX). As barras representam a média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O estímulo da atividade GalLDH com a inibição da COX foi devido ao direcionamento do fluxo de elétrons da oxidação do Gall para a GalLDH e não ocorrendo o envio destes para a COX, sendo verificado a maior atividade em GalLDH (Figura 11). Com a adição de rotenona e NADH, ocorreu uma queda estatisticamente significativa se comparado ao ensaio contendo Gall+KN<sub>3</sub>.

Segundo Szarka et al. (2013), a atividade da GalLDH será regulada pela trânsito de elétrons proveniente do CI, que necessita de Cit c em sua forma oxidada para receber esses elétrons. A AOX estará ativamente reduzindo o fluxo intenso de energia, o que impedirá que Cit c fique super reduzida, e possa então receber elétrons da GalLDH (VANLERBERGHE et al., 2009). Isso explica o fato de a atividade da GalLDH ser maior na presença de Gall+KN<sub>3</sub> do que de todos os outros ensaios testados neste trabalho.

O primeiro ensaio contendo apenas extrato mitocondrial isolado não mostrou produção de AA (Figura 12). No meio em que foi adicionado Gall, verificou-se aumento significativo na atividade da GalLDH (Figura 11), assim como na produção de AA que registrou valor de 5,9 nmol de AA. mg proteína<sup>-1</sup> (Figura 12). Trabalhos com folhas de tomate inoculadas com *Botrytis cinerea* mostraram correlação positiva entre a concentração de AA mitocondrial e a atividade da GalLDH (KUZNIAK e SKLODOWSKA, 2004). Ao estudar batatas fatiadas, Oba et al. (1994) verificaram que ao estimular a enzima GalLDH ocorreu assim o aumento na produção de AA.



**Figura 12.** Produção de AA via GalLDH em 'Golden'. Utilizado um controle contendo apenas extrato de mitocôndrias purificado. Foi montado um ensaio Controle (contendo apenas mitocôndrias isoladas e meio de reação). Os substratos e inibidores utilizados neste teste foram Gall 5 mmol.L<sup>-1</sup> (substrato da GalLDH), SHAM 4 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor da via AOX), KN<sub>3</sub> 3 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor da via COX), rotenona 4 mmol.L<sup>-1</sup> (inibidor do complexo I) e DPI 2 mmol.L<sup>-1</sup> (como inibidor da atividade da GalLDH). As barras representam a

média com o erro padrão, e as letras a diferença estatística das médias em 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Com a adição de  $\text{KN}_3$  no meio de reação pode-se observar uma redução significativa na produção de AA. Nesta condição foi registrada taxa de 1,35 nmol de AA  $\text{mg proteína}^{-1}$ , valor este menor ( $P < 0,05$ ) que o verificado quando estava presente no meio apenas Gall, ou quando no meio estava presente rotenona (Figura 12). Após a adição de DPI pode-se observar a queda na produção de AA, diferindo significativamente do tratamento com Gall. Tabata et al. (2001) verificaram a redução na produção de AA em tabaco com a inibição da atividade da GalLDH. Apesar do DPI agir como inibidor da GalLDH, ainda foi possível verificar uma produção de 2,22 nmol de AA.  $\text{mg proteína}^{-1}$  (Figura 12).

Em outra avaliação, quando foi adicionado SHAM ao meio, a produção de AA foi totalmente inibida. A inibição da AOX isoladamente ou em conjunto com a inibição da COX, inibiu completamente a produção de AA. Ao que tudo indica este efeito inibitório completo na produção de AA se deve especificamente à presença de SHAM. Visto que a adição isolada de  $\text{KN}_3$  não foi capaz de bloquear totalmente a produção de AA, como verificado com a adição isolada de SHAM (Figura 12). O que indica que a atividade AOX parece ser essencial, de alguma forma, para a produção de AA nas mitocôndrias isoladas. Bartoli et al. (2009) e Gallie (2013) afirmam que existem muitos fatores externos e internos que influenciam na atividade da GalLDH e consequentemente na produção de AA. Neste trabalho foram verificadas evidências da conexão entre a atividade GalLDH e o fluxo de elétrons na CTE<sub>m</sub>, em que a biossíntese de AA pode ser modulada com a inibição ou estimulação dos componentes da CTE<sub>m</sub>.

Ao caracterizar a GalLDH em frutos de pimenta, Rodríguez-Ruiz et al. (2017), indicaram que essa enzima possuía um domínio transmembranar (Tyr46-Pro65) permitindo a interação da enzima com outras vias oxidases respiratórias. Isto pode explicar o que foi observado neste trabalho quando se inibiu a participação da AOX e essa inibição resultou na redução significativa na biossíntese de AA (Figura 12) e na atividade de GalLDH (Figura 11). De acordo com Silva (2016), inibindo a participação da AOX em mitocôndrias isoladas de polpa do mamão 'Golden', foi possível observar a redução na produção de AA e na atividade da GalLDH, resultados esses, que foram semelhantes aos apresentados aqui. Pela observação dos dados obtidos, a participação da via

AOX é de extrema importância para a sustentação da biossíntese de AA e da atividade da GalLDH.

Segundo Mittler (2017), existem mecanismos capazes de defender as células contra as ERO, podendo esses mecanismos antioxidantes ser enzimáticos e não enzimáticos. Tais mecanismos são responsáveis por manter baixo os níveis de ERO de forma a não prejudicar a atividade celular. De acordo com Zsigmond et al. (2011), o aumento na síntese de AA a partir do aumento na atividade de GalLDH, auxilia na proteção à integridade da membrana mitocondrial e na regulação do processo respiratório. Assim sendo, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, nos tratamentos com DPI ocorreu uma produção menor de AA, provavelmente, devido à GalLDH estar inativa.

## 6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir a partir dos resultados apresentados a influência da atividade da GalLDH na geração do  $\Delta\Psi$ . A atividade GalLDH é fundamental para o bom funcionamento do CI, sendo isto evidenciado pela capacidade de síntese de ATP que foi praticamente dobrada, quando acrescentado o GalL como substrato.

O estímulo da atividade da GalLDH com o substrato GalL promove o aumento na formação de AA.

A atividade AOX é necessária para manter a atividade da GalLDH, o acúmulo do AA, assim como o  $\Delta\Psi$ .

A utilização de NADH como substrato do CI estimulou mais a geração do  $\Delta\Psi$  se comparado com a utilização do GalL como substrato.

Mais estudos são necessários para responder o que estaria acontecendo, para que a formação do  $\Delta\Psi$  fosse mais significativa com AOX e COX inibidos, do que quando eles não estavam.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSEEVA, M. G., MIRONCHEVA, T. A., MAVLETOVA, D. A., ELIZAROV, S. M., ZAKHAREVICH, N. V., DANILENKO, V. N. (2015) F<sub>0</sub> F<sub>1</sub>-ATP synthase of *Streptomyces fradiae* ATCC 19609: Structural, biochemical, and functional characterization. *Biochemistry*, v. 80, n. 3, p. 296-309.
- AKERMAN, K. E., WIKSTRÖN, M. K. (1976) Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS letters*, v. 68, n. 2, p. 191-197.
- ASGHARI, M., AGHDAM, M. S. (2010) Impact of salicylic acid on post-harvest physiology of horticultural crops. *Trends in food science & technology*, v. 21, n. 10, p. 502-509.
- BARTOLI, C. G., GUIAMET, J. J., KIDDLE, G. U. Y., PASTORI, G. M., DI CAGNO, R., THEODOULOU, F. L., FOYER, C. H. (2005) Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, cell and environment*, v. 28, n. 9, p. 1073-1081.
- BARTOLI, C. G., PASTORI, G. M., FOYER, C. H. (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant physiology*, v. 123, n. 1, p. 335-344.
- BARTOLI, C. G., TAMBUSI, 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*, v. 583, n. 1, p. 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*, v. 57, n. 8, p. 1621-1631.
- 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 and related technologies*, v. 16, n. 14, p. 3113-3122.
- BEZAWORK-GELETA, A., ROHLENA, J., DONG, L., PACAK, K., NEUZIL, J. (2017) Mitochondrial complex II: At the crossroads. *Trends in biochemical sciences*, v. 42, n. 4, p. 312-325.
- BLACKER, T. S., DUCHEN, M. R. (2016) Investigating mitochondrial redox state using NADH and NADPH autofluorescence. *Free radical biology and medicine*, v. 100, p. 53-65.
- BRADFORD, M. M. (1976) Microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248-259.
- BRAND, M. D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochemical society transactions*, v. 33, n. 5, p. 897-904.
- BUCHANAN, B. B., GRUISSEM, W., JONES, R. L. (2015) Membrane structure and membranous organelles. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2. ed. Wiley Blackwell press. p. 2-44.
- BOUILLAUD, F., ALVES-GUERRA, M. C., RICQUIER, D. (2016) UCPs, at the interface between bioenergetics and metabolism. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research*, v. 1863, n. 10, p. 2443-2456.
- BUSIELLO, R. A., SAVARESE, S., LOMBARDI, A. (2015) Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology*, v. 6, p. 36.



- CHOUDHURY, S., PANDA, P., SAHOO, L., PANDA, S. K (2013) Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling and behavior*, v. 8, n. 4, p. 23681.
- DAN DUNN, J., ALVAREZ, L. A., ZHANG, X., SOLDATI, T. (2015) Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox biology*, v. 6, p. 472-485.
- DOURMAP, C., ROQUE, S., MORIN, A., CAUBRIÈRE, D., KERDILES, M., BÉGUIN, K., MOULLEC, J. L. (2019) Stress signalling dynamics of the mitochondrial electron transport chain and oxidative phosphorylation system in higher plants. *Annals of botany*, v. 20, p. 1–16.
- DUTILLEUL, C., GARMIER, M., NOCTOR, G., MATHIEU, C., CHÉTRIT, P., FOYER, C. H., DE PAEPE, R. (2003) Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *The plant cell*, v. 15, p. 1212-1226.
- ERDAL, S., GENISEL, M., TURK, H., DUMLUPINAR, R., DEMIR, Y. (2015) Modulation of alternative oxidase to enhance tolerance against cold stress of chickpea by chemical treatments. *Journal of plant physiology*, v. 175, p. 95-101.
- EUBEL, H., JÄNSCH, L., E BRAUN, H. P. (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant physiology*, v. 133, p. 274-286.
- FATO, R., BERGAMINI, C., BORTOLUS, M., MANIERO, A. L., LEONI, S., OHNISHI, T., LENAZ, G. (2009) Differential effects of mitochondrial complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics*, v. 1787, n. 5, p. 384-392.
- FOYER, C. H. (2017) Ascorbic acid. In: *Ascorbic acid* (ALSCHER, R.G., HESS, J.L., eds.) CRC press. p. 31-58.
- FOYER, C. H. (2018) Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis. *Environmental and experimental botany*, v. 54, p. 134-142.

- GALLIE, D. R. (2013) L-Ascorbic Acid: A multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, v. 27, p. 1–24.
- GODOY, A. E. D., JACOMINO, A. P., CERQUEIRA-PEREIRA, E. C., GUTIERREZ, A. D. S. D., VIEIRA, C. E. M., FORATO, L. A. (2010) Injúrias mecânicas e seus efeitos na qualidade de mamões Golden. *Revista brasileira de fruticultura*, v. 32, p. 682-691.
- GÓMEZ, F., FERNÁNDEZ, L., GERGOFF, G., GUIAMET, J. J., CHAVES, A., BARTOLI, C. G. (2008) Heat shock increases mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and extends postharvest life of spinach leaves. *Postharvest biology and technology*, v. 56, p. 229–234.
- GUERRERO-CASTILLO, S., BAERTLING, F., KOWNATZKI, D., WESSELS, H. J., ARNOLD, S., BRANDT, U., NIJTMANS, L. (2017) The assembly pathway of mitochondrial respiratory chain complex I. *Cell metabolism*, v. 25, n. 1, p. 128-139.
- HAO, M.-S., JENSEN, A. M., BOQUIST, A.-S., LIU, Y.-J., RASMUSSEN, A. G. (2015) The Ca<sup>2+</sup>-regulation of the mitochondrial external NADPH dehydrogenase in plants is controlled by cytosolic pH. *Plus one*, v. 10, p. 9.
- HEINZ, S., FREYBERGER, A., LAWRENZ, B., SCHLADT, L., SCHMUCK, G., ELLINGER-ZIEGELBAUER, H. (2017) Mechanistic investigations of the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation. *Scientific reports*, v. 7, p. 45465.
- HERVÁS, M., BASHIR, Q., LEFERINK, N.G.H., FERREIRA, P., MORENO-BELTRÁN, B. (2013) Communication between L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase and cytochrome c. *The FEBS journal*, v. 280, n. 8, p. 1830-1840.
- HIRST, J. (2013) Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry*, v. 82, p. 551-575.
- HOFHAUS, G., WEISS, H., LEONARD, K. (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *Journal of molecular biology*, v. 221, n. 3, p. 1027-1043.

- HOSSAIN, M. A., MUNNÉ-BOSCH, S., BURRITT, D. J., DIAZ-VIVANCOS, P., FUJITA, M., LORENCE, A. (2017) *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance*. Basel, Switzerland: Springer International Publishing, p. 514.
- Houben, M., Van, P. B. (2019) 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO): The enzyme that makes the plant hormone ethylene. *Frontiers in plant science*, v. 10, p. 695.
- 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*, v. 171, v. 3, p. 1551–1559.
- Isherwood, F. A., Chen, Y. T., Mapson, L. W. (1954) Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. *Biochemical journal*, v. 56, n. 1, p. 1.
- Jones, A. J., Blaza, J. N., Varghese, F., Hirst, J. (2017) Respiratory complex I in *Bos taurus* and *Paracoccus denitrificans* pumps four protons across the membrane for every NADH oxidized. *Journal of biological chemistry*, v. 292, n. 12, p. 4987-4995.
- Kim, J. Y., Kim, M. J., Yi, B., Oh, S., Lee, J. (2015) Antioxidant properties of ascorbic acid in bulk oils at different relative humidity. *Food chemistry*, v. 176, p. 302-307.
- Kolossov, V. L., Beaudoin, J. N., Ponnuraj, N., Diliberto, S. J., Hanafin, W. P., Kenis, P. J., Gaskins, H. R. (2015) Thiol-based antioxidants elicit mitochondrial oxidation via respiratory complex III. *American journal of physiology-cell physiology*, v. 309, n. 2, p. 81-91.
- Kühlbrandt, W. (2015) Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC biology*, v. 13, n. 1, p. 89.
- Kuzniak, E., Skłodowska, M. (2004) The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of experimental botany*, v. 55, p. 605-612.
- 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, tissue and organ culture*, v. 123, n. 1, p. 109-120.
- LAZAROU, M., THORBURN, D. R., RYAN, M. T., MCKENZIE M. (2009) Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research*, v. 1793, n. 1, p. 78-88.
- LEE, S. K., KADER, A. A. (2000) Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest biology and technology*, v. 20, n. 3, p. 207-220.
- LEFERINK, N. G., HEUTS, D. P., FRAAIJE, M. W., VAN BERKEL, W. J. (2008a) The growing VAO flavoprotein family. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 474, n. 2, p. 292-301.
- LEFERINK, N. G., VAN DEN BERG, W. A., VAN BERKEL, W. J. (2008b) Willem JH. L-Galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis. *The FEBS journal*, v. 275, n. 4, p. 713-726.
- LETTIS, J. A., FIEDORCZUK, K., SAZANOV, L. A. (2016) The architecture of respiratory supercomplexes. *Nature*, v. 537, n. 7622, p. 644-648.
- LI, N., RAGHEB, K., LAWLER, G., STURGIS, J., RAJWA, B., MELENDEZ, J. A., ROBINSON, J. P. (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 10, p. 8516-8525.
- MACHER, G., KOEHLER, M., RUPPRECHT, A., KREITER, J., HINTERDORFER, P., POHL, E. E. (2018) Inhibition of mitochondrial UCP1 and UCP3 by purine nucleotides and phosphate. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-biomembranes*, v. 1860, n. 3, p. 664-672.
- MAILLOUX, R. J., HARPER, M. E. (2011) Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free radical biology*. v.51, p.1106-1115.

- MAJED, S. O. (2016) The occurrence of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (L-GalLDH) in L-ascorbate biosynthesis pathway from photosynthetic eukaryotes. *Journal of zankoi sulaimani*, v. 18, n. 3, p. 1-12.
- MANSILLA, N., RACCA, S., GRAS, D. E., GONZALEZ, D. H., WELCHEN, E. (2018) The complexity of mitochondrial complex IV: An update of cytochrome c oxidase biogenesis in plants. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 3, p. 662.
- MANSILLA, N., WELCHEN, E., GONZALEZ, D.H. (2019) *Arabidopsis* SCO proteins oppositely influence cytochrome c oxidase levels and gene expression during salinity stress. *Plant and cell physiology*, v. 60, n. 12, p. 2769-2784.
- MAPSON, L. W., ISHERWOOD, F. A., CHEN, Y. T. (1954) Biological synthesis of L-ascorbic acid: The conversion of L-galactono- $\gamma$ -lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria. *Biochemical journal*, v. 56, n. 1, p. 21.
- 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. (2013) Involvement of brassinosteroids and ethylene in the control of mitochondrial electron transport chain in postharvest papaya fruit. *Theoretical and experimental plant physiology*, v. 25, n. 3, p. 203-212.
- MCGUIRE, R. G. (1992) Reporting of objective color measurements. *HortScience*, v. 27, p. 1254-1255.
- MEYER, E. H., TOMAZ, T., CARROLL, A. J., ESTAVILLO, G., DELANNOY, E., TANZ, S. K., E MILLAR, A. H (2009) Remodeled respiration in *ndufs4* with low phosphorylation efficiency suppresses *Arabidopsis* germination and growth and alters control of metabolism at night. *Plant physiology*, v. 151, p. 603-619.
- MILLAR, A. H., WHELAN, J. SOOLE, K. L., DAY, D. A. (2011) Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual review of plant biology*, v. 62, p. 79-104.
- MILLAR, A. H., MITTOVA, V., KIDDLE, G., HEAZLEWOOD, J. L., BARTOLI, C. G., THEODOULOU, F. L., FOYER, C. H. (2003) Control of ascorbate

- synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant physiology*, v. 133, n. 2, p. 443-44.
- MITTLER, R. (2017) ROS are good. *Trends in plant science*, v. 22, n. 1, p. 11-19.
- MOORE, A. L., SHIBA, T., YOUNG, L., HARADA, S., KITA, K., ITO, K. (2013) Unraveling the heater: New insights into the structure of the alternative oxidase. *Annual review of plant biology*, v. 64, p. 637-663.
- MOOSAVI, B., BERRY, E. A., ZHU, X. L., YANG, W. C., YANG, G. F. (2019) The assembly of succinate dehydrogenase: A key enzyme in bioenergetics. *Cellular and molecular life sciences*, v. 76, p. 4023-4042.
- NSIAH-SEFAA, A., MCKENZIE, M. (2016) Combined defects in oxidative phosphorylation and fatty acid  $\beta$ -oxidation in mitochondrial disease. *Bioscience reports*, v. 36, n. 2, p. 1-19.
- ÔBA, K., ISHIKAWA, S., NISHIKAWA, M., MIZUNO, H., YAMAMOTO, T. (1995) Purification and properties of L-galactono- $\gamma$ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *The journal of biochemistry*, v. 117, n. 1, p. 120-124.
- O'DONNELL, V. B., SMITH, G. C. M., JONES, O. T. G. (1994) Involvement of phenyl radicals in iodonium compound inhibition of flavoenzymes. *Molecular pharmacology*, v. 46, p. 778-85.
- 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*, v. 189, n. 17, p. 42-50.
- PARADISO, A., DE PINTO, M., LOCATO, V., DE GARA, L. (2012) Galactone- $\gamma$ -lactone-dependent ascorbate biosynthesis alters wheat kernel maturation. *Plant biology*, v. 14, n. 4, p. 652-658.
- PEHLIVAN, F. E. (2017) Vitamin C: An antioxidant agent. *Vitamin C*, v. 1, p. 23-35.

- PEROTTI, V. E., MORENO, A. S., PODESTÁ, F. E. (2014) Physiological aspects of fruit ripening: The mitochondrial connection. *Mitochondrion*, v.17, p. 1-6.
- PINEAU, B., LAYOUNE, O., DANON, A., DE PAEPE, R. (2008) L-galactono-1, 4 lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of biological chemistry*, v. 283, p. 32500-32505.
- RAMZAN, R., STANIEK, K., KADENBACH, B., E VOGT, S. (2010) Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-bioenergetics*, v. 1797, p. 1672-1680.
- RITZINGER, C. H. S. P., SOUZA, J. S. (2000) Mamão: Fitossanidade. *Embrapa mandioca e fruticultura*. v. 1, p. 91.
- RODRÍGUEZ-RUIZ, M., MATEOS, R. M., CODESIDO, V., CORPAS, F. J., PALMA, J. M. (2017) Characterization of the galactono-1, 4-lactone dehydrogenase from pepper fruits and its modulation in the ascorbate biosynthesis. Role of nitric oxide. *Redox biology*, v. 12, p. 171-181.
- ROGER, A. J., MUÑOZ-GÓMEZ, S. A., KAMIKAWA, R. (2017) The origin and diversification of mitochondria. *Current biology*, v. 27, n. 21, p. 1177-1192.
- SANTANA, D. B. (2019) *Transporte de elétrons via L-galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLDH) e sua relação com a respiração mitocondrial em frutos*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. p. 83.
- SAREWICZ, M., OSYCZKA, A. (2015) Electronic connection between the quinone and cytochrome C redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling. *Physiological reviews*, v. 95, n. 1, p. 219-243.
- SCHEIBE, R. (2019) Maintaining homeostasis by controlled alternatives for energy distribution in plant cells under changing conditions of supply and demand. *Photosynthesis research* v. 139, p. 81-91.

- SHARMA, L. K., LU, J., BAI, Y. (2009) Mitochondrial respiratory complex I: Structure, function and implication in human diseases. *Current medicinal chemistry*, v. 16, n. 10, p. 1266-1277.
- SIDDIQUE, S., MATERA, C., RADAKOVIC, Z. S., HASAN, M. S., GUTBROD, P., ROZANSKA, E., GRUNDLER, F. M. (2014) Parasitic worms stimulate host NADPH oxidases to produce reactive oxygen species that limit plant cell death and promote infection. *Science signaling*, v. 7, n. 320, p. 1-9.
- SILVA, L. R. A., SILVA, G. M. C., SILVA, W. B., SOUZA, C. L. M., OLIVEIRA, J. G. (2015) Respiratory activity in isolated mitochondria from pulp of UENF/CALIMAN01 and Tainung01 papaya in postharvest fruit conservation. *Revista brasileira de fruticultura*, v. 37, n. 2, p. 296-307.
- SILVA, G. M. C. (2016) *O papel dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons na síntese e acúmulo do ácido ascórbico em mitocôndrias de frutos*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, p. 184.
- SINHA, K., DAS, J., PAL, P. B., SIL, P. C. (2013) Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of toxicology*, v. 87, n. 7, p. 1157-1180.
- SMIRNOFF, N., CONKLIN, P. L., LOEWUS, F. A. (2001) Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annual review of plant biology*, v. 52, n. 1, p. 437-467.
- SMIRNOFF, N. (2018) Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free radical biology and medicine*, v. 122, p. 116-129.
- SOUSA, J.S., D'IMPRIMA, E., VONCK, J. (2018) Mitochondrial respiratory chain complexes. In: *Membrane protein complexes: structure and function*. Springer, v. 87, p. 167-227.
- 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*, v. 36, n. 2, p. 318-328.



- SOUZA FILHO, M. D. S. M., LIMA, J. R., SOUZA, A. C., SOUZA NETO, M. A., COSTA, M. C. (1999) Efeito do branqueamento, processo osmótico, tratamento térmico e armazenamento na estabilidade da vitamina C de pedúnculos de caju processados por métodos combinados. *Food science and technology*, v. 19, n. 2, p. 211-213.
- SWEETLOVE, L. J., BEARD, K. F., NUNES-NESE, A., FERNIE, A. R., E RATCLIFFE, R. G. (2010) Not just a circle: Flux modes in the plant TCA cycle. *Trends in plant science*, v. 15, p. 462-470.
- SZARKA, A., BÁNHEGYI, G., ASARD, H. (2013) The inter-relationship of ascorbate transport, metabolism and mitochondrial, plastidic respiration. *Antioxidants & redox signaling*, v. 19, p. 1036-1044.
- TAIZ, L., ZEIGER, E., MOLLER, I. M., MURPHY, A. (2017) Fotossíntese: Reações luminosas. In: *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. Ed. Artmed. p. 171-202.
- TIMÓN-GÓMEZ, A., NÝVLTOVÁ, E., ABRIATA, L.A., VILA, A.J., HOSLER, J., BARRIENTOS, A. (2018) Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: Recent developments. *Seminars in cell and developmental biology*, v. 76, p. 163-178.
- VALLS-LACALLE, L., BARBA, I., MIRÓ-CASAS, E., ALBURQUERQUE-BÉJAR, J. J., RUIZ-MEANA, M., FUERTES-AGUDO, M., GARCÍA-DORADO, D. (2016) Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition. *Cardiovascular research*, v. 109, n. 3, p. 374-384.
- VAN DER LAAN, M., HORVATH, S. E., PFANNER, N. (2016) Mitochondrial contact site and cristae organizing system. *Current opinion in cell biology*, v. 41, p. 33-42.
- VANLERBERGHE, G. C. (2013) Alternative oxidase: a mitochondrial respiratory pathway to maintain metabolic and signaling homeostasis during abiotic and biotic stress in plants. *International journal of molecular sciences*, v. 14, n. 4, p. 6805-6847.

- VANLERBERGHE, G. C., DAHAL, K., ALBER, N. A., CHADEE, A. (2020) Photosynthesis, respiration and growth: A carbon and energy balancing act for alternative oxidase. *Mitochondrion*, v. 52, p. 197-211.
- VANLERBERGHE, G. C., CVETKOVSKA, M., WANG, J. (2009) Is the maintenance of homeostatic mitochondrial signaling during stress a physiological role for alternative oxidase. *Physiologia plantarum*, v. 137, p. 392-406.
- VENKATESH, J., PARK, S. W. (2014) Role of L-ascorbate in alleviating abiotic stresses in crop plants. *Botanical studies*, v. 55, n. 1, p. 38.
- WANG, J., YOU, Y., CHEN, W., XU, Q., WANG, J., LIU, Y., WU, J. (2015) Optimal hypobaric treatment delays ripening of honey peach fruit via increasing endogenous energy status and enhancing antioxidant defence systems during storage. *Postharvest biology and technology*, v. 101, p. 1-9.
- WEISS, H., FRIEDRICH, T., HOFHAUS, G., PREIS, D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *European journal of biochemistry*, v. 197, p. 563-576.
- YAMAMOTO, Y., KOBAYASHI, Y., DEVI, S. R., RIKIISHI, S., MATSUMOTO, H. (2002) Aluminum toxicity is associated with mitochondrial dysfunction and the production of reactive oxygen species in plant cells. *Plant physiology*, v. 128, p. 63–72.
- YOKAWA, K., KAGENISHI, T., BALUŠKA, F. (2013) UV-B induced generation of reactive oxygen species promotes formation of BFA-induced compartments in cells of Arabidopsis root apices. *Frontiers in plant science*, v. 6, p. 1162.
- YOSHIKAWA, S., SHIMADA, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome c oxidase. *Chemical reviews*, v. 115, n. 4, p. 1936-1989.
- ZHANG, D., HAMAUZU, Y. (2004) Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food chemistry*, London, v. 88, n. 4, p. 503-509.
- ZSIGMOND, L., TOMASSKOVICS, B., DEÁK, V., RIGÓ, G., SZABADOS, L., BÁNHEGYI, G., SZARKA, A. (2011) Enhanced activity of galactono-1, 4-

lactone dehydrogenase and ascorbate–glutathione cycle in mitochondria from Complex III deficient Arabidopsis. *Plant physiology and biochemistry*, v. 49, p. 809-815.

ZUBAIRI, S. I., OTHMAN, Z. S., SARMIDI, M. R., AZIZ, R. A. (2016) Environmental friendly bio-pesticide rotenone extracted from *Derris* sp.: A review on the extraction method, toxicity and field effectiveness. *Jurnal teknologi*, v. 78, n. 8, p. 1-23.