

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**Avaliação molecular da biossíntese de ácido ascórbico e  
possível participação da Oxidase alternativa em dois clones de  
aceroleira (*Malpighia emarginata* DC).**

*LUIS FLÁVIO MENDES SARAIVA*

FORTALEZA-CEARÁ

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

- 
- S246a Saraiva, Luis Flávio Mendes.  
Avaliação molecular da biossíntese de ácido ascórbico e possível participação da Oxidase alternativa em dois clones de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) / Luis Flávio Mendes Saraiva – 2011.  
128 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciência, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2011.  
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal.  
Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.  
Co-orientação: Prof. Dr. José Hélio Costa.
1. Mitochondria. 2. Respiração vegetal. 3. Acerola I. Título.

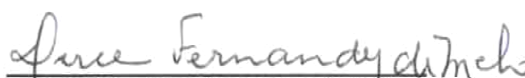
Luis Flávio Mendes Saraiva

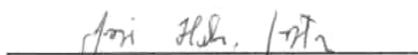
Avaliação molecular da biossíntese de ácido ascórbico e possível participação da Oxidase alternativa em dois clones de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC).


Tese submetida a Coordenação do Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

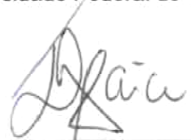
Aprovada em 30 de Setembro de 2011.

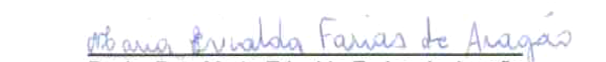
Banca examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo  
Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Hélio Costa  
Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho  
Universidade Federal do Ceará

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia  
Instituto de Biociências- Departamento de Genética- UNESP-Botucatu- São Paulo

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão  
Departamento de Biologia- Universidade Estadual do Ceará

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus e seu filho Jesus, abençoando-me a cada dia. A meu pai Francisco Nunes (*in memorian*), que tanto se esforçou para educar os filhos. A minha mãe, Deusilis (*in memorian*), pois com sua fé inabalável, mesmo com suas limitações, transferiu amor, força e carinho sendo decisiva em todas as fases dessa tese. Aos meus irmãos, Mary, Ricardo (*in memorian*), Maryane, Rosemary, George e minha sobrinha Fernanda, que com seu companheirismo e amor sempre me estimularam nos momentos difíceis e, sobretudo por serem os melhores irmãos que alguém poderia ter.



## AGRADECIMENTOS

Esse momento é particularmente cuidadoso, pois sempre se incorre no risco de se omitir alguém. Mas mesmo para aqueles que possivelmente se encontrem ausentes nessa citação, previamente agradeço calorosamente.

Embora já dedicado, meu Deus foi e sempre será a pessoa que mais serei grato. Desde o sopro da vida, bem como o acesso ao Doutorado Deus esteve presente em cada passo, orientando, protegendo, declarando suas bênçãos sobre mim, além de trazer um profundo consolo nos momentos de perdas que ocorreram na fase final dos trabalhos.

Meu agradecimento acadêmico especial a professora Dirce Fernandes de Melo, que prontamente me acolheu no laboratório de bioenergética, sendo uma pessoa que definiu positivamente na obtenção desse título, bem como na minha formação pessoal. Sua inteligência, longanimidade e conhecimento foram e será uma eterna fonte de inspiração.

Ao professor José Hélio Costa, que sem sombra de dúvidas foi o responsável pelos conhecimentos na área de biologia molecular e bioinformática, além de ser um companheiro paciente e compreensivo, que soube intervir em momentos cruciais do percurso dessa tese.

Aos colegas de laboratório, Nila, Pedro, Neuza, Deborah, Bia, Carol, Carine, Andresiane, Geórgia, Kátia e Camila que em diversos momentos contribuíram de diferentes maneiras, ora com uma simples conversa, ora com auxílio direto em experimentos.

Aos professores Enéas Gomes Filho, Joaquim Enéas, Joaquim Albenísio da Silveira, Benildo Cavada e Thales Barbosa Grangeiro, que em várias etapas cederam os aparelhos constantes em seus laboratórios, bem como seus conselhos sobre aspectos dos trabalhos.

Aos professores Dra. Cristina Paiva da Silveira Carvalho do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Dr. Ivan de Godoy Maia do Instituto de Biociências- Departamento de Genética- UNESP-Botucatu- São Paulo e Dra. Maria Erivalda Farias de Aragão do Departamento de Biologia da Universidade Estadual do Ceará UECE, por suas valiosas contribuições na conclusão da tese.

Ao Dr. Raimundo Nonato, diretor da EMBRAPA/Pacajús, por contribuir com a cessão das amostras de aceroleiras usadas como material de pesquisa, bem como aos funcionários que auxiliaram nas coletas.

A Samara Régia de Andrade e Patrícia Caetano Monte, bolsistas da UECE que por um breve momento auxiliaram nos trabalhos da Tese, além de dividirem reflexões acerca da Criação trazendo animo a caminhada.

Aos membros da Igreja Nova Vida em Cristo, principalmente ao Apóstolo Napoleão Oliveira e sua esposa a Apóstola Flávia Oliveira, por toda orientação espiritual que costumeiramente dedicaram em seus discipulados, acrescentando valiosos conselhos no campo pessoal, como também do incessante incentivo a lutar sempre pelos sonhos que possuía.

Aos irmãos em Cristo Ricardo Walberley e Karleane Fernandes, por compartilharem momentos de alegria e tristeza, trazendo uma palavra de renovo nas dificuldades e de regozijo nas vitórias.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, principalmente a Gildemar, Edilberto e Márcio, que sempre foram solícitos em ajudar, trazendo uma contribuição relevante a esse trabalho.

Aos colegas da Faculdade de Educação Ciências e Letras de Iguatu, FECLI-UECE, os quais compartilharam momentos de companheirismo, acrescentando compreensão e solidariedade no tocante a minha remoção ao CCS-ITAPERI.

Ao Professor Francisco Fábio Castelo Branco, por sua imensa colaboração quanto a minha remoção para o CCS-UECE, bem como em revelar ante ao CEPE suas valiosas considerações de apoio ao fato.

A Professora Micheline Soares Oliveira, por auxiliar de forma isenta, imparcial e profissional na compilação de disciplinas na FECLI, facilitando enormemente o desenvolvimento do Doutorado, bem como no compartilhamento de inúmeras vitórias diante da adversidade e do infortúnio.

Aos colegas do colegiado do Curso de Ciências Biológicas CCS-UECE, que unanimemente apoiaram minha remoção, bem como ao Professor Dr. Eliseu Marlônio de Lucena, coordenador do curso de Ciências Biológicas na fase final da Tese.

Aos colegas Marco Antônio Costa, Régis Freitas e Rafael Calvet, que mesmo distantes durante o período da Tese, mantiveram contato e incentivos com respeito a conquista vindoura.

A Valdísia, pelas contribuições sempre oportunas.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xix</b>
<b>INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>01</b>
<b>1. Características gerais e botânicas da aceroleira.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Fatores econômicos e sociais.....</b>	<b>02</b>
<b>3. Clones comerciais de aceroleiras produzidos no Brasil.....</b>	<b>03</b>
<b>4. A acerola e a vitamina C.....</b>	<b>04</b>
<b>5. Características gerais da vitamina C.....</b>	<b>07</b>
5.1 Estrutura do ácido ascórbico.....	07
<b>6. Biossíntese do ácido ascórbico.....</b>	<b>08</b>
<b>7. Enzimas exclusivas da Via Wheeler /Smirnoff.....</b>	<b>15</b>
7.1 Manose fosfato isomerase.....	15
7.2 Fosfomanose mutase.....	16
7.3 GDP-D-Manose Pirofosforilase (D-Manose-1-fosfato Guanilil transferase).....	17
7.4 GDP-D-Manose-3,5-Epimerase.....	17
7.5 GDP-L-galactose fosforilase (L-Galactose guanililtransferase).....	17
7.6 L-Galactose 1 fosfato fosfatase.....	18
7.7 L-Galactose desidrogenase (L-Galdh).....	18
7.8 L-Galactono -1,4-lactono desidrogenase (GalLdh).....	19
<b>8. Oxidase alternativa (AOX).....</b>	<b>22</b>
<b>9. Objetivos.....</b>	<b>24</b>
9.1 Geral.....	24
9.2 Específicos.....	24
<b>10. Material.....</b>	<b>25</b>
<b>11. Métodos.....</b>	<b>25</b>
11.1 Determinação dos teores de ácido ascórbico total pelo método de titulometria de	

Tillman.....	25
<b>12. Caracterização da Oxidase alternativa de <i>Malpighia emarginata</i> DC.....</b>	<b>28</b>
12.1 Extração do RNA total.....	28
12.2 Quantificação do RNA total.....	30
12.3 Eletroforese do RNA Total para verificação da integridade.....	31
12.4 Reações de transcrição reversa e de PCR.....	32
12.5 Desenho dos pares de oligonucleotídeos (primers) senso e antisenso degenerados da AOX.....	33
12.6 Isolamento de DNA de folhas de aceroleiras usando o tampão CTAB.....	35
12.7 Amplificação dos genes da Oxidase alternativa pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).....	36
12.8 Eletroforese do material amplificado.....	36
12.9 Purificação e ligação dos produtos de RT-PCR.....	37
12.10 Transformação de bactérias de <i>Escherichia coli</i> cepa JM109 para a caracterização da Oxidase alternativa (AOX).....	38
12.11 Estimativa da transformação de <i>Escherichia coli</i> através de PCR em colônia.....	40
12.12 Mini-preparação plasmidial.....	40
12.13 Seqüenciamento dos plasmídios isolados na mini-preparação.....	41
12.14. Caracterização das isoformas da Oxidase alternativa.....	41
12.15. Análises da expressão gênica das enzimas participantes da via Wheeler/Smirnoff e da Oxidase alternativa 1 e 2 (AOX1 e AOX2 específicos).....	41
12.15.1 Desenho dos pares de oligonucleotídeos (primers) senso e antisenso da via Wheeler/Smirnoff (degenerados e específicos para <i>Malpighia emarginata</i> DC) e específicos da AOX1 e AOX2 de <i>Malpighia emarginata</i> DC.....	41
12.15.2 Amplificação dos genes da via Wheeler/Smirnoff, AOX1 e AOX2 pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).....	43
12.15.3 Eletroforese do material amplificado dos genes da via Wheeler/Smirnoff, AOX1 e AOX2.....	44
<b>13. Resultados.....</b>	<b>45</b>
13.1 Dosagem dos teores de ácido ascórbico total presente nos clones Cereja e	

Roxinha de <i>Malpighia emarginata</i> DC, em mg/100g de polpa.....	45
13.2 Expressão gênica da Glicose fosfato isomerase.....	47
13.3 Expressão gênica da Manose fosfato isomerase.....	49
13.4 Expressão gênica da fosfomanose mutase.....	51
13.5 Expressão gênica da GDP-manose pirofosforilase.....	53
13.6 Expressão gênica da GDP-Manose 3'5' epimerase.....	55
13.7 Expressão gênica da GDP- Galactose fosforilase.....	57
13.8 Expressão gênica da L-Galactose 1 fosfato fosfatase.....	59
13.9 Expressão gênica da L-Galactose desidrogenase.....	61
13.10 Expressão gênica da L-Galactono-1,4-Lactono desidrogenase.....	63
<b>14. Caracterização da Oxidase alternativa em <i>Malpighia emarginata</i> DC.....</b>	<b>65</b>
<b>15. Expressão gênica da Oxidase alternativa (AOX1 e AOX2).....</b>	<b>67</b>
<b>16. Discussão.....</b>	<b>70</b>
<b>17. Conclusões.....</b>	<b>88</b>
<b>18. Referências bibliográficas.....</b>	<b>89</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Clones comerciais de aceroleiras produzidas no Ceará.....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 2. Estereoisômeros do ácido ascórbico.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 3. Ácido L-ascórbico e seu produto de oxidação inicial, o ácido Ldeidroascórbico(AAox).....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 4. Via biossintética do ácido ascórbico proposta por Wolucka/Van Montagu.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 5. Via biossintética derivada do ácido D-Galacturônico.....</b>	<b>11</b>
<b>Figura 6. Via alternativa da biossíntese do ácido ascórbico derivada do mio-inositol.....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 7. Via Wheeler/Smirnoff da biossíntese do ácido ascórbico em plantas.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 8. Modelo 3D da GalLdh com sítio FAD ligante em azul.....</b>	<b>19</b>
<b>Figura 9. Modelo hipotético da interação da GalLdh e a cadeia de transporte de elétrons segundo Bartoli (2000).....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 10. Via da respiração alternativa da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial mostrando a localização de cada enzima. Em amarelo: NAD(P)H desidrogenase, em verde: oxidase alternativa e em azul: proteína desacopladora.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 11. Esquema da extração de RNA total pelo kit RNeasy plant Mini kit (Quiagen®).....</b>	<b>30</b>

- Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1,5% diluído em tampão MOPS do RNA total extraído de folhas de acerolas comuns, flores (Cereja e Roxinha), frutos verdes (FV Cereja, FV Roxinha) frutos semimaduros (FSM Cereja, FSM Roxinha) e frutos maduros (FM Cereja, FM Roxinha), mostrando as subunidades ribossomais. As bandas foram visualizadas em brometo de etídio 0,5 µg/ml, sob luz ultravioleta. M- marcador de peso molecular 1 Kb *Ladder* (Invitrogen®)..... 32**
- Figura 13. Modelo estratégico para a escolha das regiões nas quais foram desenhados primers senso e antisense da Oxidase alternativa AOX..... 34**
- Figura 14. Mapa circular do vetor de clonagem pGEM-TEasy, com destaque para os diferentes sítios de restrição de endonucleases, genes de resistência a ampicilina e gene *lac Z* que codifica a enzima β-galactosidase..... 38**
- Figura 15. Placa de petri mostrando colônias transformadas (brancas) com o vetor e não transformadas (azuis)..... 39**
- Figura 16. Teores de ácido ascórbico dos clones BRS236 Cereja e BRS237 Roxinha presentes em três estádios de desenvolvimento de frutos (frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros), em mg de ácido ascórbico por 100g de polpa, obtidos pelo método de titulometria de Tillman..... 46**
- Figura 17. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 48**
- Figura 18. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Manose fosfato isomerase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos**

**semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha.** A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 50

**Figura 19. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Fosfomanose mutase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha.** A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 52

**Figura 20. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Manose pirofosforilase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha.** A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência(B)..... 54

**Figura 21. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Manose 3'5'Epimerase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha.** A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 56

**Figura 22. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da GDP Galactose fosforilase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha.** A corrida eletroforética foi



desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 58

**Figura 23. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Galactose fosfato fosfatase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 60**

**Figura 24. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Galactose desidrogenase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 62**

**Figura 25. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da L Galactono 1,4 Lactono desidrogenase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 64**

**Figura 26. Alinhamento das regiões clonadas e sequenciadas da AOX1 e AOX2 de *Malpighia emarginata* DC, submetidas no programa Clustaw2 presente no banco de genes europeu EMBL, comparadas com os genes da AOX1 e AOX2 de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)..... 66**

**Figura 27. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Oxidase alternativa 1 (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 68**

**Figura 28. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Oxidase alternativa 2 (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5µl do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B)..... 69**

**Figura 29. Esquema ilustrando a dinâmica da biossíntese do ácido ascórbico em plantas, mostrando a interação das reações do citoplasma com as reações existentes na membrana mitocondrial interna, principalmente as que envolvem o Complexo III (CIII) com a GalLdh, AOX e o Citocromo C. A GalLdh necessita de L-Galactono 1,4 lactono produzido no citoplasma e do Citocromo C oxidado para gerar o ácido ascórbico. A AOX drena o fluxo de elétrons que é gerado pelo pool de ubiquinona, dosando a quantidade destes para o C III e, por conseguinte para a GalLdh..... 87**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1- Indicadores agroindustriais das aceroleiras comerciais (Fonte Embrapa).....</b>	<b>5</b>
<b>Tabela 2- Peso da polpa e volumes de DFI utilizados no cálculo do título e da quantidade de ácido ascórbico (mg) em 100g de polpa.....</b>	<b>27</b>
<b>Tabela 3- Leituras espectrofotométricas dos RNAs totais isolados dos tecidos de <i>Malpighia emarginata</i> DC (C significa cereja e R Roxinha).....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 4- Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa.....</b>	<b>32</b>
<b>Tabela 5- Leituras espectrofotométricas obtidas dos produtos de transcrição reversa dos tecidos analisados de <i>Malpighia emarginata</i> DC (C significa cereja e R Roxinha).....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 6- Leituras espectrofotométricas obtidas dos produtos de transcrição reversa dos tecidos analisados de <i>Malpighia emarginata</i> DC (C significa cereja e R Roxinha).....</b>	<b>35</b>
<b>Tabela 7- Componentes e quantidades de reagentes utilizados nas reações de PCR.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 8- Programas de PCR utilizados para o gene da AOX de <i>Malpighia emarginata</i> DC.....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 9- Volumes utilizados do Meio Terrific Broth para realização de minipreparação.....</b>	<b>41</b>
<b>Tabela 10- Pares de primers degenerados e específicos* usados na análise da expressão gênica da AOX1, AOX2 e genes da via Wheeler/Smirnoff.....</b>	<b>43</b>

**Tabela 11- Programas de PCR utilizados para os genes da via Wheeler/Smirnoff e AOX1 e AOX2 de *Malpighia emarginata* DC. A temperatura de anelamento para cada par de primer foi de 54°C para GGP, GPP, 55°C para GPI, MPI, Galdh, GalLdh, AOX1 e AOX2 e de 56°C para PMM, GMP e GME..... 44**

**Tabela 12- Análise comparativa da identidade da AOX pela percentagem de aminoácidos das sequencias clonadas de *Malpighia emarginata* DC (Me) comparadas com as sequencias da AOX1 e AOX2 de *Arabidopsis thaliana* (At)..... 66**

**ABREVIATURAS**

- AA/AsA- Ácido ascórbico
- ADP- Adenosina difosfato
- Aox- Ácido ascórbico oxidado
- AOX- Alternativa oxidase (Oxidase alternativa)
- APX- Ascobate peroxidase (Peroxidase do ascorbato)
- Ared- Ácido ascórbico reduzido
- ATP- Adenosina trifosfato
- BLAST- Basic Local Aligment Search Tool
- CaCl<sub>2</sub>- Cloreto de Cálcio
- cDNA- DNA complementar
- Cit C- Citocromo C
- DNA- Ácido desoxirribonucléico
- DFI- 2,6 dicloro-fenol indofenol
- EDTA- Ácido diaminotetraacético
- EF $\alpha$ - Elongation alfa factor (Fator de alongação alfa)
- Galdh- L-Galactose dehydrogenase (L-Galactose desidrogenase)
- GalLdh- L-Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase (L-Galactono-1,4-Lactono Desidrogenase)
- GGP- GDP Galactose Phosphorilase (GDP Galactose fosforilase)
- GME- GDP- Mannose 3'5' epimerase (GDP- Manose 3'5' epimerase)
- GMP- GDP- Mannose pirophosphorilase (GDP Manose pirofosforilase)
- GPI- Glucose phosphate isomerase (Glicose fosfato isomerase)
- GPP- GDP Phosphate Phosphatase (GDP Fosfato fosfatase)
- IPTG- Isopropiltiogalactopiranosídeo
- KCl- Cloreto de Potássio
- LB- Luria Bertani
- MgCl<sub>2</sub>- Cloreto de Magnésio
- MOPS- Ácido 3-(N-morpholino) propanosulfônico
- MPI- Mannose Phosphate isomerase (Manose fosfato isomerase)
- NaCl- Cloreto de Sódio
- NaOH- Hidróxido de Sódio
- NCBI- Nucleotide Center of Biotechnology Institute
- PCR- Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da polimerase)

PEG- Polietilenoglicol

PMM- Phosphomannomutase (Fosfomano mutase)

RNA- Ácido ribonucléico

RT- Reverse Transcription (Transcrição reversa)

SDS- Dodecil sulfato de sódio

TBE- Tampão Tris Boro EDTA

Vita C- Vitamina C

X-Gal- Galactopiranosídeo

ORF- Open reading frame (Seqüência de leitura aberta)

## RESUMO

A acerola *Malpighia emarginata* DC é uma fruta dotada de qualidades nutricionais invejáveis, sendo consumida tanto *in natura* quanto processada. A principal característica que destaca a acerola é sua enorme capacidade em sintetizar o ácido ascórbico. A Embrapa desenvolveu quatro clones comerciais com características fenotípicas e genéticas bem definidas denominado BRS 235 (Apodi), BRS 236 (Cereja), BRS 237 (Roxinha) e BRS 238 (Frutacor). Os clones BRS 236 (Cereja) e BRS 237 (Roxinha) foram escolhidos devido a enorme diferença de ácido ascórbico sintetizada entre eles, aproximadamente 50% a mais no clone Cereja. Para esse estudo foi analisada a expressão gênica das enzimas pertencentes a via Wheeler/Smirnoff, reconhecida como a principal via biossintética do ácido ascórbico em plantas bem como a Oxidase alternativa (AOX) uma enzima desacopladora, não fosforilante e insensível ao cianeto, presente entre os complexos II e III da membrana mitocondrial interna, responsável pela via alternativa de elétrons. O objetivo desse trabalho foi identificar quais enzimas são determinantes na diferença do conteúdo de vitamina C entre os clones, bem como avaliar a expressão da AOX nos diferentes tecidos. De aceroleiras com cinco anos de idade foram colhidos quatro tecidos (Flores, Frutos verdes, Frutos semimaduros e Frutos maduros). Inicialmente os teores de ácido ascórbico foram dosados nos frutos verdes, semimaduros e maduros dos dois clones por titulometria de Tillman. Em seguida foi realizada a caracterização gênica da AOX para definição de suas isoformas. Após o isolamento do DNA e executadas as reações de PCR com um par de primers degenerados os amplicons foram purificados e submetidos a clonagem, transformação e sequenciamento. As dosagens de ácido ascórbico mostraram que ambos os clones decrescem seus níveis de ácido ascórbico a medida que os frutos se desenvolvem, além do que em todos os três estádios de desenvolvimento o clone Cereja apresenta quantidades de ácido ascórbico superiores ao clone Roxinha. Os níveis de ácido ascórbico entre os frutos verdes e maduros de ambos os clones revelaram que o clone Roxinha possui uma menor diferença entre esses dois estádios de desenvolvimento. As análises de expressão gênica revelaram que três enzimas possuem sua expressão destacada das demais, sendo que essas mostraram um sinergismo de expressão com o padrão decrescente dos níveis de vitamina C contida no tecido, apresentando ainda diferenças de expressão favoráveis ao clone Cereja. São elas: Manose pirofosforilase, GDP-Manose 3'5' epimerase e GDP Galactose fosforilase. Com maior destaque para a GDP-Manose 3'5' epimerase e GDP Galactose fosforilase. Não existiam diferenças nas expressões gênicas das demais enzimas da via Wheeler/Smirnoff que justificassem as diferenças nos teores de ácido ascórbico presentes nos tecidos e também entre os clones. Quanto a AOX os resultados revelaram duas seqüências, uma relativa a uma AOX1 e outra a uma AOX2. A análise da expressão gênica das isoformas da AOX demonstrou que a AOX1 eleva sua expressão gênica em ambos os clones a medida que os frutos amadurecem entretanto, o clone Roxinha possui uma expressão gênica mais elevada que o clone Cereja, em todos os três estádios de desenvolvimento. A AOX2 possui diferenças de expressão gênica onde no clone Cereja ela se mostrou decrescente, já no clone Roxinha ocorreu a elevação da expressão nos três estádios de desenvolvimento. Três enzimas são essenciais a biossíntese do ácido ascórbico em *Malpighia emarginata* DC, a Manose pirofosforilase, GDP-Manose 3'5' epimerase e GDP Galactose fosforilase, sendo a via Wheeler/Smirnoff determinante na quantidade de ácido ascórbico produzido. As expressões gênicas da AOX1 e AOX2 favorecem o clone Roxinha, aparentemente como um mecanismo compensatório por esse clone sintetizar menos ácido ascórbico que o clone Cereja.

## ABSTRACT

The acerola, *Malpighia emarginata* DC is a fruit small endowed with enviable nutritional qualities, being consumed both fresh and processed. The main feature that stands out from other species is its enormous capacity to synthesize ascorbic acid. In this sense, Embrapa has developed four commercial clones with phenotypic and genetic characteristics well defined. The clones BRS 235 (Apodi), BRS 236 (Cereja), BRS 237 (Roxinha) e BRS 238 (Frutacor) have characteristics fully standardized. This study aimed to evaluate the clones BRS 236 (Cereja) and BRS 237 (Roxinha) were selected because of huge amount of ascorbic acid synthesized between them, approximately 50% in Cereja clone. For this study we analyzed the gene expression of enzymes of the way Wheeler /Smirnoff as well as the Alternative Oxidase (AOX). The last step this of this pathway ends in the inner mitochondrial membrane, due to the presence of transmembrane enzyme L-Galactono-1,4- Lactone dehydrogenase (L-GalLdh), located between the complex III and IV. Since the alternative oxidase is an enzyme uncoupling, no phosphorylating and insensitive to cyanide, among the complexes II and III of the inner mitochondrial membrane, responsible for alternative pathway of electrons. This study aimed to identify the enzymes that are crucial in this process and generate the difference between the clones, as well as the probable relationship between the biosynthesis of ascorbic acid and the role that the AOX could play. Acerola five years of age were harvested four tissues (flowers, unripe, semi mature and mature fruits). The first step of this work was the determination of ascorbic acid in unripe, semi mature and mature fruits of the two clones by titration of Tillman. Then, we performed the characterization of the AOX gene to define its isoforms. After isolation of DNA and carried out the reactions of PCR with degenerate primers the amplicons were purified and subjected to cloning, transformation and sequencing. The results revealed sequences that correspond to one AOX1 and one AOX2. The next step of work was the study of gene expression of enzymes to the Wheeler/Smirnoff path, AOX1 and AOX2 newly characterized. After the design of pairs of degenerate and specific primers for all the enzymes of the route beyond the AOX1 and AOX2 they were used in semiquantitative PCR reactions, using the elongation factor alpha as a constitutive element of reference. The results showed that both clones decrease their levels of ascorbic acid as the fruits develop, revealing that in all three stages of development, the Cereja clone has higher amounts of ascorbic acid than Roxinha clone. However, when comparing the levels of ascorbic acid between green and ripe fruits of both clones is evident that the Roxinha clone has a lower difference between these two stages. The gene expression of three enzymes stood out from others, these showed a synergism with the expression levels of vitamin C contained in each tissue. In addition, gene expression in two clones showed differences in tissues that favor of Cereja clone. They are: Mannose pyrophosphorylase, GDP-Mannose 3'5' epimerase and GDP-Galactose phosphorylase. With greater emphasis on GDP-Mannose 3'5' epimerase and GDP-Galactose phosphorylase. The enzymes that stood out showed a higher gene expression in tissues where exactly had more ascorbic acid accumulated, gradually reducing the expression with the degree of fruit development, revealing that the difference occurs not only between clones, but also in tissues clones. There were no differences in gene expression of other enzymes of the route Wheeler/Smirnoff to justify the levels of ascorbic acid present in the tissues and also between clones. The analysis of gene expression of isoforms of AOX revealed that in both clones the AOX1 gene expression increases as the fruit ripens. However, the clone Roxinha has a higher gene expression than the clone Cereja, in all three stages of development. The analysis of transcripts of AOX2 revealed that in Cereja clone the gene expression decreased with fruit ripening, since in Roxinha clone the expression



elevated in three developmental stages. The results clearly showed that three enzymes are essential for biosynthesis of ascorbic acid highlighting the GDP-Mannose 3'5'epimerase and GDP-Galactose phosphorylase. Another important conclusion was that the AOX may be owner a function not previously reported in the literature, that of assisting in the biosynthesis of vitamin C. This may be due uncoupling promoted by the activity of AOX causing a gradual rise of the relationship oxidized cytochrome C/reduced cytochrome C, where the cytochrome C oxidized acts of a GalLdh substrates in the synthesis of ascorbic acid. This fact may be explained by not only the highest levels of AOX1 transcripts present in Roxinha clone, but the increasing pattern of gene expression in AOX2 exactly in clone that produces less ascorbic acid and which has the smallest difference between the stages of fruit Green and ripe fruit. In the clone Cereja, one that synthesizes more ascorbic acid and has a huge difference in the levels between the stages of green fruit and ripe fruit of gene expression of AOX2 shown decreasing during ripening. Thus, the concentration of products the Wheeler / Smirnoff path is still determining the amount of ascorbic acid produced, and in parallel, the increase in the AOX gene expression appears to contribute at some point to establish the total levels of vitamin C synthesized.

## 1. Características gerais e botânicas da aceroleira

A aceroleira (*Malpighia emarginata* DC) é uma planta rústica e resistente que se propaga com facilidade em toda a parte do mundo (SIMÃO, 1971), adaptando-se rapidamente em regiões com climas tropicais e sub-tropicais (MARIANO NETO, 1986). Ela é classificada como pertencente do Reino Plantae, Divisão Magnoliophyta, Classe Magnoliopsida, Ordem Malpighiales, Família Malpigiaceae, Genero Malpighia e Espécie *Malpighia emarginata* DC. O nome Malpighia, foi dado em homenagem ao fisiologista italiano Marcello Malpighi (SIMÃO, 1971). A exemplo de outras espécies frutíferas a aceroleira deixa dúvidas quanto a sua origem. Segundo Simão (1971), ela foi encontrada nas Antilhas, no Norte da América do Sul e na América Central, chegando assim à Flórida, vinda de Cuba, em 1903 e sendo introduzida no continente americano posteriormente. Chegou a Pernambuco em 1955 através da Universidade Federal Rural de Pernambuco, procedente de Porto Rico (MARIANO NETO, 1986). Nos anos 80 a UFRPE patrocinou e desenvolveu uma campanha de conscientização sobre os valores nutricionais da acerola e suas possibilidades de uso. Uma vez que os pomares de aceroleiras existentes no Brasil são oriundos de Porto Rico, acredita-se que sejam formados, essencialmente, a partir de *Malpighia glabra* e/ou *Malpighia puniceifolia*. É importante assinalar que em pomares implantados na região do submédio do São Francisco existem plantas glabras que não produzem irritação na pele durante a colheita. Outras, entretanto, causam forte irritação quando em contato com a pele humana, devido à presença de pêlos nas folhas. Esta observação reforça a hipótese da existência, no submédio do São Francisco, de *Malpighia glabra* e *Malpighia puniceifolia* (MARIANO NETO, 1986).

Com relação as características botânicas das plantas que foram estabelecidas no Brasil, observou-se que as inflorescências achavam-se dispostas em pequenas cimeiras axilares, pedunculadas, com três a cinco flores perfeitas, medindo 1 a 2 cm de diâmetro e sua coloração variava do rosa-esbranquiçado ao vermelho. O cálice dessas plantas possui entre seis e dez sépalas sésseis; a corola compõe-se de cinco pétalas franjadas, ou irregularmente dentadas, apresentando dez estames perfeitos (SIMÃO, 1971).

As flores surgem sempre após um rápido aumento no crescimento vegetativo. Podem tanto originar-se na axila das folhas dos ramos maduros em crescimento como nas axilas das folhas do ramo recém-brotados (SIMÃO, 1971).

A aceroleira é um arbusto, que atinge 3 a 4 m de altura. A diferenciação do botão floral ocorre entre 8 a 10 dias e a antese após 15 a 17 dias. Suas flores são de coloração rósea, apresentam 5 sépalas, 5 pétalas, 10 estames e 3 carpelos concrecidos formando um ovário único e súpero (MARTINS et al., 1999). Os frutos apresentam-se maduros dos 21 a 25 dias após a antese e com coloração que varia do laranja-claro ao vermelho-escuro, pesando de 2 a 10 g. Sua tonalidade pode também, dependendo da variedade e região, ser verde quando em desenvolvimento, passando a amarelo e finalmente vermelho quando maduro (MARTINS et al., 1999; LOPES e PAIVA, 2002). O fruto da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) é uma baga drupácea que apresenta três sementes, cada uma envolvida por um endocarpo reticulado e trilobado. As sementes são pequenas, proporcionais ao tamanho do fruto (COSTA et al., 2003). Estes frutos, quando de cor vermelha brilhante são semelhantes à cereja européia (*Prunus cerasus* L.) e desperta grande interesse e importância econômica face ao seu alto teor de ácido ascórbico (COSTA et al., 2003)..

Segundo Alves (1999), os elevados teores de vitamina C dão o destaque que a fruta possui no cenário nutricional, entretanto, a obtenção das quantidades ideais necessárias pode variar em função de diversos fatores como o estágio de desenvolvimento do fruto. Após a antese o pico de síntese de ácido ascórbico ocorre entre o 16<sup>o</sup> e o 18<sup>o</sup> dia. Sendo que além desse fator outros são determinantes nos teores da vitamina, como o método de propagação e o sombreamento e/ou exposição direta dos frutos a radiação solar por mais de 4 horas no período da colheita. Esses últimos diminuem sensivelmente os teores de ácido ascórbico quando as plantas estão submetidas (PAIVA, et al., 2001a).

A pesquisa científica tem buscado ampliar a qualidade das informações disponíveis para esta fruta. Estudos relacionados à morfologia reprodutiva, aspectos produtivos, repetibilidade e herdabilidade de caracteres são temas de destaque (LOPES, et al., 2000; PAIVA, et al., 2001a; MUSSER, et al., 2005).

## **2. Fatores econômicos sociais**

O fruto da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) tem despertado a atenção dos agricultores não somente pelo seu elevado conteúdo de vitamina C em relação a outras frutíferas, mas também pelo seu potencial para industrialização (ALVES, 1992; ALVES, 1999). Além de *in natura*, a fruta pode ser consumida na forma de sucos,

compotas e geléias, bem como ser utilizada no enriquecimento de sucos e de alimentos dietéticos e nutracêuticos, como comprimidos ou cápsulas usados como suplemento alimentar, chás, bebidas para esportistas, barras nutritivas e iogurtes (CARPENTIERI-PÍPOLO et al., 2002; MATSUURA e ROLIM, 2002; MATTA et al., 2004). Barnabé e Venturini Filho (2004) desenvolveram formulações de refrigerantes, com elevado teor de vitamina C, a partir desta fruta. Segundo Souza et al. (1999) o cultivo começou a ser feito em escala comercial apenas no final da década de 90 e o Nordeste brasileiro se destacou como a região de maior produção. Nessa região o cultivo da acerola encontrou um ambiente adequado principalmente nos diversos pólos de irrigação, sendo produzidos frutos de excelente qualidade durante quase todo ano (SOUZA et al., 1999). Uma vez que conquistou os mercados europeu, japonês e norte-americano a acerola tornou-se um produto de peso na pauta da exportação. Alguns estados brasileiros obtiveram sucesso exportando a acerola sob a forma de suco, polpa ou fruta congelada para Holanda e Japão, além da elevação do abastecimento proveniente no consumo do mercado interno (SOUZA et al., 1999).

Segundo Alves (1992) o aumento do consumo de produtos naturais provenientes da agricultura orgânica é uma tendência mundial. O cultivo de acerola com base nos princípios dessa agricultura, ou seja, livre de produtos agroquímicos, principalmente, para extração de vitamina C, vem atraindo o interesse de grandes empresas multinacionais. Essas empresas estão interessadas tanto em estabelecer plantios de acerola em áreas apropriadas à agricultura orgânica, como em atrair e motivar pequenos produtores para essa atividade. (ALVES, 1992).

### **3. Clones comerciais de aceroleiras produzidos no Brasil.**

O cultivo da acerola no Brasil registrou significativo aumento nos últimos 20 anos, tendo se consolidado como uma importante alternativa econômica para a Região Nordeste, proporcionando também um impulso para a agroindústria de polpa de fruta congelada (PAIVA, et al., 2001a).

Em 1996, A Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza/CE), iniciou estudos de melhoramento genético para a obtenção de clones de acerola lançando quatro novos clones denominados: BRS 235 (Acerola Apodi), BRS 236 (Acerola Cereja), BRS 237 (Acerola Roxinha) e BRS 238 (Acerola Frutacor). Os clones BRS se originaram da seleção de 100 plantas no pomar comercial da empresa Frutas do Ceará (Frucesa), que

reuniam características como frutos grandes e de coloração vermelho-púrpura (PAIVA, et al., 2001a).

As principais características botânicas desses clones são o porte baixo das plantas e a formação das copas tipo guarda-chuva, o que facilita a colheita manual e mantém a integridade do fruto, destacando-se ainda a composição química inerente a cada um dos clones (Tabela 1). A acerola Apodi se destaca na produção e no maior peso médio do fruto, enquanto a acerola Cereja apresenta maior teor de vitamina C e a segunda maior produção média de frutos. O clone Roxinha possui conformação de copa menos exigente à poda e fruto com polpa de coloração vermelho-púrpura forte, mais adequada as preferências do consumidor. A acerola Frutacor reúne varias características, como altos teores de vitamina C e de sólidos solúveis (PAIVA, et al., 2001a).

#### **4. A acerola e a vitamina C**

O conteúdo de ácido ascórbico ou vitamina C na acerola é variável, dependente do material genético, métodos culturais, manejo da colheita, estágio de maturação e métodos de processamento (ALVES, 1996; GOMES et al., 2000; LIMA et al., 2000; PAIVA et al., 2001; MUSSER et al., 2004; MOURA et al., 2007).

Foi constatado que frutos de plantas reproduzidas através de sementes apresentam teor de ácido ascórbico inferior os frutos produzidos de plantas enxertadas. A incidência solar direta nos frutos durante os estádios de desenvolvimento propicia um aumento no teor de ácido ascórbico, bem como também a localização desses frutos na planta, sendo aqueles sombreados aqueles os que concentram menos ácido ascórbico (SILVA, 1994; BATISTA et al., 1996).

As variedades estudadas por Ritzinger et al. (2003) apresentaram teor de vitamina C de 1.500 a 2.200 mg/100g. Carpentieri-Pípolo et al. (2002), avaliando três novos cultivares de aceroleira, encontraram teores de 1.098 a 1.458 mg/ 100g em frutos maduros e de 2.906 a 3.579 mg/100g em frutos verdes. Entretanto, Matsura et al. (2001), analisando frutos semi-maduros de 12 diferentes genótipos de aceroleira observaram uma variação menor, com valores de 825 a 1.820 mg/100g. Nogueira et al. (2002) encontraram decréscimo no teor de vitamina C durante o amadurecimento, de 2.732,7 para 1.682,7 mg/100g, na estação seca e de 1.753,25 até 865,8 mg/100g na estação chuvosa.

Os clones produzidos pela EMBRAPA (Figura 1) possuem teores de vitamina C de 1190 a 1890 mg/100g de polpa, além da capacidade de serem obtidas de 38 a 39 colheitas/ano, sendo que diferentes fatores regulam os teores de vitamina C que cada clone armazena (PAIVA et al., 2003) (Tabela 1). O clone Cereja destacou-se por ser o que concentra maiores teores de ácido ascórbico, além de ter um elevado número de colheitas/ano e ser o segundo em produtividade. Já o clone Roxinha é aquele que dos quatro clones detém o menor teor de vitamina C, entretanto, é o que possui o segundo maior peso médio de frutos (10,8g) (PAIVA et al., 2003). Segundo Paiva et al., (2003), apesar de que outras variedades de aceroleiras apresentam teores de ácido ascórbico superiores aos quatro clones comerciais produzidos pela EMBRAPA, esse fator não foi o determinante na seleção daqueles que seriam usados para o estabelecimento de plantios padronizados. A imensa quantidade de cultivares de aceroleiras plantadas sob as mesmas condições ambientais, que diferem nos teores de vitamina C, apontou que não apenas os fatores ambientais, mas também o genético é determinante no conteúdo de ácido ascórbico acumulado nos frutos (PAIVA et al., 2003). Fatores como a estabilidade anual de produção, as características botânicas bem definidas, a composição química presente nos frutos, a estrutura e tamanho de frutos, a resistência a patógenos e os teores de vitamina C foram utilizados conjuntamente para determinar que os clones Cereja, Roxinha, Frutacor e Apodi eram os mais adequados ao cultivo comercial não apenas no Ceará (PAIVA et al., 2003).

**Tabela 1. Indicadores agroindustriais das aceroleiras comerciais (Fonte Embrapa).**

Indicadores agroindustriais	BRS 235 (Apodi)	BRS 236 (Cereja)	BRS 237 (Roxinha)	BRS 238 (Frutacor)
Teor de vitamina C (mg/100g de polpa)	1.260,9	1.854,9	1.193,9	1.656,1
Teor de sólidos solúveis totais SST (°Brix)	6,4	6,2	8,3	8,3
Acidez total titulável ATT (%)	1,03	1,33	1,12	1,48
SST/ATT	6,21	4,66	7,41	5,61
Teor de antocianinas (mg/100g de polpa)	12,26	9,3	12,64	4,57
Rendimento de polpa (%)	53,99	51,90	41,93	-
Firmeza do fruto (Newton)	2,56	3,69	3,25	3,38
Peso médio do fruto (g)	11,8	7,56	10,8	6,6
Produção média de frutos/colheita/planta em 2002 (kg)	2,53	2,42	1,89	2,18
Nº de colheitas no ano de 2002	39	39	39	38
Produtividade (t/ha)	49,34	47,19	36,86	41,42

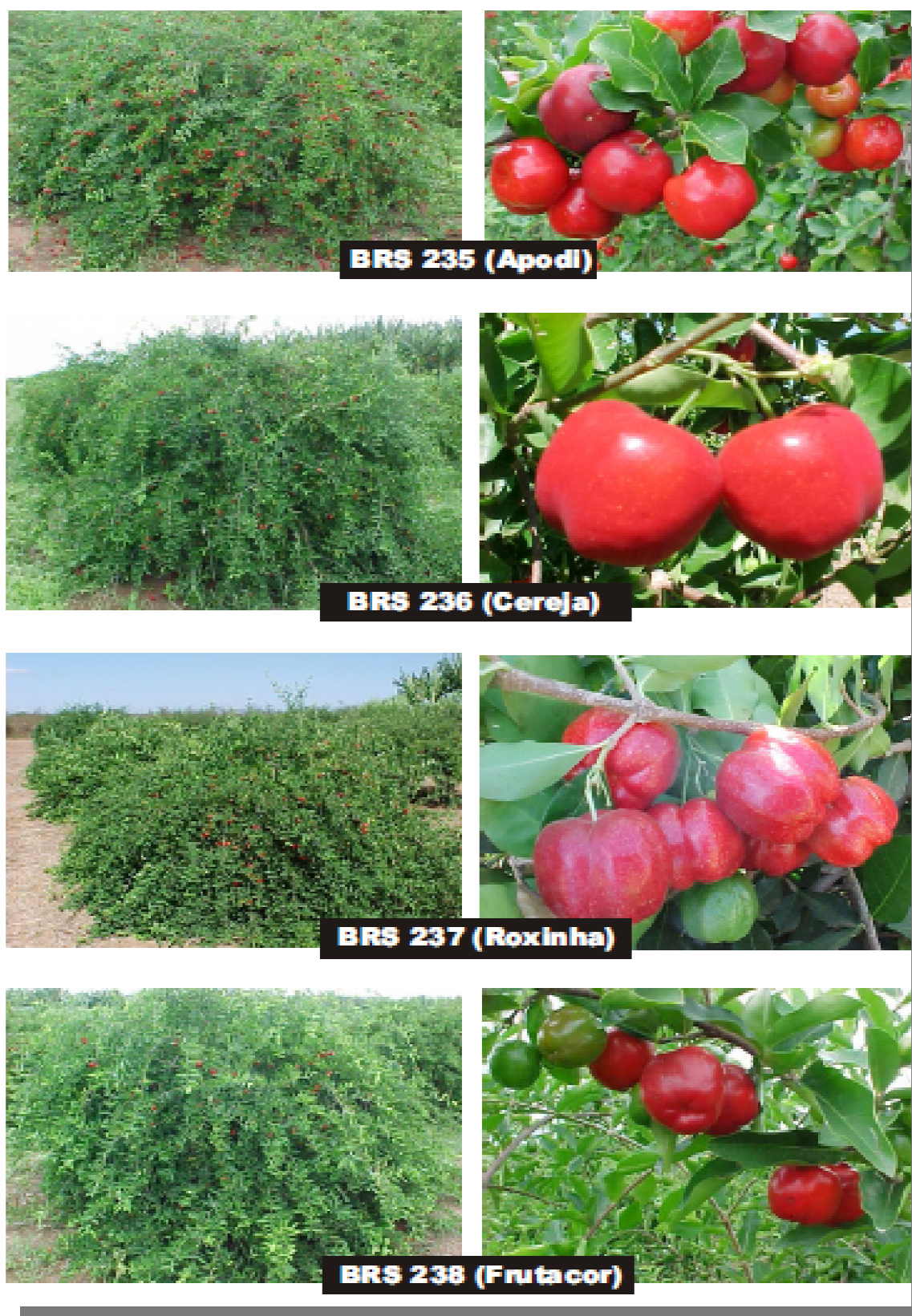


Figura 1. Clones comerciais de aceroleiras produzidas no Ceará (Fonte Embrapa).

## 5. Características gerais da vitamina C

O ácido L-ascórbico (AsA) ou vitamina C é um dos mais abundantes metabólitos nas plantas, participando em respostas a diferentes estresses (seca, salinidade, ozônio, radiação ultravioleta, altas temperaturas e elevadas intensidades luminosas, injúrias por insetos, senescência, morte celular programada), bem como no crescimento e desenvolvimento (respostas hormonais, florescimento, expansão e divisão celular) (SMIRNOFF, 2000). A vitamina C é um poderoso antioxidante e atua direta ou indiretamente na prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) ou ROS (Reactive Oxygen Species). No primeiro caso ele age com a molécula alvo, já da forma indireta, ele atua como um cofator de enzimas responsáveis pela diminuição de radicais livres (SMIRNOFF, 2000). Como algumas espécies de animais perderam a capacidade de síntese do ácido L-ascórbico (incluindo primatas), eles necessitam consumir em sua dieta fontes de vitamina C, tornando-se dependentes de organismos primários produtores como as plantas (SMIRNOFF, 2000). A vitamina C não é sintetizada pelo organismo humano, sendo, portanto indispensável na dieta (AGUIAR, 2001). Ela é encontrada principalmente em frutos tropicais como acerola, goiaba e caju dentre outras (SILVA 2007). Essa vitamina desempenha várias funções biológicas relacionadas ao sistema imune, formação de colágeno, absorção de ferro, inibição da formação de nitrosaminas e ação antioxidante (VANNUCHI e JORDÃO JÚNIOR, 1998), além de facilitar o uso do cálcio na construção dos ossos e vasos sanguíneos (WTCR/AICR, 1997). Participam ainda na biossíntese de corticóides e catecolaminas, na síntese e manutenção dos tecidos, ossos, dentes e sangue (ARAÚJO e MINAMI, 1994). A vitamina C é encontrada em compartimentos intracelulares distintos (mitocôndria, cloroplasto, vacúolo) e na membrana plasmática são encontrados carreadores que participam na translocação da vitamina facilitando o movimento do ascorbato para a parede celular, permitindo a movimentação célula a célula via apoplasto (SMIRNOFF, 2000).

### 5.1 Estrutura do ácido ascórbico

Segundo Fornaro et al., (1998) a vitamina C é o termo frequentemente usado para referir-se ao ácido L-ascórbico, figura 2I (LAA), e o seu produto de oxidação inicial, o ácido L-deidroascórbico ou ácido ascórbico oxidado AAox (Figura 3). A



figura 2 apresenta ainda outros três isômeros do ácido ascórbico, denominados: ácido D-ascórbico ou DAA (II), ácido D-isoascórbico ou DIAA (III) e ácido L-ascórbico ou LIAA (IV), onde esses praticamente não apresentam atividades vitamínicas sendo encontrados em baixíssimas concentrações nos alimentos (OLIVEIRA et al., 2011).

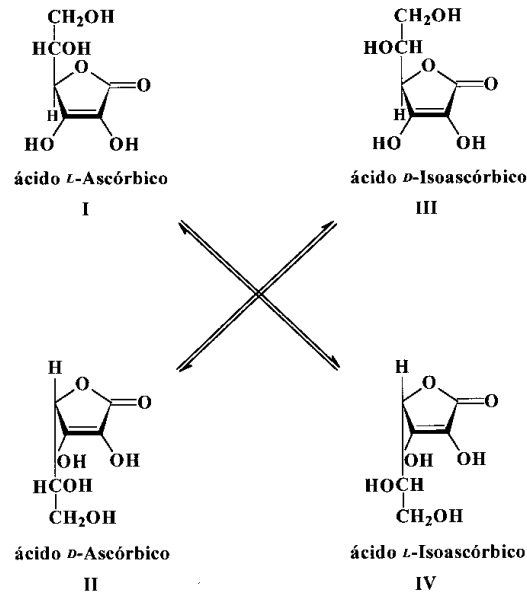


Figura 2. Estereoisômeros do ácido ascórbico.

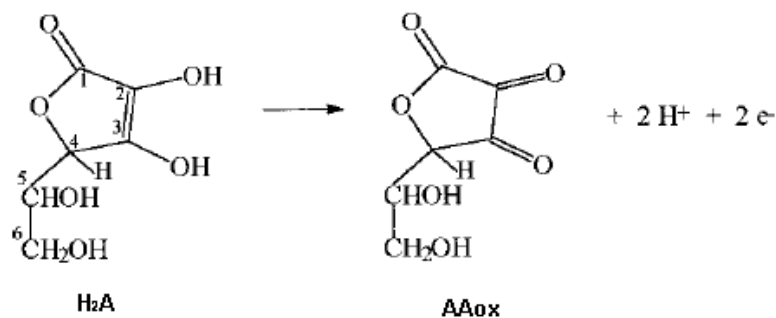


Figura 3. Ácido L-ascórbico e seu produto de oxidação o ácido L-deidroascórbico (AAox).

## 6. Biossíntese do ácido ascórbico

Evidências apresentadas por Isherwood, Chen e Mapson (1953) indicavam que a síntese do ácido ascórbico *in vivo*, tanto em plantas quanto em animais poderiam ser representadas por uma ou ambas das seguintes seqüências:

- 1- D-glicose  $\rightarrow$  D-glucurono-1,4-lactona  $\rightarrow$  L-gulono- 1,4- lactona  $\rightarrow$  ácido L-ascórbico;

2- D-galactose → ácido D-galacturônico metil ester → L-galactono- 1,4-lactona → ácido L-ascórbico.

Entretanto, as duas rotas acima acabaram sendo reavaliadas aos poucos, na consideração da presença de outros possíveis intermediários. Esse fato foi comprovado com os resultados que elucidaram, pelo menos parcialmente, as rotas de biossíntese em plantas (WHEELER et al., 1998). Experimentos recentes apontam para caminhos alternativos, revelando um quadro na biossíntese de ácido L-ascórbico bem mais complexo do que se esperava (WOLUCKA e VAN MONTAGU, 2003).

Pelo menos quatro rotas são cogitadas até o presente momento, sendo que duas são bem definidas, acabando por formar compostos precursores do ascorbato. Nesse ponto destacam-se inicialmente aquelas que envolvem a participação da L-galactose e GDP-L-gulose, do D-galacturonato, e do mio-inositol, considerados como intermediários propostos na biossíntese do ácido ascórbico, indicando que parte da via animal também pode estar operando em plantas. Cada uma dessas moléculas é representante de uma das rotas propostas para a biossíntese (WHEELER et al., 1998; WOLUCKA e VAN MONTAGU, 2003).

A biossíntese de ácido ascórbico a partir de D-glicose foi relatada pela primeira vez em ratos. Ele pode ser sintetizado *de novo* na rota do ácido hexurônico do fígado ou do rim de espécies através da atividade da L-gulono-1,4- lactona oxidase. No entanto, os seres humanos, os primatas não-humanos e alguns outros mamíferos não podem sintetizar o ácido ascórbico, porque o gene que codifica a L-gulono-1,4-lactona oxidase, a enzima que catalisa o último passo na biossíntese, foi altamente mutada se tornando não funcional nessas espécies. A presença em plantas de uma via semelhante à descrita em animais nunca foi descartada (WHEELER et al., 1998).

A superexpressão em alface e tabaco do gene que codifica a L-gulono-1,4-lactona oxidase de ratos possibilitou um aumento dos teores de ácido L-ascórbico nas plantas transgênicas em até sete vezes. Estes dados sugerem que pelo menos parte da via da síntese da vitamina C existente em animais pode estar presente nas plantas (RADZIO, et al., 2003).

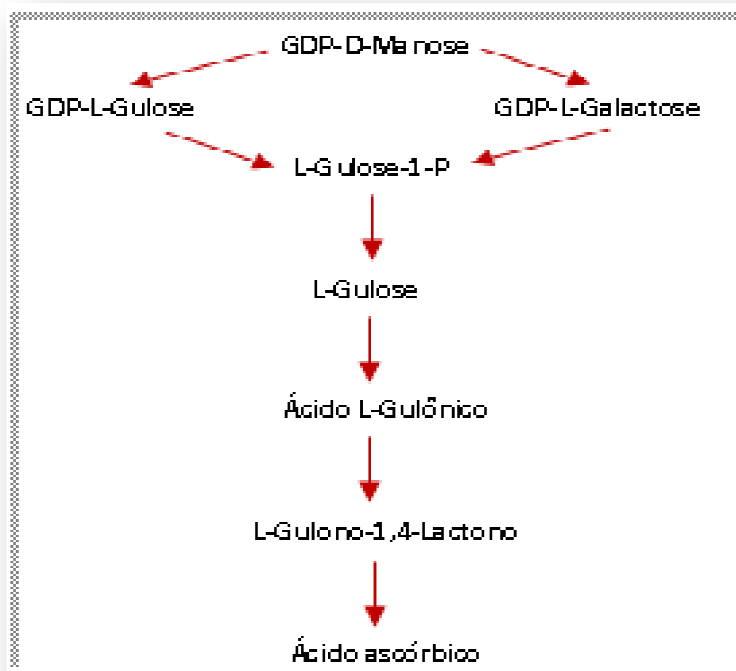
Segundo Radzio, et al., (2003) a expressão ectópica do gene da L- gulono-1,4-lactona oxidase recuperou o teor de ácido ascórbico em folhas em cinco *Arabidopsis* mutantes (VTC) que eram deficientes em ácido ascórbico (RADZIO, et al., 2003). Isto significa que ou a enzima L- gulono-1,4-lactona oxidase presente em ratos usa L-galactono-1,4-lactona como substrato, ou que o substrato real, L-gulono-1,4-lactona,

está sendo produzido em *Arabidopsis*. Como a produção de L-galactono-1,4-lactona é reduzida no mutante *vtc1*, a segunda possibilidade parece mais provável. Isso pode indicar que uma via alternativa está presente em plantas que podem contornar algumas etapas que envolvem a via da D-manose (VALPUESTA e BOTELLA, 2004).

Esse contorno se inicia através da atividade de uma outra enzima, a GDP-Manose 3',5' epimerase, que pode catalizar a conversão de GDP-D- Manose em GDP-L- Gulose, por epimerização 5' ou formar GDP-L-Galactose por epimerização 3',5', gerando no primeiro caso uma via biossintética denominada rota Wolucka/Van Montagu ou via da L-Gulose (WOLUCKA e VAN MONTAGU, 2003) (Figura 4).

Esses dois caminhos aparentemente ocorrem nas plantas, sendo que o “desvio” que gera GDP-L-Gulose é menos frequente ou ausente em algumas espécies. Soma-se o fato que a L-Gulose é um açúcar extremamente raro, sendo supostamente um componente não estrutural em plantas (WOLUCKA E VAN MONTAGU, 2003).

De acordo com Wolucka e Van Montagu, (2003), o resultado da epimerização da GDP-Manose varia e parece depender da forma molecular da enzima e de chaperonas moleculares Hsp70 reguladoras, nas quais podem estar envolvidas no envelhecimento e/ou regulação da epimerase.



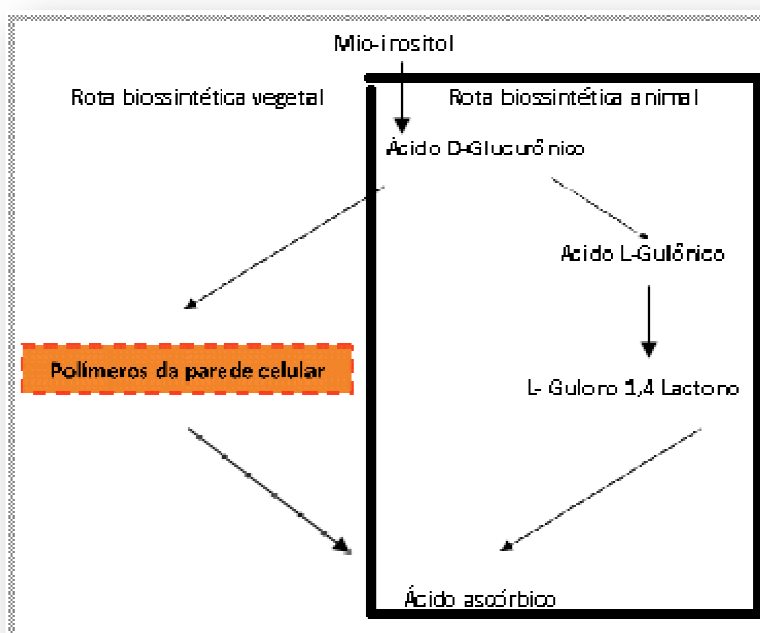
**Figura 4.** Via biossintética do ácido ascórbico proposta por Wolucka/Van Montagu.

A parede celular das células vegetais também pode ser um ponto de partida para a síntese do ácido ascórbico (DI MATTEO, et al., 2010). Alguns dos diferentes polímeros que a compõem são fontes de compostos que recentemente foram encontrados participando do processo biossintético. Particularmente um desses compostos, o ácido D-galacturônico, pode ser utilizado para desencadear uma via que culmina com a produção do ascorbato (Figura 5). Esse conjunto de reações parece estar envolvido em tecidos em que a parede celular está em um processo degradativo ou de elevado grau de desenvolvimento (DI MATTEO, et al., 2010). Segundo Radzio et al., (2003), diferentemente da via da D-Manose (GDP-L-Gulose e GDP-L-galactose) que prioritariamente se apresenta em tecidos foliares, a via do ácido D-Galacturônico aparece mais frequentemente nos frutos em desenvolvimento. Desse modo, outro caminho biossintético proposto em plantas inclui o ácido D-galacturônico como um precursor metabólico, gerando como precursor imediato da L-galactono-1,4-lactona o ácido L-galactônico (DI MATTEO et al., 2010). Segundo Agius et al., (2002) a superexpressão do gene da enzima ácido D-galacturônico redutase (GalUR) em *Arabidopsis thaliana* elevou o teor de vitamina C de duas a três vezes, demonstrando a viabilidade do aumento nos níveis de vitamina C em plantas utilizando esse gene, comprovando que o mesmo faz parte da biossíntese gerando o precursor da L-galactono-1,4-lactona.



Figura 5. Via biossintética derivada do ácido D-Galacturônico

Segundo Valpuesta e Botella, (2004), uma outra rota biossintética leva em consideração um intermediário até então desconhecido, o mio-inositol (Figura 6). Esse intermediário da via biossintética do ácido ascórbico nos animais, o ácido D-glucurônico, pode ser produzido pela ação de uma mio-inositol oxigenase, mas esta possibilidade ainda não havia sido cogitada e analisada em plantas. A partir do momento que foi disponibilizada a seqüência genômica completa de Arabidopsis foi propiciado aos pesquisadores procurar genes da mio-inositol oxigenase na planta, homólogos aquele existente em porcos. Como resultado foram encontradas quatro sequencias de leitura aberta nos cromossomos 1, 2, 4 e 5, que posteriormente, após refinamentos na busca documental da proteína indicou que a região codificante está presente no cromossomo 4 de Arabidopsis (VALPUESTA e BOTELLA, 2004). Depois de ser clonado e expresso em bactérias, a proteína recombinante mostrou atividade da mio-inositol oxigenase. A expressão ectópica do gene da mio-inositol oxigenase aumentou significativamente os níveis de ácido L-ascórbico em Arabidopsis transgênicas, mas a total contribuição do mio- inositol na biossíntese de ácido ascórbico *in vivo* ainda não foi bem esclarecida.



**Figura 6. Via alternativa da biossíntese do ácido ascórbico derivada do mio-inositol.**

Finalmente, baseado em evidências bioquímicas, em 1998 uma nova via foi proposta para a síntese do ácido ascórbico nas plantas que combinava dois fatos: a não

inversão do esqueleto de carbono e a ocorrência da L-galactono-1,4-lactona como o precursor imediato do ácido L-ascórbico. Essa via envolve a conversão do GDP-D-manose em GDP-L-galactose catalisada por uma manose GDP-3,5-epimerase. A L-galactose liberada a partir do nucleotídeo é o precursor imediato da L-galactono-1,4-lactona, que, por ação de uma desidrogenase é convertida em ácido ascórbico. A via da galactose como foi definida devido a participação desse composto, teve nos trabalhos de Wheeler et al (1998) uma descrição mais completa da rota biossintética do ácido L-ascórbico (Figura 7). Mesmo que alguns pontos ainda permaneçam obscuros é bem aceito que a L-galactono-1,4-lactona seja o precursor direto sendo transformado em ácido ascórbico. O precursor imediato é a L-galactose, que é oxidado a L-galactono-1,4-lactona dependente de uma NADH-L-galactose desidrogenase. A L-galactono-1,4-lactona é oxidada a ácido ascórbico catalizada pela ação da L-galactono-1,4-lactona desidrogenase. Recentemente, alguns pontos divulgados relativos a síntese do ascorbato auxiliaram ainda mais no entendimento do processo biossintético (SMIRNOFF, 2000).

A proposta de uma via principal presente em plantas, envolvendo a L-Galactose (L-Gal) foi confirmada quando esse composto foi aplicado de forma exógena em pedaços de folhas de cevada. O resultando foi um aumento nos níveis de ácido ascórbico existentes nesse tecido, sendo essa adição similar a causada pela adição L-Galactono 1,4-lactono (GalL). Para explicar a conversão da L-Galactose em L-Galactono 1,4-lactono uma nova enzima, a NAD L-galactose desidrogenase, foi postulada oxidando L-Gal no C1 para formar GalL (WHEELER et al., 1998).

De acordo com Wheeler et al., (1998) a presença de L-Gal livre nunca foi detectada em plantas, mas ela é um componente presente em pequenas quantidades em polissacarídeos da parede celular. A L-Galactose é proveniente da GDP-D-Manose é gerada por um processo de dupla epimerização no C3 e C5. A enzima responsável, a GDP-D-Manose 3'5' - epimerase é pouco conhecida, não possuindo maiores informações relativos a sua purificação ou clonagem entretanto, sua atividade de epimerase foi detectada em ervilhas e em extratos de *A. thaliana* (WOLUCKA e VAN MONTAGU , 2003). Além da GDP-L-Galactose (GDP-L-Gal), os produtos da reação da GDP-D-Manose (GDP-D-Man) incluem também L-Galactose-1-P (L-Gal-1-P) e L-Galactose (L-Gal). Como muito pouca D-manose e D-manose-1-P são formadas, isto sugere que existem enzimas específicas que sequencialmente executam a formação de L-Gal-1-P e L-Gal oriundas de GDP-L-Gal. Já a GDP-D-Manose é formada a partir de GTP e D-Manose-1-P pela ação da GDP-D-Manose pirofosforilase. Isto é confirmado

pela observação de que pelo menos 10% de Man D-[U-<sup>14</sup>C] aplicada exogenamente é convertido em o ácido ascórbico (AA) *in vivo* após um curto período marcação. O AA é, portanto, um produto que até então era de desconhecida importância do metabolismo do D-Manose. Curiosamente, os estudos preliminares da síntese de AA em mudas de ervilha mostraram que a Manose exógena elevava o pool de AA. Finalmente, GDP-D-Man e GDP-L-Gal também são substratos para a síntese de polissacarídeos e glicoproteínas, mas a formação de L-Gal-1-P e todas as reações parecem revelar que ele é dedicado a biossíntese de AA (WHEELER et al., 1998).

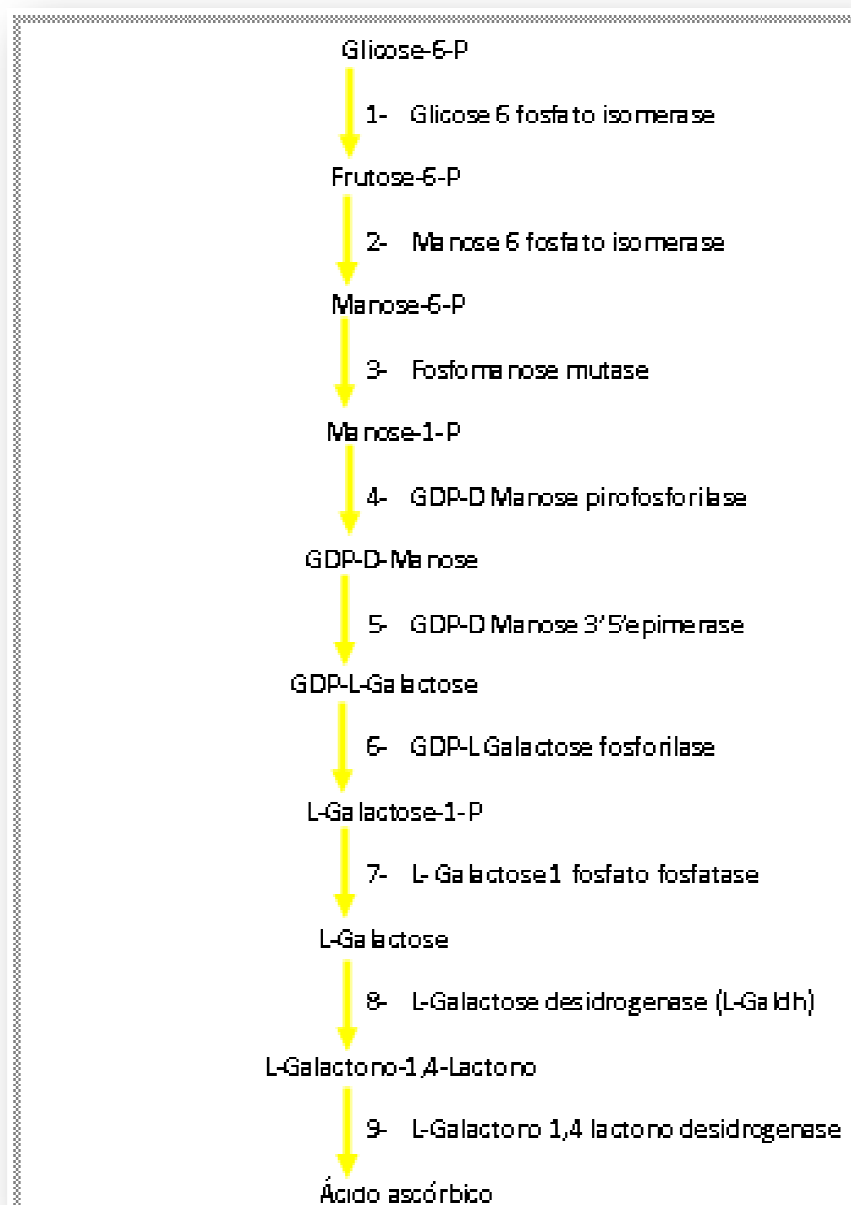


Figura 7. Via Wheeler/Smirnov da biossíntese do ácido ascórbico em plantas.

## 7. Enzimas exclusivas da Via Wheeler /Smirnoff

### 7.1 Manose fosfato isomerase

A manose fosfato isomerase (MFI) converte a D-Frutose-6-P em D-Manose-6-P, sendo assim o primeiro passo na direção de hexoses fosfatos no metabolismo da D-Manose. Apesar de sua possível importância na formação da manose, muito pouco se sabe sobre a manose fosfato isomerase (SMIRNOFF et al., 2001). Segundo Smirnoff et al., (2001), pesquisas anteriores relacionadas com a biossíntese de ácido ascórbico apontaram para uma provável carência da manose fosfato isomerase em plantas ou que nas mesmas as atividades enzimáticas eram muito baixas. Quando D-Manose exógena é prontamente fosforilada a D-Manose-6-P gera-se então um produto tóxico. Sua toxicidade pode resultar, em parte, de uma conversão muito baixa de D-Manose-6-P para D-Frutose-6-P e fosfatos glicosilados causando seqüestro de fosfato e, portanto, deficiência de ATP (SMIRNOFF et al., 2001). Entretanto, segundo Smirnoff et al., (2001), algumas espécies ou tecidos aparentemente requerem a atividade da MFI, por exemplo, aqueles que acumulam manitol como um dos principais produtos da fotossíntese e germinação de sementes que possuem reservas de armazenamento de mananas. Conseqüentemente, as sementes germinam mais facilmente nestas espécies que possuem níveis apreciáveis de atividade da MFI. Além disso, um grande número de espécies (incluindo as plantas umbeladas como aipo) sintetizam o manitol poliál para uso como um carboidrato a ser translocado. Estas plantas possuem atividade da MFI para formar D-Man-6-P, que é então reduzida a manitol-1-P pela manitol-6-P redutase. Evidências da atividade MFI são fornecidas pela rádio incorporação de D-Man marcadas em derivados de D-Fru-6-P em células cultivadas de espinafre, rosa, e milho. Entretanto D-[<sup>14</sup>C] manose não foi metabolizada como intermediários da via glicolítica em raízes de milho (SMIRNOFF et al., 2001) .

Em bactérias, leveduras e mamíferos as MFIs já foram clonadas. Em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acetobacter xylinum*, as atividades da MFI e GDP-D-Manose pirofosforilase residem em uma enzima bifuncional, enquanto em outros procariotos como *Escherichia coli* estas atividades são codificadas por genes separados (GRIFFIN, et al., 1997).

Segundo Maruta et al., 2008, apesar de todas as plantas sintetizarem a D-Manose, a existência de resultados contraditórios sugerem que a atividade MFI é



variável na maioria das plantas. No entanto, a menos que haja uma rota alternativa para a GDP-D-Manose, todas as plantas devem conter MFI. Uma rota alternativa através da formação de GDP Glicose-2-epimerase tem sido sugerida em pinheiros e *Lilium testaceum*. As conclusões foram baseadas em padrões de rádio marcação de resíduos do polissacarídeo manosil, sendo que a atividade enzimática não foi detectada diretamente. Outra evidência de que a GDP-Glicose não é uma fonte importante do GDP-Manose é fornecida pela diminuição no teor de manose dos polissacarídeos da parede celular em mutantes deficientes de GDP- Manose pirofosforilase *vtc1*. Isto sugere que uma parte substancial do pool de manose é produzida através do MFI (BARATA-SOARES, 2004)

Segundo Maruta et al., 2008, existe a necessidade de maiores informações a respeito da MFI, como por exemplo sua purificação ou clonagem gênica a partir de plantas.. Uma das informações mais importantes descobertas é que existem isoformas para a MFI. Essas isoformas denominadas MFI-1 e MFI-2, foram estudadas em *A. thaliana*, sendo verificado que apenas MFI-1 é essencial a biossíntese do ácido ascórbico. A indução da expressão da MFI-1 e um aumento no nível ácido ascórbico foram observados nas folhas sob luz contínua, enquanto que a indução da expressão da MFI-2 ocasionou uma diminuição no nível ácido ascórbico, sendo observado no escuro sob longo tempo dessa condição (MARUTA et al, 2008). MFI-1 mostrou um padrão de expressão diurna em paralelo com a atividade MFI total e com o conteúdo de AA totais nas folhas. Além disso, uma redução na expressão de MFI-1 através do uso de RNA de interferência (RNAi) resultou em uma diminuição substancial do conteúdo de AA total em folhas de inibindo a MFI-1 das plantas, enquanto que a inibição completa da expressão de MFI-2 não afetou os níveis totais de AA em folhas de plantas com a MFI-2 nocauteadas .

## 7.2 Fosfomanose mutase

As propriedades da fosfomano mutase (FMM) de plantas ainda não foram estudadas com grandes detalhes. A fosfomano mutase transforma a D-Manose-6-P em D-Manose-1-P. Assim, como a enzima está presente em outros organismos é sabido que se exige uma concentração baixa de açúcar bisfosfato como Man- ou Glc-1,6-bisfosfato, para a sua ativação nessas espécies (SMIRNOFF et al, 2001). Foi relatada que em folhas de milho podem conter duas enzimas com a atividade da FMM, uma que é

específica para manose, enquanto a outra, designada como fosfoglucomutase, tem a atividade similar com Glc-1-P e Man-1-P.

### **7.3 GDP-D-Manose Pirofosforilase (D-Manose-1-fosfato Guanilil transferase).**

Essa enzima foi caracterizada parcialmente a partir de certo número de fontes vegetais. Ela catalisa a conversão de Manose -1-P em GDP-D-Manose. O gene que codifica a GDP-D-Manose pirofosforilase de *A. thaliana* (VTC1) tem homologia significativa da seqüência com o de leveduras, mamíferos, e também de bactérias. A demonstração de que a *A. thaliana* mutante *vtc1*, deficiente do ascorbato teve redução da atividade da GDP-D-Manose pirofosforilase, tem prestado um apoio forte para a via proposta (SMIRNOFF et al., 2001).

### **7.4 GDP-D-Manose-3,5-Epimerase**

Esta enzima catalisa a transformação da GDP-D-Manose em GDP- L-Galactose. Muito pouco se sabe sobre essa epimerase, conhecendo-se apenas que ela só foi estudada em detalhes em *Chlorella pyrenoidosa* através do uso de  $^3\text{H}$  oriundo de  $^3\text{H}_2\text{O}$  sendo incorporado no C3 e C5 durante a reação de epimerização. Envolvendo assim a oxidação do álcool no C4 para uma cetona, eliminação da água e reutilizando a água na face oposta da dupla ligação, com redução da carbonila C4, também a partir da face oposta (SMIRNOFF et al, 2001). Sua atividade é fundamental para ambas as vias conhecidas derivadas da GDP-D-Manose, formando intermediários para a rota Wheeler/Smirnoff ou na síntese de GDP-L-Gulose na via Wolucka/Van Montagu (SMIRNOFF et al., 2001).

### **7.5 GDP-L-galactose fosforilase (L-Galactose guanililtransferase)**

Assim como as enzimas anteriores, pouco se estudou a respeito das características da GDP-L-galactose fosforilase. Segundo Linster et al. (2007), a sua presença foi verificada no momento que GDP-D-Manose foi adicionada como substrato da GDP-D-Manose-3,5-epimerase a extratos celulares, resultando sempre na formação da GDP-L-Galactose. Foi observado que a GDP-L-Galactose era convertida a L-

Galactose-1-P sendo esta, até então, a última enzima desconhecida da rota. Linster et al. (2007), mostraram ainda que a proteína codificada pelo VTC2, um gene mutante de *Arabidopsis thaliana* deficientes de vitamina C, é um membro da superfamília da proteína histidínica GalT/Apa1, que catalisa a conversão da GDP-L-galactose a L-galactose 1-fosfato em uma reação que consome fosfatos inorgânicos e produz GDP. Dowdle et al (2007), mostraram que a enzima pode ser codificada por dois genes relatando que *A. thaliana* expressa um segundo gene (At5g55120/VTC5) que também codifica a GDP-L-Galactose fosforilase, e que os duplos mutantes deficientes, VTC2 e VTC5 são incapazes de crescer a menos que seja complementada com ácido ascórbico.

### **7.6 L-Galactose 1 fosfato fosfatase**

A L-Galactose 1 fosfato fosfatase foi durante muito tempo negligenciada, aparentando não ser uma enzima que poderia participar da biossíntese do ácido ascórbico em plantas. Segundo Laing et al., (2004) foi descrita uma enzima específica para L-galactose-1-fosfato (L-Gal-1-P) com função fosfatase que foi parcialmente purificada a partir de frutos jovens de kiwis (*Actinidia deliciosa*). A enzima apresentou uma massa molecular nativa de 65 kDa. Entretanto, com os trabalhos de Conklin et al., (2006) foi confirmado o passo até então desconhecido na via Wheeler/Smirnoff. Essa enzima catalisa a conversão de L galactose 1 fosfato em L-Galactose, sendo que segundo os autores anteriormente citados várias questões permanecem desconhecidas. Segundo os mesmos, foi descoberto que a enzima está presente no locus VTC4 e que a síntese de ácido ascórbico foi aumentada quando se fez a introdução de um T-DNA em *Arabidopsis thaliana* contendo o gene da enzima provocando a elevação na síntese, comprovando a participação da enzima no processo (LAING et al., 2004).

### **7.7 L-Galactose desidrogenase (L-Galdh)**

A L-Galactose desidrogenase oxida a L-Galactose (L-Gal) no C1, formando Galactono 1,4 Lactono. Essa enzima foi purificada a partir de sementes de ervilha e informações sobre a seqüência N-terminal foi usada para clonar um gene de *A. thaliana* por RT-PCR. Este gene produz uma proteína com atividade de L-Galdh, quando expressa em *E. coli* (SMIRNOFF et al., 2001). Em ervilhas e em *A. thaliana* as enzimas recombinantes têm uma forte preferência por NAD sobre o NADP, possuindo valores

de  $K_m$  entre 0,08 e 0,3 mM de L-Gal. A L-Galdh reconhece a L-Gulose, L-sorbose e, no caso da enzima recombinante de *A. thaliana* L-fucose (= 6-desoxi-L-Gal). No entanto, nenhuma outra aldose de ocorrência comum (D-Ara, Gal D-, D-Man, e D-Glc) (D-Ara = D-arabinose) são oxidadas. Uma série de outras aldoses desidrogenases foram descritas a partir de bactérias, mamíferos e fungos. Todas elas diferem das enzimas de plantas por terem maior especificidade de substrato e possuírem afinidades açúcar substrato em até 10 vezes mais baixas. A D-arabinose desidrogenase (AraDh) está envolvida na síntese do eritroascorbato em fungos. A seqüência de *A. thaliana* da L-Galdh tem pouca semelhança com qualquer outros genes eucarióticos da enzima, possuindo cerca de 34% de identidade e 45% de semelhança com a seqüência prevista de aminoácidos da L-fucose desidrogenase de *Pseudomonas* (SMIRNOFF et al., 2001).

### 7.8 L-Galactono -1,4-lactona desidrogenase (GalLdh)

Como já citado, a via da Galactono -1,4- lactona já havia sido proposta desde 1954 por Isherwood, Chen e Mapson. A L-Galactono-1,4-lactona desidrogenase (GalLdh) é uma enzima que catalisa a conversão da L-Galactono -1,4-lactona em ácido ascórbico como último passo da biossíntese em plantas, finalizando a via Wheeler/Smirnoff (WHEELER et al., 1998). Para isso, a L-Galactono-1,4-lactono é usada como um primeiro substrato, pois a enzima necessita também de uma molécula oxidado para completar a reação. Segundo Ôba et al., (1995) e Østergaard et al., (1997), a GalLdh era uma enzima mitocondrial, mas sem especificar a região na organela. A enzima possui ainda um sítio FAD ligante. Ela é codificada por um gene nuclear que possui de cinco a seis éxons em sua estrutura, não sendo constituída por uma família multigênica.

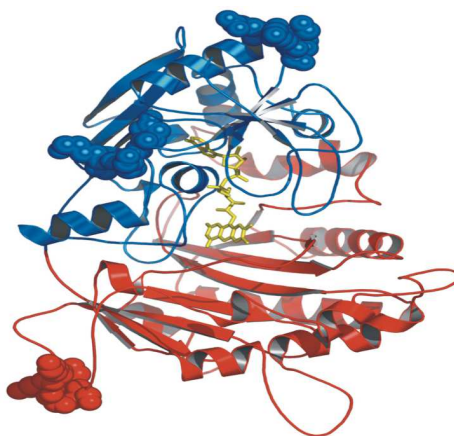
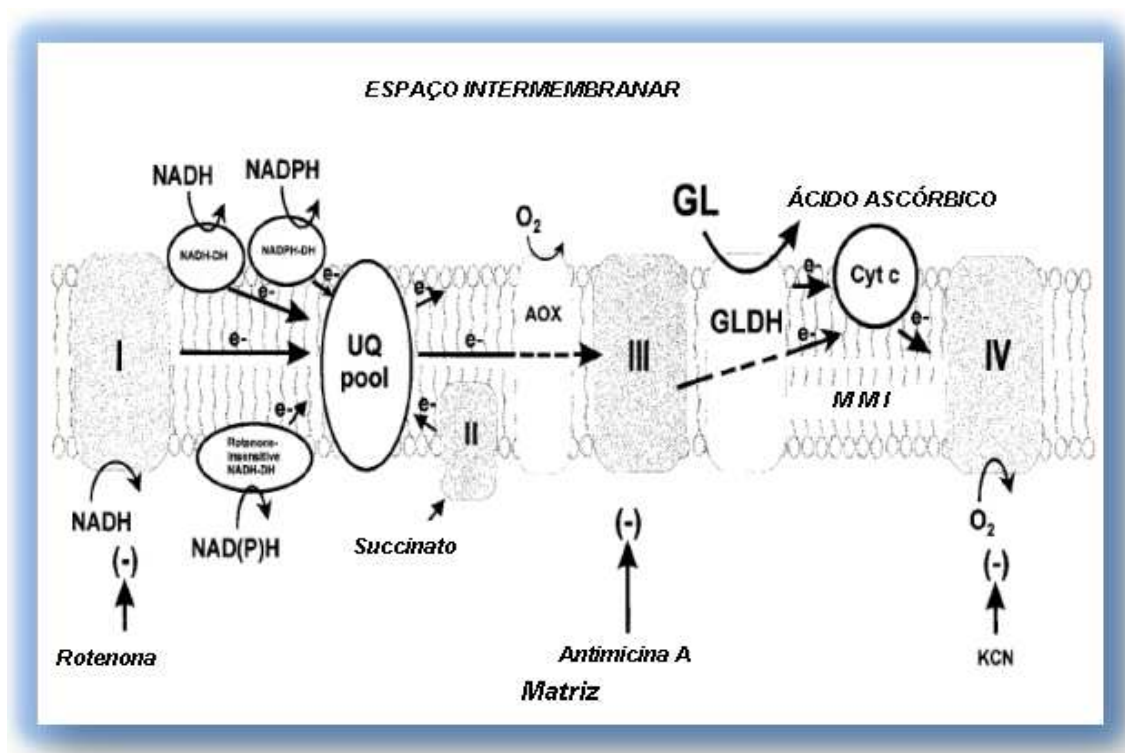


Figura 8. Modelo 3D da GalLdh com sítio FAD ligante em azul.

Uma importante descoberta a respeito da L-Galactono-1,4-lactono desidrogenase está relacionada a pesquisa realizada por Siedones et al., (1999), determinando que a GalLdh é uma enzima mitocondrial. As mitocôndrias foram isoladas e subfracionadas em gradiente de Percoll e enzimas marcadoras foram usadas para identificação da localização da mesma no interior da mitocôndria. Os resultados revelaram a presença da GalLdh na membrana mitocondrial interna. Segundo Bartoli et al. (2000) (Figura 9), a GalLdh está posicionada entre o complexo III e o complexo IV, sendo uma proteína transmembranar com sítio ativo posicionado na face externa da membrana possuindo o sítio FAD ligante também posicionado para a face externa. Nos experimentos desse grupo foram verificadas que as mitocôndrias isoladas no processo de separação podem sintetizar AsA na presença de L-Galactono-1,4-Lactono (GL) e que o citocromo C é reduzido juntamente com a GL, gerando AsA. Esses achados ocorreram paralelamente a verificação do fato que em folhas mais velhas a síntese de ácido ascórbico é diminuída. A GalLdh é também chamada de aldonolactona oxidorreductase é pertencente a família das flavoproteínas álcool vanílico oxidase (VAO). A maioria dos membros VAO são oxidases produtoras de peróxido de hidrogênio, a GalLdh de plantas, no entanto, usa exclusivamente o citocromo C (Cc), como acceptor de elétrons. A transferência de elétrons entre a GalLdh e o Cc presumivelmente envolve uma interação entre o a enzima e o Cc especificamente na região de resíduos carregados positivamente em torno da borda do grupo heme, sendo a parte da superfície onde o cofator heme é mais acessível (BARTOLI et al., 2000). Nenhuma estrutura cristalizada está disponível para a GalLdh ou seus homólogos, sendo assim, nenhuma informação está disponível sobre possíveis sítios de interação na superfície da proteína. A seqüência de aminoácidos da GalLdh, no entanto, contém um número acima da média dos resíduos carregados, principalmente de Glu e Lys, que poderiam estar envolvidos em interações de superfície.



**Figura 9. Modelo hipotético da interação da GalLdh e a cadeia de transporte de elétrons segundo Bartoli (2000).**

Um ponto importante sobre as interações da GalLdh remete sobre a localização da enzima na membrana mitocondrial interna e sua especificidade pelo citocromo C, revelando, um possível envolvimento com a cadeia respiratória e o transporte de elétrons mitocondrial. Para avaliar esse fato Bartoli et al., (2000) analisaram a velocidade na produção de ácido ascórbico em mitocôndrias intactas isoladas de tubérculos de batata, sendo constatado que na presença de ADP e NADH a velocidade se elevava em 20% quando cinco mililitros de Galactono-1,4-Lactono (GL), o substrato da GalLdh, era adicionado. A presença de GL no meio provocou um aumento acentuado na produção de ácido ascórbico, indicando que mitocôndrias isoladas são capazes de sintetizar ácido ascórbico a uma taxa elevada por meio da atividade da GalLdh. Inibidores respiratórios, como antimicina A e KCN foram adicionados, mostrando que ocorria diminuição da respiração na ausência ou presença de GL. No entanto, a produção de ácido ascórbico foi estimulada pela adição de antimicina A, um inibidor da citocromo C oxidoreductase (complexo III). Já a adição de KCN, um potente inibidor da citocromo c oxidase no (complexo IV) provocou inibição completa da síntese de ácido ascórbico. A inibição na produção de ácido ascórbico por KCN não foi devido a uma

diminuição da atividade da GalLdh, sendo que o KCN não inibe esta enzima em ensaios *in vitro* (BARTOLI et al., 2000).

A conexão do fluxo de elétrons na cadeia respiratória com a biossíntese do AA foi cogitada por Millar et al., (2003), atestando que o estado redox do complexo III influencia a síntese da vitamina C. O fluxo de elétrons oriundo dos complexos I e II pode sofrer desvio da via clássica de transporte de elétrons mediante a atividade da oxidase alternativa (AOX) (FINNEGAN et al., 2004). A atividade desacopladora da AOX, desviando o fluxo de elétrons para o oxigênio e formando água ao final, pode, segundo Bartoli et al., (2006) interferir na síntese de ácido ascórbico.

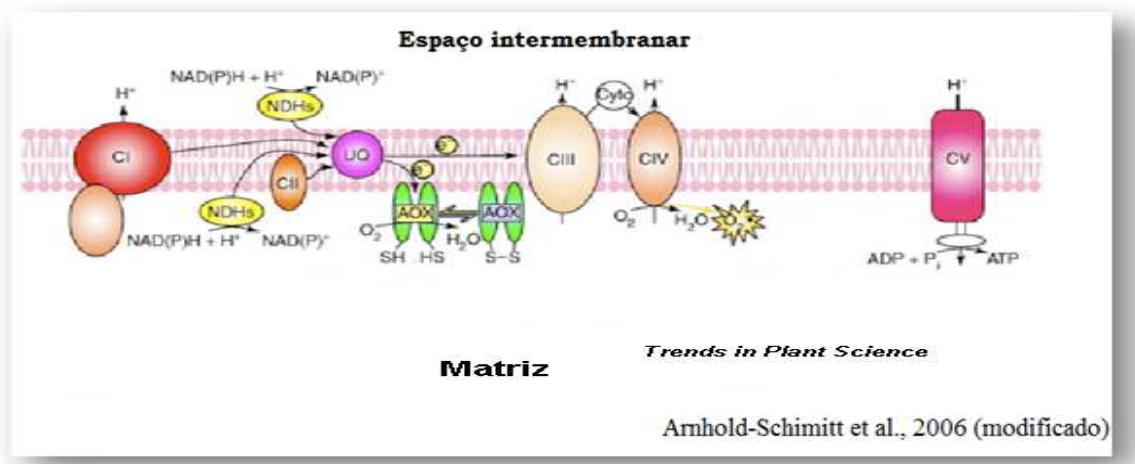
## **8. Oxidase alternativa (AOX)**

Nos vegetais, além da via clássica da respiração existe uma via de respiração alternativa composta pela oxidase alternativa (AOX). Essa enzima desvia o fluxo de elétrons da cadeia transportadora de elétrons desacoplando a respiração celular da produção de energia (CLIFTON, 2005). A AOX é uma enzima insensível ao cianeto, não-fosforilante e mediadora do caminho de elétrons a partir do pool de ubiquinona reduzida para oxigênio formando H<sub>2</sub>O (FINNEGAN et al., 2004).

A AOX está presente na membrana mitocondrial interna, ancorada entre os complexos II e III da cadeia transportadora de elétrons, com sítio ativo projetado para a matriz mitocondrial. Finnegan et al. (1997) cogitaram que os monômeros que a compõe podem formar um heterodímero, entretanto, evidências da presença de um homodímero ligados covalentemente ligado através de resíduos de cisteínas (forma oxidada) ou através de interações hidrofóbicas (forma reduzida) podem ser encontrados (BERTHOLD e STENMARK, 2003).

Ela desempenha funções como a termogênese, principalmente nas plantas da família Araceae. Outras funções atribuídas a AOX é a prevenção na formação de radicais livres, reprogramação celular durante situações de estresse e manutenção do ciclo do ácido tricarboxílico (MAXWELL et al., 1999; ARNHOLDT-SCHIMITT et al., 2006) (Figura 10). Whelan et al., (2009) afirmam que a AOX não é apenas um dos diversos componentes envolvidos na resposta de defesa contra as ROS, mas a sua atividade ou a falta de atividade conduz a uma alteração radical no equilíbrio celular defensivo e assim, portanto, ela desempenha um papel central na programação a resposta ao estresse.

A AOX pertence a uma família multigênica na qual possui uma expressão tecido-específico e/ou responsivo a situações causadoras de estresse (CLIFTON et al., 2005; COSTA et al., 2010). Os diferentes genes da AOX podem ser constituídos de três a cinco éxons, com predominância de quatro éxons dependendo da espécie (COSTA et al., 2010).



**Figura 10. Via da respiração alternativa da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial.** Em amarelo: NAD(P)H desidrogenase, em verde: oxidase alternativa e em azul: proteína desacopladora.

Em plantas, a AOX apresenta um grande número de isoformas que tem levado a questionamentos a respeito do papel que cada um dos membros da enzima possui no metabolismo celular. Um estudo desenvolvido por Considine et al. (2002) diferenciando os diversos genes da AOX em duas subfamílias gerou implicações importantes em relação ao contexto da expressão gênica. Esses mesmos autores propuseram que os genes da subfamília AOX1 são expressos em resposta a estresses enquanto os genes da subfamília AOX2 são expressos de maneira constitutiva ou relacionadas a tecidos fotossintetizantes.

Segundo Clifton et al., (2005) o gene da AOX2 de *Arabidopsis thaliana* desempenha um papel na comunicação entre a mitocôndria e o cloroplasto. Estudos em *Vigna unguiculata* demonstraram que a AOX é codificada por uma pequena família multigênica (AOX1, 2a e 2b), ortólogos à família Aox da soja (COSTA et al., 2010). Costa et al., (2010) demonstraram que o gene VuAox2b é co-expresso com o VuAox1 em várias condições de estresses abióticos, como ácido salicílico, osmótico e peróxido de hidrogênio em folhas de *Vigna unguiculata*, Enquanto isso, a isoforma VuAox2a manteve-se com um padrão de expressão constitutivo (COSTA et al., 2010). Segundo esses autores uma análise de bioinformática revelou que os promotores de VuAox1 e os



2b mostram uma região conservada relacionada com um cis-elemento que é sensível a stress oxidativo.

## **9. Objetivos**

### **9.1 Geral**

Comparar a expressão dos genes referentes as enzimas da via Wheeler/Smirnoff e das isoformas da Oxidase alternativa em dois clones BRS 236 Cereja e BRS 237 Roxinha de acerolas *Malpighia emarginata* DC possuidoras de diferentes níveis de ácido ascórbico.

### **9.2 Específicos**

- Comparar os níveis de ácido ascórbico existentes nos frutos verdes semimaduros e maduros dos clones BRS 236 Cereja e BRS 237 Roxinha de acerolas *Malpighia emarginata* DC..

- Avaliar a expressão gênica relativa as enzimas da via Wheeler/Smirnoff em flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros;

- Determinar o(s) gene(s) que gera(m) diferença(s) na biossíntese do ascorbato nos dois clones em flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros;

- Caracterizar os genes pertencentes as famílias da Oxidase alternativa;

- Comparar os níveis de transcritos da AOX1 e AOX2 em cada tecido e clone;

## 10. Material

O material vegetal foi coletado manualmente no campo experimental da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa, no município de Pacajús a 50 Km de Fortaleza no estado do Ceará. De plantas com cinco anos de idade, dos clones BRS 236 Cereja e BRS 237 Roxinha de aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC.) foram colhidas flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros. Esse material foi coletado as 10 horas da manhã, onde o material foi imediatamente colhido, cortado e congelado em nitrogênio líquido. O material foi identificado quanto ao estágio de desenvolvimento e respectivo clone, sendo que os frutos foram selecionados pela coloração, tamanho do fruto no referido estágio de desenvolvimento e pela idade aproximada de cada fruto obedecendo ao modelo de classificação proposto por Ferreira et al., (2009). A seleção dos frutos foi executada da seguinte forma: frutos verdes no estágio 1 ou verde intenso, frutos semimaduros no estágio 3 ou 25% vermelho ou róseo e frutos maduros no estágio 6 ou vermelho intenso ou vinho. As flores foram escolhidas pelo seu grau de desenvolvimento, sendo selecionadas aquelas que apresentavam os verticilos florais totalmente desenvolvidos, expostos e que possuíam o maior tamanho possível.

## 11. Métodos

### 11.1. Determinação dos teores de ácido ascórbico total pelo método de titulometria de Tillman.

#### i. Soluções:

##### - Solução de Tillman (DFI- 2,6 dicloro-fenol indofenol) 0,02%.

Para a preparação da solução de Tillman 50 mg de DFI foi inicialmente triturado em um graal, sendo adicionados pequenos volumes de água destilada aquecida (60°C), seguindo de filtração para um balão volumétrico de 250 ml. Em seguida foi filtrado 31 mg de NaHCO<sub>3</sub> (bicarbonato de sódio) com o restante da água aquecida, onde se esperou que o líquido esfriasse para então ser completado o volume do balão.

**- Solução de ácido oxálico 0,5%.**

A preparação da solução de ácido oxálico consistiu em se dissolver 5 g de ácido oxálico em 500 ml de água destilada transferindo-se para um balão volumétrico completando com água destilada, sendo armazenado em geladeira.

**- Solução padrão de ácido ascórbico  $\mu\text{g/ml}$** 

A solução padrão foi preparada utilizando 50 mg de ácido ascórbico em 200 ml de ácido oxálico 0,5% resfriado, sendo em seguida transferido para balão volumétrico e posteriormente a esse volume foi acrescentado ácido oxálico 0,5% até atingir o volume de 1000 ml ( $50 \text{ mg}/1000 \text{ ml}=50 \mu\text{g/ml}$ ).

**ii. Preparo do extrato.**

De amostras dos tecidos de frutos verdes, semimaduros e maduros dos clones Cereja e Roxinha de acerolas (*Malpighia emarginata* DC), foram separadas manualmente as películas externa dos frutos de todos os estádios, isolando a polpa e as sementes com o auxílio de um estilete. Dessas polpas foram pesadas 0,5 g, protegidas da luz e oxigenação. A essa massa de material foram adicionados 30 ml de ácido oxálico 0,5% (refrigerado), sendo completado o volume para 100 ml em seguida em um balão volumétrico com ácido oxálico 0,5%.

**iii. Padronização da solução de Tillman 0,02% com ácido ascórbico (AA).**

Da solução de ácido ascórbico ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) tomou-se 5 ml em um Erlenmeyer de 125 ml, completando até 50 ml com água destilada e em seguida titulou-se com a solução de Tillman refrigerada até a obtenção do ponto de mudança ou “viragem” (róseo claro, persistente por no mínimo 15 segundos). O reagente muda sua coloração de azul a para róseo em meio ácido. Foram feitas três repetições para o cálculo do título do reagente, ou seja, a quantidade de ácido ascórbico necessária para titular 1 ml da solução de Tillman.

Tabela 2. Peso da polpa e volumes de DFI utilizados no cálculo do título e da quantidade de ácido ascórbico (mg) em 100g de polpa.

	BRS 236 Cereja			BRS 237 Roxinha		
Estádio de desenvolvimento	Fruto verde	Fruto semimaduro	Fruto maduro	Fruto verde	Fruto semimaduro	Fruto maduro
Peso de polpa (g)	<u>0,54</u>	<u>0,58</u>	<u>0,56</u>	<u>0,57</u>	<u>0,56</u>	<u>0,5</u>
Volume de DFI utilizado para titular (ml) Repetição	4,7	3,0	2,3	2,2	1,8	1,4
	4,6	3,0	2,3	2,3	1,7	1,5
	4,5	3,1	2,3	2,3	1,7	1,5
Média	<u>4,6</u>	<u>3,03</u>	<u>2,3</u>	<u>2,26</u>	<u>1,73</u>	<u>1,46</u>

**iv. Cálculo do Título:**

- a) Das três repetições (2,6 ml, 2,7 ml e 2,7 ml) da solução de padronização do DFI foi obtido um volume de 2,66 ml em média para titular 5 ml de ácido ascórbico (5 ml da solução de AA foi retirado do volume de 1L; 5 ml x 50 µg = 250µg):

$$2,66 \text{ ml} \text{-----} 250 \text{ } \mu\text{g de ácido ascórbico}$$

$$1,0 \text{ ml} \text{-----} X = 93,77 \mu\text{g/ml (Título)}$$

**v. Determinação de ácido ascórbico no extrato:**

- a) 0,54 g-----50 ml (no balão de 50 ml com 50 ml de ácido oxálico)

$$X(\text{g}) \text{-----} 2,0 \text{ ml (alíquota retirada do volume de 50 ml)}$$

$$X = 0,0216 \text{ g (fruto verde cereja)}$$

$$1,0 \text{ ml de DFI} \text{-----} 93,77 \mu\text{g/ml}$$

$$4,6 \text{ ml de DFI} \text{-----} X = 431,06 \mu\text{g/ml} = 0,43106 \text{ mg}$$

$$0,0216 \text{ g} \text{-----} 0,43106 \text{ mg}$$

$$100 \text{ g} \text{-----} X = \underline{1995,37 \text{ mg/100g (fruto verde cereja)}}$$

- b) 0,58 g-----50 ml

$$X(\text{g}) \text{-----} 2,0 \text{ ml}$$

$$X = 0,0232 \text{ g (fruto semimaduro cereja)}$$

$$1,0 \text{ ml de DFI} \text{-----} 93,77 \mu\text{l/ml}$$

$$3,03 \text{ ml de DFI} \text{-----} X = 285 \mu\text{g/ml} = 0,285 \text{ mg}$$

$$0,0232 \text{ g} \text{-----} 0,285 \text{ mg}$$

$$100 \text{ g} \text{-----} X = \underline{1228,44 \text{ mg/100g (fruto semimaduro cereja)}}$$

- c) 0,56 g-----50 ml  
 X(g)-----2,0 ml  
 X= 0,0224 g (fruto maduro cereja)  
 1,0 ml de DFI-----93,77 $\mu$ l/ml  
 2,3 ml de DFI-----X=215,6 $\mu$ g/ml=0,2156mg  
 0,0224 g-----0,2156 mg  
 100 g-----X=962,81 mg/100g (fruto maduro cereja)
- d) 0,57 g-----50 ml  
 X(g)-----2,0 ml  
 X=0,0228 g (fruto verde roxinha)  
 1,0 ml de DFI-----93,77 $\mu$ g/ml  
 2,26 ml de DFI-----X=210,9 $\mu$ g/ml=0,2109mg  
 0,0228 g-----0,2109 mg  
 100 g-----X=925 mg/100g (fruto verde roxinha)
- e) 0,56 g-----50 ml  
 X(g)-----2,0 ml  
 X= 0,0224 g (fruto semimaduro roxinha)  
 1,0 ml de DFI-----93,77 $\mu$ g/ml  
 1,73 ml de DFI-----X=164 $\mu$ g/ml=0,164mg  
 0,0228 g-----0,164 mg  
 100 g-----X=732,14 mg/100g (fruto semimaduro roxinha)
- f) 0,5 g-----50 ml  
 X(g)-----2,0 ml  
 X=0,02 g (fruto maduro roxinha)  
 1,0 ml de DFI-----93,77 $\mu$ g/ml  
 1,46 ml de DFI-----X=135,9 $\mu$ g/ml=0,1359mg  
 0,02 g-----0,1359 mg  
 100-----X=679 mg/100g (fruto maduro roxinha)

## 12. Caracterização da Oxidase alternativa de *Malpighia emarginata* DC.

### 12.1 Extração do RNA total.

Foram utilizadas 200 mg de folhas, flores e frutos verdes, semimaduros e maduros dos dois clones Cereja e Roxinha de acerola *Malpighia emarginata* DC, sendo

cortados em pequenos pedaços e macerados em nitrogênio líquido com auxílio de gral e pistilo para disrupção das paredes celulares e membranas. O isolamento do RNA total foi feito com o uso do kit comercial RNeasy plant Mini kit® (Quiagen) (Figura 11), sendo que para a caracterização dos genes da Oxidase alternativa foram utilizadas folhas jovens de acerolas comuns. Os demais tecidos dos clones comerciais foram utilizados para as análises de expressão das enzimas da via Wheeler/Smirnoff bem como as isoformas da Oxidase alternativa. Os lisados celulares pulverizados produzidos pelo processo da disrupção foram transferidos para tubos de 1,5 ml (tubos para centrifugação em microcentrífuga) e a estes foram adicionados 450 µl de tampão RLC a seguir submetidos a uma centrifugação a 8000 g por 2 minutos. O produto gerado apresentava duas fases uma superior aquosa e uma inferior contendo restos celulares. A fase superior foi coletada por pipetagem e posteriormente adicionada em uma mini coluna do "kit" ("QIAshedder spin column"- de cor lilás, acoplada a um tubo coletor de 2ml) e em seguida centrifugada a 8000 g por 2 minutos. 450µl do eluído foram recuperados e transferidos para um novo tubo "Eppendorf" de 2 ml sendo adicionados 0,5 volumes de etanol 95% (225µl) misturando-se por pipetagem. Posteriormente, foram transferidos 700 µl dessa mistura para uma nova coluna do "kit" ("RNeasy mini spin column" – de cor rósea, acoplada a um tubo coletor de 2 ml) e efetuada uma centrifugação a 8000 g por 15 segundos. O eluído foi descartado, sendo que posteriormente foi adicionado à coluna 700 µl de tampão RW1. Esse processo foi executado em duas etapas onde inicialmente foram adicionados 350 µl de RW1 (50%), sendo seguido pela adição de 80µl de desoxirribonuclease (DNase). Após serem deixadas em descanso por 15 minutos, as colunas foram adicionados mais 350 µl de RW1 e novamente processou-se uma centrifugação a 8000 g por 15 segundos. A coluna foi depois transferida para um novo tubo coletor e adicionados 500 µl do tampão RPE e submetido a nova centrifugação de 8000 g por 15 segundos. O eluído foi posteriormente descartado e o tubo coletor foi reutilizado na mesma coluna. 500 µl de RPE foi adicionado à coluna e esta centrifugada à 8000 g por 2 minutos para remoção de qualquer resíduo de etanol que poderia interferir com as reações subsequentes. O eluído e o tubo coletor foram descartados e a coluna reutilizada com um novo tubo coletor de 1,5 ml. Finalmente foram adicionados 40 µl de água livre de RNase diretamente à coluna e esta centrifugada a 8000g por 1 minuto para completa eluição. O eluído era o RNA total que foi posteriormente armazenado à -20<sup>0</sup> C para subsequentes análises

eletroforéticas e RT-PCR. A concentração e integridade do RNA foram avaliadas por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose 1,5%.



Figura 11. Esquema da extração de RNA total pelo kit RNeasy plant Mini kit (Quiagen®).

## 12.2 Quantificação do RNA total

A quantificação e verificação da pureza dos RNAs foram realizadas por medidas de absorbância em 230, 260 e 280 nm e suas respectivas relações  $^{260}/_{230}$  na qual devem ser superiores a 2,0 e  $^{260}/_{280}$  na qual devem ficar no intervalo entre 1,7 e 2,0, utilizando um espectrofotômetro da marca PHARMACIA BIOTECH, modelo ULTROSPEC 2000 e confirmadas em um Nanodrop 2000c da marca Thermo Scientific. Para observação do grau de pureza do RNA usou-se a relação (D.O260/D.O280). O fator de diluição da amostra foi de 100 (2  $\mu$ l da amostra em 198  $\mu$ l de água milli-Q), sendo a concentração obtida pela expressão abaixo:

1-D.O (Densidade óptica) em 260 nm indica uma concentração de 40  $\mu$ g/ml

$$[\text{RNA}] = 40 \mu\text{g/ml} \times D \times A_{260}$$

onde,

D - Fator de diluição usado para fazer a leitura;

$A_{260}$ - Leitura obtida no comprimento de onda de 260nm.

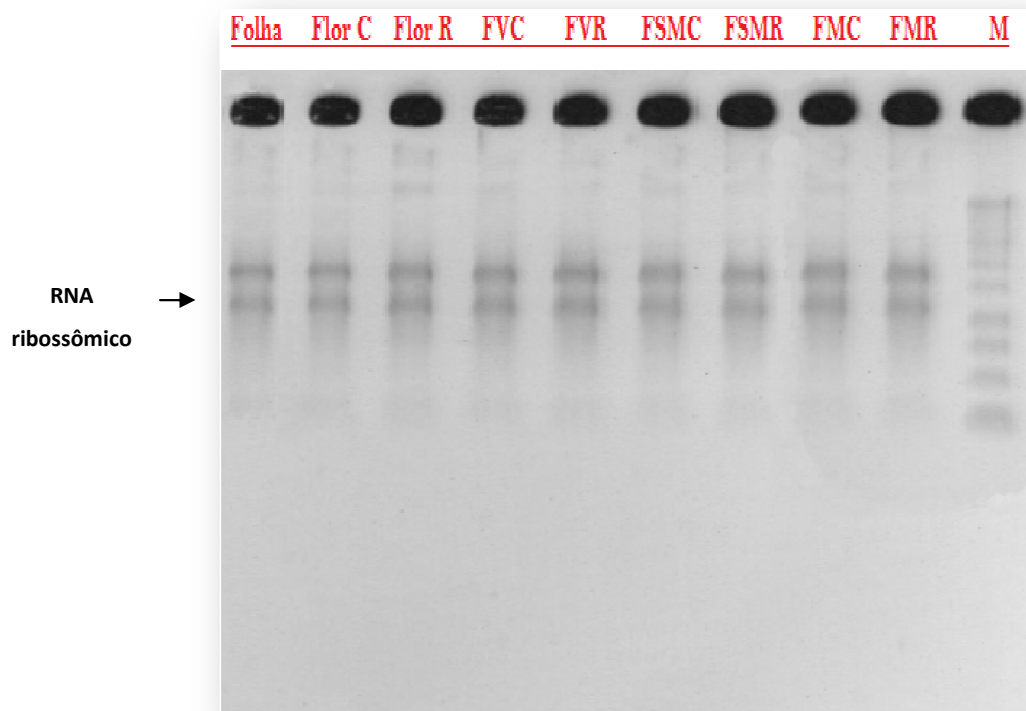
Tabela 3. Leituras espectrofotométricas dos RNAs totais isolados dos tecidos de *Malpighia emarginata* DC (C significa cereja e R Roxinha)

Tecido	Acido Nucléico Concentração	Unidade	A260	A280	260/280	260/230	1µg	0,5 µg
Folha	1,352	µg/µl	0,338	0,176	1,92	1,93	0,70	0,35
Flor C	2,0695	µg/µl	51,738	28,073	1,84	1,04	0,48	0,24
Flor R	0,7177	µg/µl	17,94	9,4	1,91	1,28	1,4	0,7
Fruto verde C	0,0838	µg/µl	2,094	1,226	1,71	0,71	12,04	6,02
Fruto verde R	0,326	µg/µl	8,149	4,628	1,76	0,88	3,125	1,55
Fruto semimaduro C	0,156	µg/µl	3,899	2,278	1,71	0,76	6,41	3,2
Fruto semimaduro R	0,1905	µg/µl	4,763	2,744	1,74	0,83	5,2	2,6
Fruto maduro C	0,0838	µg/µl	2,094	1,226	1,71	0,71	12	6,25
Fruto maduro R	0,0595	µg/µl	1,487	1,058	1,41	1,29	16	8,3

### 12.3 Eletroforese do RNA Total para verificação da integridade

Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% diluído em tampão MOPs 1X para observação das bandas correspondentes às subunidades ribossomais. A eletroforese foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA modelo GNA 100 (7.5x10cm) utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power - pac 300) com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 90 minutos à temperatura de 25 °C. Foi aplicado no gel o equivalente a 1 µg da amostra de RNA total dos tecidos. O gel foi tratado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por aproximadamente 15 minutos e as bandas foram detectadas pela emissão de fluorescência obtida pela exposição do gel a raios ultravioleta (Figura 12).





**Figura 12.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% diluído em tampão MOPS do RNA total extraído de folhas de acerolas comuns, flores (Cereja e Roxinha), frutos verdes (FV Cereja, FV Roxinha) frutos semimaduros (FSM Cereja, FSM Roxinha) e frutos maduros (FM Cereja, FM Roxinha), mostrando as subunidades ribossomais. As bandas foram visualizadas em brometo de etídio 0,5 µg/ml, sob luz ultravioleta. M- marcador de peso molecular 1 Kb *Ladder* (Invitrogen®).

#### 12.4 Reações de transcrição reversa e de PCR

A síntese do cDNA foi realizada pelo kit ImpromII™ Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante utilizando 0,5 µg de RNA total e oligoT<sub>18</sub> como iniciador para reação de transcrição reversa.

**Tabela 4.** Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa.

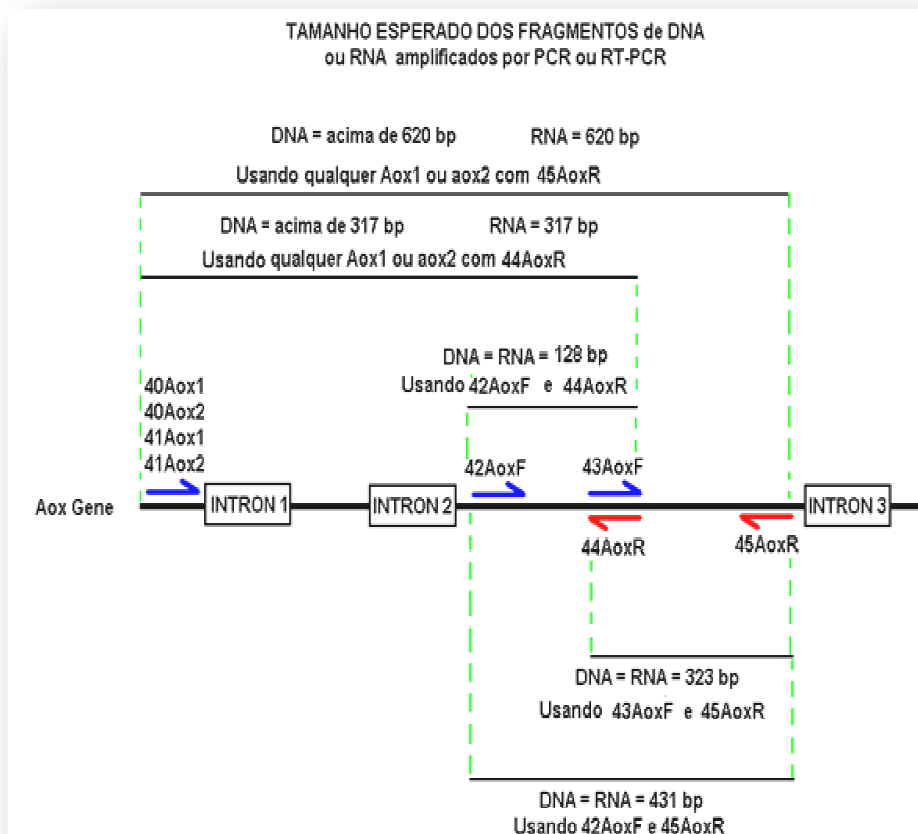
RNA total (µl)	Variável em função da leitura espectrofotométrica para 0,5 µg de RNA total
Tampão 5x (µl)	4,0
dNTPs 5mM (µl)	2,0
Oligo dT18 (µl)	2,0
MgCl <sub>2</sub> 25mM (µl)	2,4
H <sub>2</sub> O Mili Q q.s.p. 20µl	Variável em função do volume de RNA total
Transcriptase reversa (µl)	1,0

**Tabela 5. Leituras espectrofotométricas obtidas dos produtos de transcrição reversa dos tecidos analisados de *Malpighia emarginata* DC (C significa cereja e R Roxinha)**

<b>Tecido</b>	<b>Acido Nucléico Concentração (µg/µl)</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>	<b>1µg</b>
Folha	0,3193	9,676	8,52	1,14	1,16	3,131851
Flor C	0,3039	9,21	10,923	0,84	0,82	3,290556
Flor R	0,3145	9,532	8,847	1,08	1,11	3,17965
Fruto verde C	0,3154	9,558	9,132	1,05	1,03	3,170577
Fruto verde R	0,3193	9,676	8,52	1,14	1,16	3,131851
Fruto semimaduro C	0,7491	22,699	14,978	1,52	1,72	1,334935
Fruto semimaduro R	0,6934	21,012	13,642	1,54	1,8	1,442169
Fruto maduro C	0,3114	9,436	7,966	1,18	1,23	3,211304
Fruto maduro R	0,3097	9,384	10,114	0,93	0,94	3,228931

## 12.5 Desenho dos pares de oligonucleotídeos (primers) senso e antisenso degenerados da AOX.

Os primers senso e antisenso da AOX foram desenhados a partir da coleta de 60 seqüências de AOX1 e AOX2 presentes no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essas seqüências foram alinhadas através do uso da ferramenta de bioinformática Clustaw2 constante no banco de genes europeu EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). O alinhamento possibilitou a seleção de regiões conservadas onde foram definidas as duas ideais para o par de primers chamados de 42 AoxF e 45 AoxR (senso e antisenso respectivamente) como mostrado na figura 13. A região do gene a ser amplificada está compreendida no éxon 3.



**Figura 13. Modelo estratégico para a escolha das regiões nas quais foram desenhados primers senso e antisenso da Oxidase alternativa AOX.**

Após a identificação das regiões no gene da AOX os “primers” foram desenhados se inserindo os nucleotídeos degenerados nas posições que havia diferenças entre as seqüências. Para o primer antisenso a região definida para ser o oligonucleotídeo foi analisada com a escolha de uma das sequencias alinhadas no software Reverse complement ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)), onde em seguida, obedecendo ao modelo universal de nucleotídeos sintéticos representativos dos tipos de degenerações (Tabela 6), foram inseridos na referida sequencia usando a ferramenta OligoAnalyzer presente no site <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx> observando os requisitos necessários para o desenho de primers.

**Tabela 6. Leituras espectrofotométricas obtidas dos produtos de transcrição reversa dos tecidos analisados de *Malpighia emarginata* DC (C significa cereja e R Roxinha)**

<b>Mistura de bases</b>	<b>Bases degeneradas</b>
<b>A+C+G+T</b>	<b>N</b>
<b>A+C+G</b>	<b>V</b>
<b>A+T+G</b>	<b>D</b>
<b>T+C+G</b>	<b>B</b>
<b>A+T+C</b>	<b>H</b>
<b>A+T</b>	<b>W</b>
<b>C+G</b>	<b>S</b>
<b>T+G</b>	<b>K</b>
<b>A+C</b>	<b>M</b>
<b>C+T</b>	<b>Y</b>
<b>A+G</b>	<b>R</b>

### **12.6 Isolamento de DNA de folhas de aceroleiras usando o tampão CTAB.**

Para o isolamento do DNA foi usado o tampão de extração CTAB segundo Doyle e Doyle (1990). Inicialmente, o tampão foi aquecido a 60 °C em banho-maria. O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido com auxílio de um gral e pistilo. Foi adicionado o pó ao tampão, em pequenas quantidades, agitando-as a medida que foram colocadas no tampão evitando assim a formação de grumos. As amostras foram incubadas a 60 °C em banho-maria de 30 a 60 minutos. Igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v/v), aproximadamente 600 µl, foi misturado por inversão lentamente várias vezes. Esse conteúdo foi centrifugado a 2500 rpm por 15 min a temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida para um novo tubo com o cuidado para não capturar a fase inferior a fase aquosa. Em seguida, foi adicionado 2/3 volumes de isopropanol 100% para limpar a fase aquosa, misturando lentamente para que o DNA formasse o complexo DNA-CTAB e precipitasse. O precipitado foi coletado por centrifugação a 1000 rpm em temperatura ambiente por 2 minutos, onde pôde ser retirado com o uso de uma pipeta. O pellet foi lavado com 500 µl de etanol 70%, recentrifugado a 1000 rpm por 2 minutos. O DNA foi deixado para secar no tubo, removendo com o uso de uma pipeta etanol residual. Ao remanescente foi adicionado o tampão TE (Tris – EDTA) pH 8,0 (1-2 ml).

### 12.7 Amplificação da região compreendida pelos primers 42 AoxF e 45 AoxR do gene da Oxidase alternativa através da Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).

A amplificação dos genes (amplicons) da AOX foi realizada pela reação em cadeia da DNA polimerase (PCR sigla em inglês) utilizando o sistema GoTaq® DNA Polimerase (Promega, Estados Unidos) utilizando pares de primers degenerados desenhados com base nas seqüências dos genes de cada AOX. Os produtos de PCR semiquantitativas foram visualizados em géis de agarose de 1,5% e corados com brometo de etídio 0,5 µg/ml (Tabela 7).

**Tabela 7. Componentes e quantidades de reagentes utilizados nas reações de PCR.**

DNA (µl)	Variável em função da leitura espectrofotométrica equivalente a 1µg do DNA
H <sub>2</sub> O Mili Q q.s.p. 25µl	Variável em função da leitura espectrofotométrica da do DNA isolado
Tampão 5x (µl)	5,0
dNTPs 5mM (µl)	1,0
TAQ polimerase (µl)	0,1
Primer senso AOX 42F (µl)	0,75
Primer anti senso AOX 45R (µl)	0,75

### 12.8 Eletroforese do material amplificado

Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, diluído em tampão TBE 1X, para observação das bandas correspondentes aos fragmentos amplificados da AOX. Foram aplicados no gel 5 µl da amostra amplificada por PCR junto com 1 µl de azul de bromofenol. No mesmo gel foi também aplicado o marcador (100 Base-Par Ladder - PHARMACIA BIOTECH DO BRASIL). A eletroforese foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA, modelo GNA 100 (7.5x10cm), utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power -

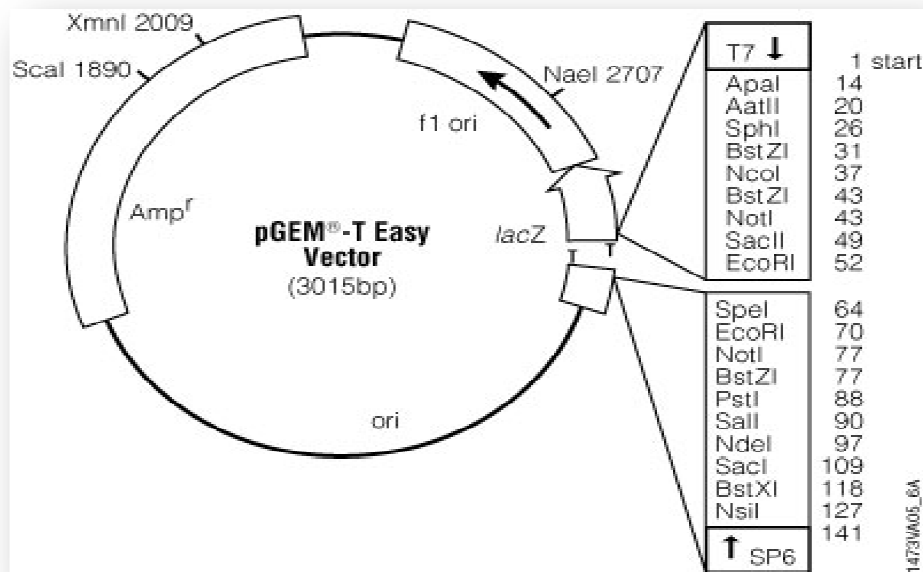
pac 300) com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 1 hora à temperatura de 25<sup>o</sup> C. O gel foi corado com brometo de etídio (1,5 µg/ml), colocado sob agitação por 15 minutos e posteriormente lavado com água Milli-Q para remoção do excesso de brometo de etídio. O gel foi, em seguida, observado num fotodocumentador modelo Mini Bis Pro da Bio-imaging Systems acoplado a um computador, sendo utilizado o programa Gel Capture para avaliar o tamanho das bandas obtidas na eletroforese através do número de seus pares de bases.

**Tabela 8. Programa de PCR utilizados para amplificação dos genes da AOX de *Malpighia emarginata* DC**

Pré desnaturação	94 °C	3 minutos
30 ciclos para as três etapas abaixo		
Desnaturação	94 °C	1 minuto
Anelamento	55 °C	1 minuto e 10 segundos
Extensão	72 °C	1 minuto e 10 segundos
Extensão final	72 °C	∞

### 12.9 Purificação e ligação dos produtos de PCR

Os produtos amplificados referentes aos genes da Oxidase alternativa por PCR foram purificados antes das reações de ligação ao vetor plasmídico e clonagem por transformação genética em *Escherichia coli*. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% sendo que ao final da migração eletroforética os mesmos foram purificados usando o kit QIAEXII (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante antes de ligar no vetor plasmídico pGEM-Teasy (Promega, USA) (Figura 14). Bactérias *Escherichia coli*, cepa JM109, foram usadas para a transformação.

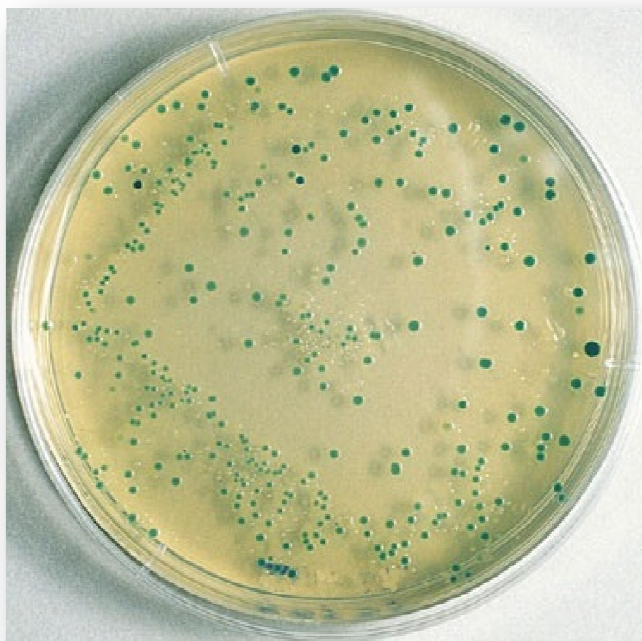


**Figura 14.** Mapa circular do vetor de clonagem pGEM-TEasy, com destaque para os diferentes sítios de restrição de endonucleases, genes de resistência a ampicilina e gene *lac Z* que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase (Fonte Promega).

### 12.10 Transformação de bactérias de *Escherichia coli* cepa JM109 para a caracterização da Oxidase alternativa (AOX)

A transformação consistiu da incorporação do plasmídeo recombinante (vetor plasmídico contendo o produto de PCR) através do método do cloreto de cálcio. Bactérias de *E. coli* foram cultivadas em 2 ml de meio LB (NaCl 1%; Peptona 1%; Extrato de levedura 1,0%) à 37°C a 125 rpm durante a noite (aproximadamente 16 horas). Feito isso, 100  $\mu$ l da cultura de bactérias foram transferidas para um erlenmeyer contendo 10 ml de LB à 37 °C a 125 rpm durante, aproximadamente, 1 hora. Para cada DNA clonado foi usado 1 ml dessa cultura, sendo em seguida submetidas a uma centrifugação de 5000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 500  $\mu$ l da solução I (KCl 10mM; MOPS 10mM). Em seguida, mais uma vez a solução foi centrifugada a 5000 rpm por 2 minutos onde no fim o sobrenadante foi, mais uma vez, descartado. O precipitado ressuspense em 500  $\mu$ l da solução II (KCl 10mM; MOPS 10mM; CaCl<sub>2</sub>1M) e incubado durante 15 minutos em contato com gelo, depois centrifugado nas mesmas condições anteriores. Contudo, foi retirado apenas 400  $\mu$ l da solução II, pois nos 100  $\mu$ l restante as bactérias de *E. coli* foram ressuspensas com bastante cuidado para não causar a destruição da célula devido a fragilidade da parede e

membrana celular causada pelo cloreto de cálcio. Nesse momento, 10 µl de produto de ligação (de cada produto de PCR purificado) foi adicionado. Mais uma vez, as bactérias foram incubadas em contato com gelo por, aproximadamente, 75 minutos. Passado esse tempo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico. Depois de tiradas do contato do gelo foram postas em um banho-maria à 42 °C por 1 minuto e, imediatamente, postas em contato, novamente, com gelo por mais 10 minutos. Agora, foi adicionada a solução de 100 µl mais 1000 µl de LB líquido. Assim, 1100 µl de cultura de bactérias foram incubadas à 37 °C a 125 rpm por 90 minutos antes da última centrifugação a 5000 rpm por 2 minutos. 1000 µl de foram descartados e o precipitado continha as bactérias ressuspensas nos 100 µl restantes. Essa cultura de bactérias foi espalhada em meio LB ágar (contendo X-Gal 2%; IPTG 50 mM; carbenicilina 100 µg/ml) e incubadas à 37 °C por, aproximadamente, 24 horas. O resultado mostra colônias brancas e azuis: as brancas sendo as positivas (contém o vetor de ligação adicionado do produto de PCR) e azuis negativas. Apesar da coloração realizou-se uma PCR em colônia para verificar o sucesso da transformação (Figura 15).



**Figura 15. Placa de Petri mostrando colônias transformadas (brancas) com o vetor e não transformadas (azuis).**



### **12.11 Estimativa da transformação de *Escherichia coli* através de PCR em colônia.**

Da placa de Petri com as colônias transformadas um total de quarenta e seis colônias foram selecionadas, sendo que a coloração não se apresentou totalmente brancas em algumas colônias. Com um palito de madeira estéril tocou-se na colônia sendo em seguida agitada em 50 µl de água ultrapura (mili-Q) para causar plasmólise e liberar o material genético da bactéria. 2,5 µl dessa água mili-1 foi usado para realizar uma PCR. O par de primer escolhido para a reação foram os primers universais M13F (senso) e M13R (reverso) que são específicos para o vetor plasmidico utilizado, pGEMT-easy vector, na região adjacente ao local de inserção dos produtos de RT-PCR.

### **12.12. Mini-preparação plasmidial**

Uma colônia de *Echerichia coli* JM 109 isolada, previamente avaliada por PCR, foi coletada com um toque de um palito estéril, adicionada a um erlenmeyer contendo 10 ml de meio Terrific Broth (Tabela 9) contendo carbenicilina 100 µg/µl e incubada a 37 °C, sob agitação de 145 rpm durante uma noite. Em seguida, 1,2 ml do meio foi centrifugado por 2 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão com 200 µl de solução I (25 mM de Tris pH 8,0 e 10 mM de EDTA), mais 300 µl de solução II (0,2 M de NaOH e SDS 2%), aguardou-se 5 minutos a temperatura ambiente e em seguida adicionou-se acetato de K<sup>+</sup> 3 M pH 5,2. A mistura foi então centrifugada por 10 minutos a 13000rpm a temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma extração com fenol/clorofórmio 1:1 e mais uma vez centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm. Recuperou-se o sobrenadante, adicionou-se igual volume de isopropanol 100% gelado e centrifugou-se a 13200 rpm por 5 minutos. O precipitado foi então lavado com 500 ml de etanol 80%, centrifugado por 5 minutos a 13200 rpm. O etanol foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em água livre de RNA sendo em seguida mantido a 37 °C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 8 µl de NaCl 4M e 40 µl de PEG 8000 13% e deixou-se no gelo por 20 minutos e posteriormente centrifugou-se por 15 minutos a 11500 rpm a 4 °C. O precipitado foi então lavado com 500 µl de etanol 80% frio, mais uma vez centrifugado por 5 minutos a 13200 rpm. O etanol foi então descartado e ao tubo foram adicionados 20 µl de água (Mili –Q autoclavada).

**Tabela 9. Volumes utilizados do Meio Terrific Broth para realização de minipreparação.**

<b>Terrific Broth (TB)</b>	<b>Quantidade/litro</b>
Triptona	12 g
Extrato de levedura	24 g
Glicerol	4 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.31 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.54 g

### **12.13. Seqüenciamento dos fragmentos gênicos da AOX inseridos nos plasmídios**

Os clones selecionados foram seqüenciados na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP/Botucatu). O seqüenciamento gerou um arquivo digital que foi analisado pelos programas conhecidos como Phred, Cross-macht e Phrap. A seguir, as seqüências obtidas foram comparadas com seqüências já anotadas em bancos de dados usando a ferramenta BLAST (Basic Local Aligment Search Tool).

### **12.14. Caracterização das isoformas da Oxidase alternativa**

Os fragmentos seqüenciados revelaram regiões que puderam ser alinhadas com sequencias da AOX1 e AOX2 de *Arabidopsis thaliana* obtidas no NCBI. Esse alinhamento pôde mostrar qual dos clones pertencia as referidas isoformas da AOX em função do escore apresentado como parâmetro de identidade, sendo analisado no programa Clustaw2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

### **12.15. Análises da expressão gênica das enzimas participantes da via Wheeler/Smirnoff e da Oxidase alternativa 1 e 2 (AOX1 e AOX2 específicos).**

**12.15.1. Desenho dos pares de oligonucleotídeos (primers) senso e antisenso dos genes das enzimas da via Wheeler/Smirnoff (degenerados e específicos para *Malpighia emarginata* DC) e específicos da AOX1 e AOX2 de *Malpighia emarginata* DC.**

Os “primers” específicos senso e antisenso utilizados na amplificação dos fragmentos da AOX1 e AOX2 foram desenhados após a análise das regiões sequenciadas dos genes. Já os “primers” relativos aos genes do conjunto de enzimas presentes na via biossintética do ácido ascórbico foram desenhados a partir de seqüências disponibilizadas no NCBI. Das nove enzimas participantes da biossíntese da vitamina C, quatro delas foram obtidas através de sequencias de cDNA específicas para a *Malpighia emarginata* DC. (GDP-manose pirofosforilase, GI:80973463; GDP-galactose fosforilase, GI:196174884; L-galactose desidrogenase , GI:196174886 e L-galactono 1,4 lactono desidrogenase, GI:196174882), onde seus cDNAs foram prontamente usados no desenho dos primers através do uso da ferramenta de bioinformática Perl Primer. Sequencias de diferentes espécies das outras enzimas foram obtidas no NCBI (glicose-6-fosfato isomerase, manose 6 fosfato isomerase e L-galactose-1-fosfato fosfatase), sendo que a fosfomanomutase e a GDP-manose 3,5-epimerase possuíam um número insuficiente de sequencias de cDNA para que os primers fossem desenhados pelo alinhamento das mesmas, revelando a necessidade de serem anotadas sequencias gênicas de espécies com o genoma totalmente descritos. Nesse caso foi utilizada a plataforma Phytozome e suas ferramentas de bioinformática para a anotação gênica dessas duas enzimas em espécies disponibilizadas no site <http://www.phytozome.net/>. Após as anotações as seqüências foram alinhadas através do uso da ferramenta de bioinformática Clustaw2 constante no banco de genes europeu EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). O alinhamento possibilitou a seleção de regiões conservadas sendo então efetuado a montagem de pares de primers de cada conjunto de cDNA alinhado referente as enzimas da via. Após essa escolha os primers foram desenhados inserindo os nucleotídeos degenerados nas posições que havia diferenças entre as seqüências. Para o primer antisenso a sequencia eleita para ser o oligonucleotídeo foi submetida anteriormente ao programa Reverse complement ([http://www.bioinformatics.org/sms/rev\\_comp.html](http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html)), sendo ambas as sequencias (senso e antisenso) usadas em seguida na ferramenta Oligo Analyzer no site <http://www.idtdna.com/Home/Home.aspx> observando os requisitos necessários para o desenho de primers. Além da amplificação por PCR das regiões flanqueadas pelos pares de “primers” referentes aos cDNAs das enzimas da via biossintética do ácido ascórbico e das isoformas da AOX, novas reações em cadeia da polimerase foram executadas usando um par de primers degenerado do fator de alongação alfa utilizado como elemento constitutivo, servindo como referencial dos amplicons de cada enzima.

**Tabela 10. Pares de primers degenerados e específicos\* usados na análise da expressão gênica da AOX1, AOX2 e genes da via Wheeler/Smirnoff**

Primer	5' Sequencia 3'
AOX1 senso (42AOX F)	GCDGCDGTBCCDGGVATGGT
AOX1 antisenso (45AOX R)	TCVCKRTGRTGHGTCYTCRTC
AOX1 senso (AOX1-F)*	GCTTCACTGCAAGTCATTGAGG
AOX1 antisenso (AOX1-R)*	AGTGTGGAGTTAGGTGGGAGG
AOX2 senso (AOX2-F)*	TTTGCATCTGAGGTCTCTTCGC
AOX2 antisenso (AOX2-R)*	GGAACATTCTCGATCTTACCCTC
Glicose fosfato isomerase senso (GPI-F)	GCHTTYTGGGACTGGGTWGG
Glicose fosfato isomerase antisenso (GPI-R)	CCATADGCAAGRGCATCWGG
Manose fosfato isomerase senso (MPI-F)	GTBMAGVAYTACGADTGGGG
Manose fosfato isomerase antisenso (MPI-R)	TATGCRTGBGGYTCRITDGC
Fosfomanose mutase senso (PMM-F)	CTYACWGCKCCVAGRAAGG
Fosfomanose mutase antisenso (PMM-R)	GWGAYACRTTSAGCATYCC
GDP-Manose pirofosforilase senso (GMP-F)*	ACTCAGTGTCCCTAAGCC
GDP-Manose pirofosforilase antisenso (GMP-R)*	TTCCATAACCACCACACC
GDP-Manose 3'5'epimerase senso (GME-F)	GATGCHTGGCCTGCWGAG
GDP-Manose 3'5'epimerase antisenso (GME-R)	CTTCCRATGTTYACYGGC
GDP-Galactose fosforilase senso (GGP-F)*	GTTTGAAGCGAGTGAGG
GDP-Galactose fosforilase antisenso (GGP-R)*	GACCAGGCATTTAGGAG
Galactose fosfato fosfatase senso (GPP-F)	ARRGCCAGGTGGAYTTGG
Galactose fosfato fosfatase antisenso (GPP-R)	CCARGGRCCCHCCAAAKCC
L-Galactose desidrogenase senso (Galdh-F)*	AATTCCACGCCCAAACC
L-Galactose desidrogenase antisenso (Galdh-R)*	GTGAAGACGCTCAACGG
L-Galactono 1,4 lactono desidrogenase senso (GalLdh-F)*	TTAGGGAGCAGCAGATTGG
L-Galactono 1,4 lactono desidrogenase antisenso (GalLdh-R)*	CAACAGCATCGGTGTATGG

### **12.15.2. Amplificação dos genes da via Wheeler/Smirnoff, AOX1 e AOX2 pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase (PCR).**

A amplificação dos diferentes genes foi realizada pela reação em cadeia da DNA polimerase (PCR sigla em inglês) utilizando o sistema GoTaq® DNA Polimerase (Promega, Estados Unidos) utilizando pares de primers específicos ou degenerados de cada gene, desenhados com base nas sequencias dos genes de cada enzima analisada. Os resultados das RT-PCR semiquantitativas foram visualizados em géis de agarose de 1,5% e corados com brometo de etídio 0,5 µg/ml. As amplificações por PCR semi

quantitativa foram previamente desenvolvidas com três números de ciclos (27, 30 e 33 ciclos) a fim de se verificar aquele que se adequava a análises de expressão gênica, sendo eleitos 30 ciclos.

### 12.15.3 Eletroforese do material amplificado dos genes da via Wheeler/Smirnoff, AOX1 e AOX2

Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,5%, diluído em tampão TBE 1X, para observação das bandas correspondentes aos genes de cada enzima. Foram aplicados no gel 5 µl da amostra amplificada por PCR junto com 1 µl de azul de bromofenol. No mesmo gel foi também aplicado o marcador (100 Base-Par *Ladder* - PHARMACIA BIOTECH DO BRASIL). A eletroforese foi realizada em aparelho da marca PHARMACIA, modelo GNA 100 (7.5x10cm), utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua BIO RAD (Power - pac 300) com amperagem constante 50 mA por aproximadamente 1h à temperatura de 25 °C. O gel foi corado com brometo de etídio (1,5µg/ml), colocado sob agitação por 15 minutos e posteriormente lavado com água Milli-Q para remoção do excesso de brometo de etídio. O gel foi, em seguida, observado num fotodocumentador modelo Mini Bis Pro da Bio-imaging Systems acoplado a um computador, sendo utilizado o programa Gel Capture para avaliar o tamanho das bandas obtidas na eletroforese através do número de seus pares de bases.

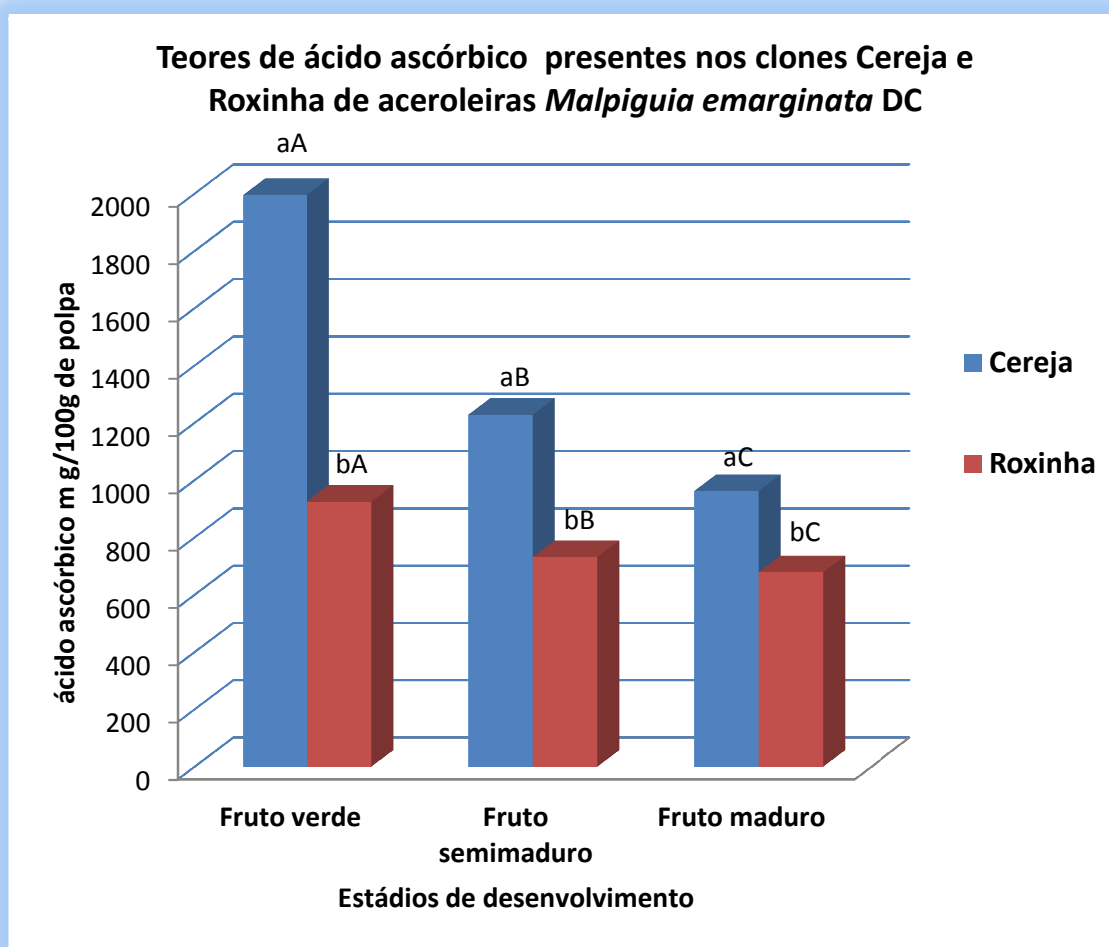
**Tabela 11. Programas de PCR utilizados para os genes da via Wheeler/Smirnoff e AOX1 e AOX2 de *Malpighia emarginata* DC.** A temperatura de anelamento para cada par de primer foi de 54 °C para GGP, GPP, 55 °C para GPI, MPI, Galdh, GalLdh, AOX1 e AOX2 e de 56 °C para PMM, GMP e GME

Pré desnaturação	94 °C	3 minutos
30 ciclos para as três etapas abaixo		
Desnaturação	94 °C	1 minuto
Anelamento	Variável em função dos Tms dos primers	1 minuto e 10 segundos
Extensão	72 °C	1 minuto e 10 segundos
Extensão final	72 °C	∞

### 13. Resultados

#### 13.1. Dosagem dos teores de ácido ascórbico total presente nos clones Cereja e Roxinha de *Malpighia emarginata* DC.

A dosagem dos teores de ácido ascórbico total presente em 0,5 µg de polpa dos frutos em três estádios de desenvolvimento revelou que os frutos verdes do clone Cereja possuem 1995,37 mg/100g de ácido ascórbico, sendo que em frutos verdes do clone Roxinha essa taxa é de 925 mg/100g de polpa. Já em frutos semimaduros do clone Cereja, o teor de ácido ascórbico alcança o valor de 1228,44 mg/100g de polpa. No clone Roxinha, a quantidade de ácido ascórbico foi de 732,14 mg/100g de polpa de frutos semimaduros. Já para frutos maduros foi verificado que no clone Cereja há uma quantidade de 962,81 mg/100g de ácido ascórbico. O clone Roxinha apresenta uma quantidade ácido ascórbico de 679 mg/100g de polpa (Figura 16).

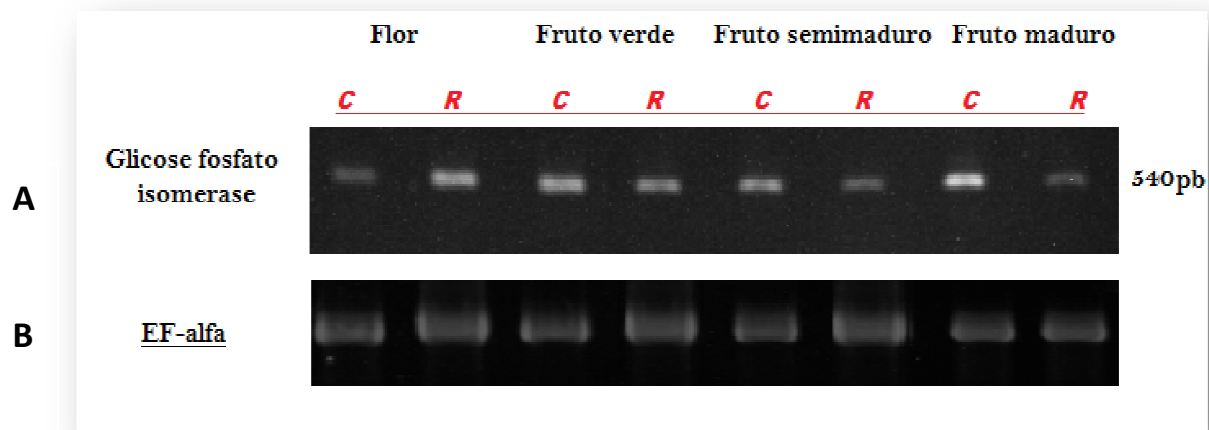


**Figura 16.** Teores de ácido ascórbico dos clones BRS236 Cereja e BRS237 Roxinha presentes em três estádios de desenvolvimento de frutos (frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros), em mg de ácido ascórbico por 100g de polpa, obtidos pelo método de titulometria de Tillman. As letras diferentes indicam níveis estatisticamente diferentes, onde as minúsculas mostram os valores diferindo estatisticamente no mesmo estágio de desenvolvimento entre os clones, já as letras maiúsculas demonstram diferenças estatísticas entre os estádios de desenvolvimento, mas no mesmo clone. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey com  $p < 0,05$

### 13.2. Expressão gênica da Glicose fosfato isomerase

A expressão do gene da Glicose fosfato isomerase revelou com o uso de um par de primers degenerados, desenhados a partir de sete seqüências de cDNA presentes no NCBI, bandas de 540 pb. A amplificação por RT-PCR semiquantitativa e a visualização da corrida eletroforética executada em um gel de agarose 1,5% mostrou uma leve variação nos tecidos examinados após esse gel ter sido corado por 10 minutos em uma solução de brometo de etídio (Figura 17). Em flores foi encontrada uma expressão mais elevada no clone Roxinha que aquela apresentada no clone Cereja. Já em relação aos frutos verdes aparentemente, foi verificado uma expressão levemente superior no clone Cereja em comparação com o clone Roxinha. Esse padrão de expressão se repetiu com uma pequena variação para os frutos semimaduros. Nestes, a expressão gênica apresentada pelo clone Cereja permaneceu mais elevada que aquela existente no clone Roxinha. Entretanto, a banda relativa ao clone Roxinha mostrou uma intensidade aparentemente menor que aquela existente em frutos verdes. Esse padrão de expressão se repetiu nos frutos maduros analisados. Nestes frutos, ocorreu uma maior intensidade de expressão gênica no clone Cereja, bem superior aquela apresentada no clone Roxinha. Foi verificado ainda que ocorreu um gradual aumento da expressão no clone Cereja e um comportamento inverso no clone Roxinha, a medida que o desenvolvimento dos frutos era avaliado.

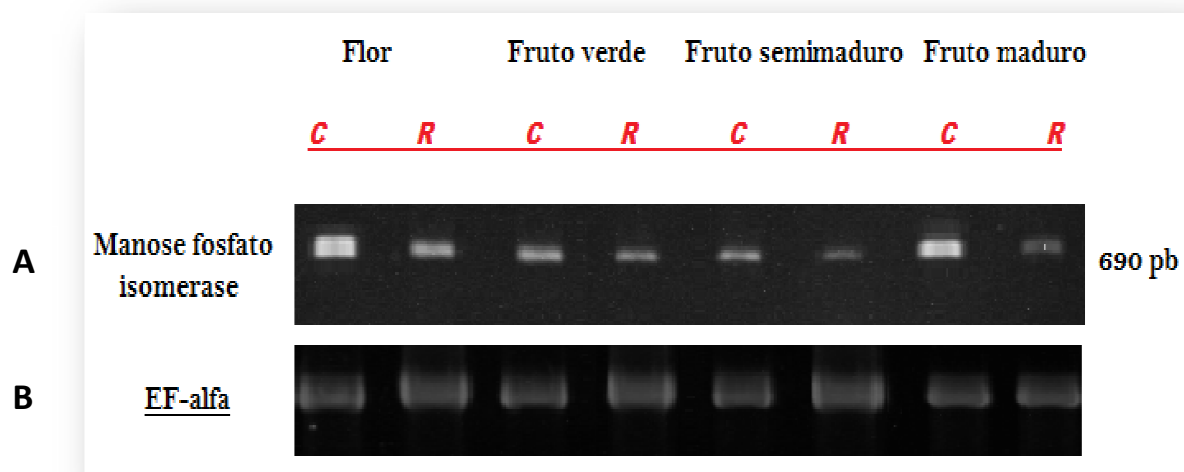




**Figura 17.** Gel de agarose 1,5% do gene da Glicose fosfato isomerase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde **C** significa clone Cereja e **R** clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de elongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

### 13.3. Expressão gênica da Manose fosfato isomerase

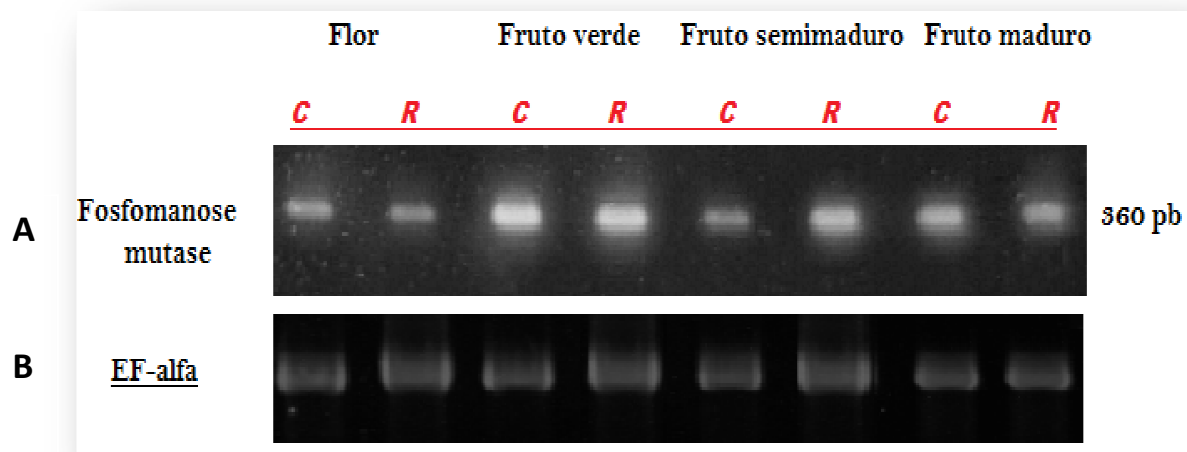
A manose fosfato isomerase catalisa a conversão da D-Frutose-6-P em D-Manose-6-P, sendo assim o primeiro passo na formação de hexoses fosfatos. Seis sequências de cDNA obtidas no NCBI e alinhadas no programa ClustalW2 presente no banco de genes europeu EMBL possibilitou o desenho de um par de primers degenerados, responsáveis pela amplificação de um fragmento de 690 pb (Figura 18). Sua expressão gênica mostrou um padrão peculiar nos tecidos avaliados de *Malpighia emarginata* DC. Em flores foi verificado que a expressão gênica para o clone Cereja foi bem mais elevada que aquela apresentada pelo clone Roxinha. Quanto aos frutos verdes dos clones analisados, a diferença não se mostrou muito evidente. A expressão gênica no clone Cereja se mostrou levemente superior aquela verificada nos frutos verdes do clone Roxinha. A análise da expressão gênica da Manose fosfato isomerase nos frutos semimaduros de aceroleiras mostrou um padrão similar aquele verificado em frutos verdes. Entretanto, a expressão verificada em frutos do clone Roxinha foi menor que aquela encontrada em frutos verdes. O clone Cereja também teve uma diminuição em sua expressão quando comparada a expressão gênica de frutos verdes. A expressão gênica dos clones Cereja e Roxinha de frutos maduros apresentou uma elevação quando comparada com frutos verdes e frutos semimaduros. O clone Cereja teve uma expressão gênica superior que a encontrada no fruto maduro do clone Roxinha. Em ambos os clones, a expressão gênica foi superior aquelas apresentadas nos outros estádios de maturação analisados.



**Figura 18.** Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Manose fosfato isomerase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

#### 13.4. Expressão gênica da fosfomanose mutase

A avaliação dos transcritos em flores dos clones cereja e roxinha de aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC) mostrou não haver uma diferença, apesar de que o clone Cereja aparenta uma expressão gênica levemente superior, mas visualmente parece não ser relevante (Figura 19). Em relação a frutos verdes, ocorreu uma elevação da expressão gênica de ambos os clones em comparação com aquela apresentada por flores. Em frutos verdes do clone Cereja houve uma expressão levemente superior a apresentada por frutos verdes do clone roxinha de *Malpighia emarginata* DC. Essa expressão superior em frutos verdes não permaneceu em frutos semimaduros, onde ocorreu uma diminuição dos transcritos de ambos os clones. Em frutos semimaduros do clone cereja, a expressão gênica da manose fosfato isomerase foi inferior a do clone roxinha. Esse padrão de expressão dos frutos semimaduros do clone roxinha permaneceu em frutos maduros. Aparentemente sem distinção dos clones cereja e roxinha os transcritos apresentam um padrão não muito diferente daqueles apresentados por frutos verdes e semimaduros.



**Figura 19.** Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Fosfomanose mutase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

### 13.5. Expressão gênica da GDP-manose pirofosforilase

A expressão gênica da GDP-manose pirofosforilase em flores de aceroleiras, *Malpighia emarginata* DC, não apresentou diferenças entre os clones cereja e roxinha. Entretanto, se verificou que analisando comparativamente com o fator de alongação alfa, usado como elemento constitutivo, a expressão gênica da enzima não foi mais baixa em nenhum dos clones analisados (Figura 20). Já a expressão do gene em frutos verdes de aceroleiras mostrou que o clone Cereja possui uma expressão superior aquela observada no clone roxinha. Esse padrão de expressão não foi observado em sua plenitude em frutos semimaduros, pois nestes ocorreu uma maior expressão gênica da GDP-manose pirofosforilase em frutos do clone Roxinha. Já em frutos maduros, a expressão gênica da GDP-manose pirofosforilase sofreu um aumento em ambos os clones. Foi verificado que o clone Cereja apresentou uma expressão levemente superior aquela verificada no clone Roxinha, sendo as duas bem mais expressas que o elemento constitutivo usado como controle.

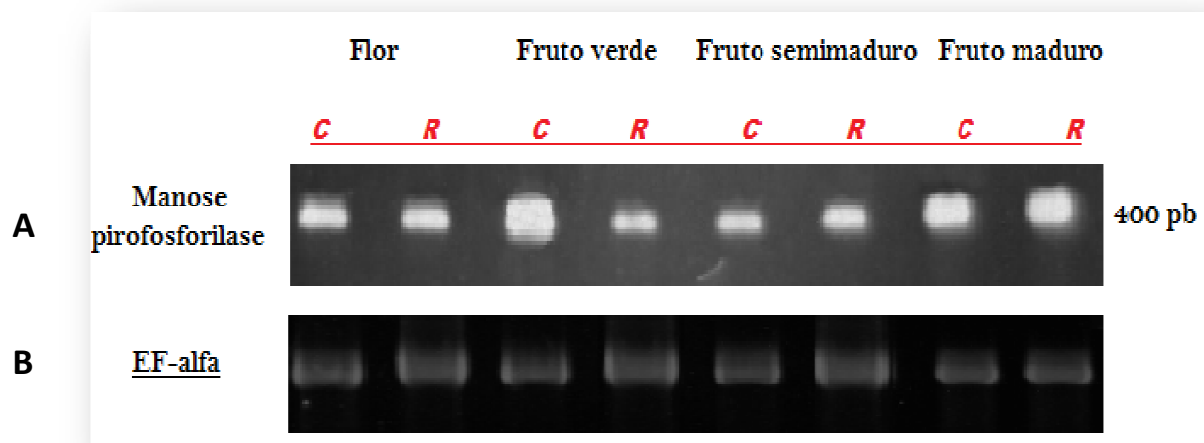
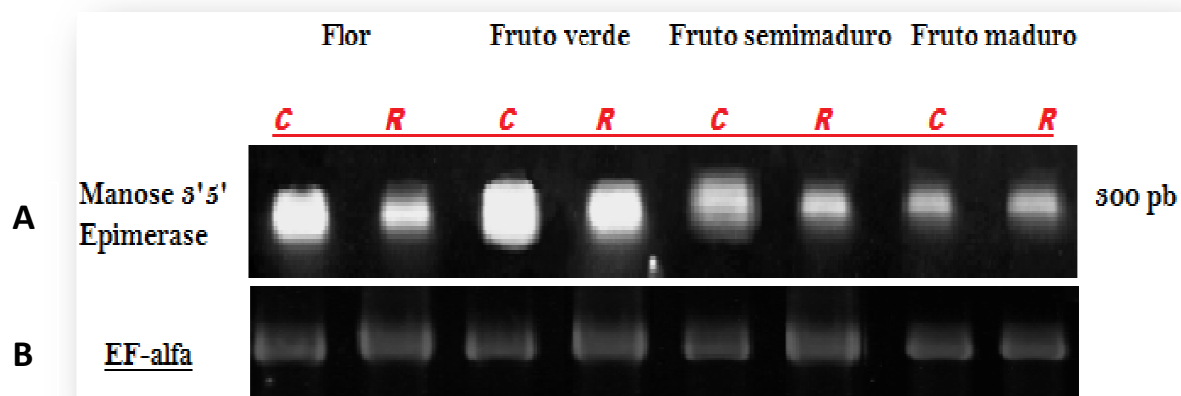


Figura 20. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Manose pirofosforilase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

### 13.6. Expressão gênica da GDP-Manose 3'5' epimerase.

A expressão gênica da GDP-Manose 3'5' epimerase em flores dos clones Cereja e Roxinha de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC apresentou uma importante diferença. O clone cereja obteve em suas análises uma expressão muito superior da manose 3'5' epimerase em comparação aquela apresentada em flores do clone roxinha (Figura 21). Para a mesma enzima, foi analisada em frutos verdes uma diferença de expressão gênica. Em frutos verdes do clone cereja foi encontrada uma expressão gênica que em muito excedia aquela apresentada nos frutos verdes do clone roxinha. Já em frutos semimaduros, os níveis de transcritos entre os clones não tinham grandes diferenças, mas mesmo assim, a expressão no clone Cereja foi levemente superior a apresentada no clone Roxinha. Finalmente, a expressão gênica em frutos maduros de aceroleiras da manose 3'5' epimerase, não apresentou uma diferença aparente nos níveis de transcritos, sendo que tanto em frutos maduros quanto nos demais tecidos a expressão foi superior ao elemento constitutivo fator de alongação alfa.





**Figura 21.** Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Manose 3'5'Epimerase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

### 13.7. Expressão gênica da GDP- Galactose fosforilase

A expressão gênica da GDP- Galactose fosforilase mostrou características distintas nos níveis de transcritos de ambos os clones e tecidos de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC (Figura 22). Em flores, foi verificada uma importante diferença de expressão, onde o clone Roxinha se apresentou com uma maior intensidade que aquela vista no clone Cereja. Esse padrão mudou em frutos verdes, nos quais o clone Cereja obteve uma expressão gênica muito superior a apresentada pelo clone Roxinha que não apenas teve uma expressão gênica inferior, mas revelou um nível de transcrito muito baixo. Em frutos semimaduros houve uma conservação dos níveis de transcritos expressos em frutos verdes para o clone Cereja, não sendo verificada diferença entre esses tecidos. Já o clone Roxinha apresentou um considerável aumento na expressão gênica da GDP- Galactose fosforilase, quando comparado aquela apresentada em frutos verdes, além de não ser observada diferença entre os clones nesse tecido. A expressão gênica da GDP- Galactose fosforilase em frutos maduros revelou que o clone Cereja permaneceu com os níveis de transcritos similares aqueles apresentados anteriormente em frutos verdes e semimaduros, mas já para o clone Roxinha, ocorreu uma diminuição da expressão, sendo bem inferior aquela apresentada pelo clone Cereja.

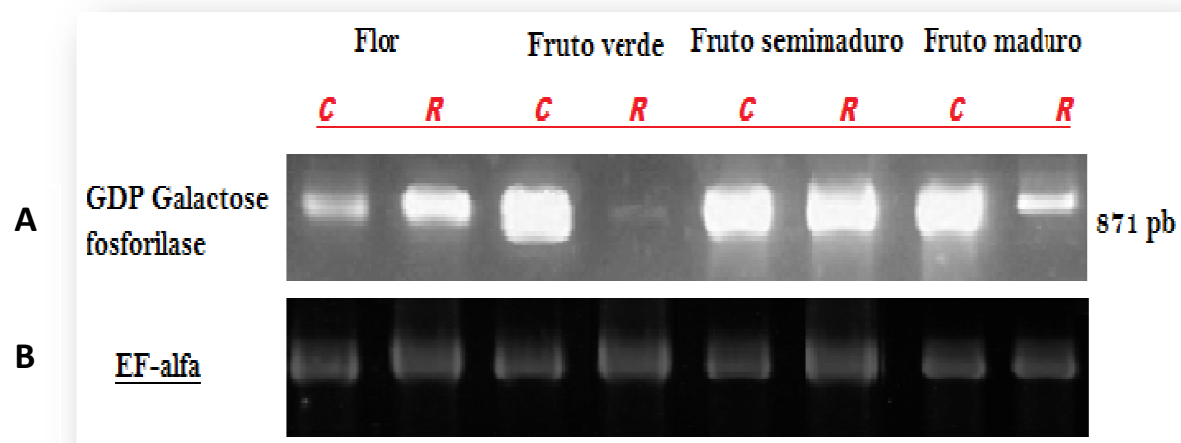
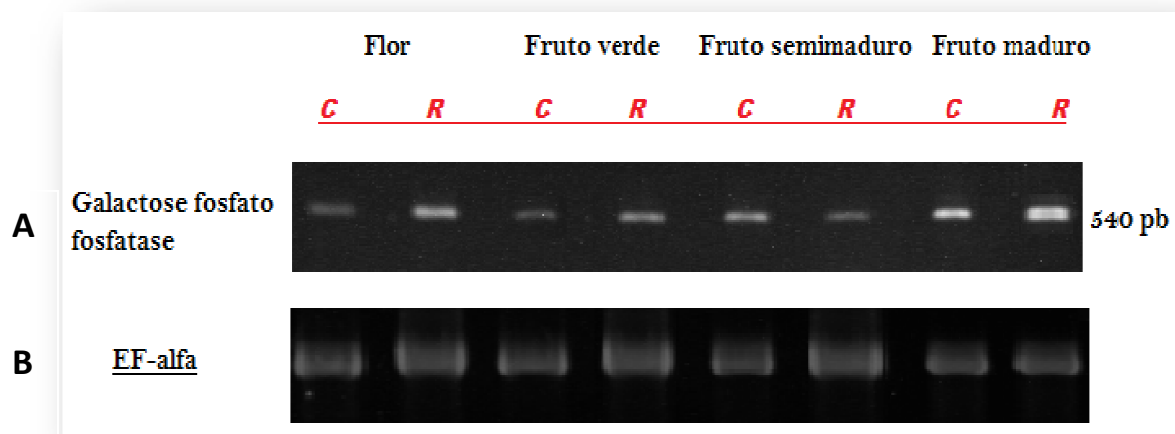


Figura 22. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da GDP Galactose fosforilase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

### 13.8. Expressão gênica da L-Galactose 1 fosfato fosfatase

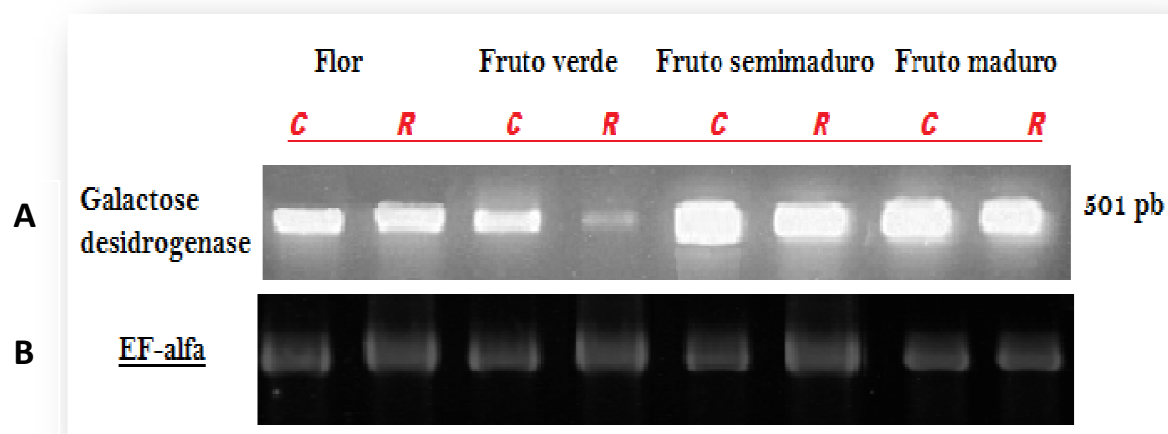
A expressão gênica da L-Galactose 1 fosfato fosfatase revelou um padrão muito similar nos níveis de transcritos (Figura 23). Em flores dos clones Cereja e Roxinha de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC ocorreu uma pequena diferença na expressão gênica, tendo o clone Roxinha um nível levemente superior quando comparado ao clone Cereja. Esse modelo verificado em flores permaneceu em frutos verdes, tendo o clone Cereja uma expressão inferior aquela apresentada pelo clone Roxinha. Já em frutos semimaduros, a expressão gênica teve uma leve inversão, onde os níveis de transcritos apresentados pelo clone Cereja foram superiores aos do clone Roxinha. Em frutos maduros, novamente teve o clone Roxinha um padrão de expressão gênica da L-Galactose 1 fosfato fosfatase superior ao apresentado pelo clone Cereja. Esses níveis de transcritos foram analisados por uma comparação paralela com o agente constitutivo fator de alongação alfa sendo que se observou que em todos os tecidos e em ambos os clones os níveis de transcritos foram bem abaixo do padrão de expressão apresentado pelo Fator alfa.



**Figura 23.** Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Galactose fosfato fosfatase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

### 13.9. Expressão gênica da L-Galactose desidrogenase

A expressão gênica da L-Galactose desidrogenase não apresentou diferenças nos níveis de transcritos em flores dos clones Cereja e Roxinha de *Malpighia emarginata* DC (Figura 24). Já em frutos verdes, a expressão gênica sofreu uma forte diminuição quando comparada com aquela apresentada em flores, em ambos os clones. Entretanto, se observou uma expressão levemente superior no clone Cereja. Em frutos semimaduros ocorreu um significativo aumento da expressão gênica, principalmente no clone Cereja, que apresentou um nível de transcrito mais elevado que o verificado no clone Roxinha. Esse aumento na expressão gênica verificado em frutos semimaduros permaneceu elevado em frutos maduros de *Malpighia emarginata* DC. Nesses frutos ocorreu um padrão similar da expressão gênica, não sendo verificada nenhuma diferença nos níveis de transcritos apresentados pelas análises dos clones. Entretanto, na comparação da expressão gênica da L-Galactose desidrogenase com o elemento constitutivo fator de alongação alfa foi verificado que em flores, frutos semimaduros e maduros a expressão foi muito superior aquela apresentada pelo agente constitutivo.



**Figura 24.** Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Galactose desidrogenase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde **C** significa clone Cereja e **R** clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

### 13.10. Expressão gênica da L-Galactono-1,4-Lactono desidrogenase

A expressão gênica da L-Galactono-1,4-Lactono desidrogenase (L-GalLdh) revelou que em flores ocorreu uma pequena diferença nos níveis de transcritos dos clones Cereja e Roxinha de aceroleiras de *Malpighia emarginata* DC (Figura 25). No clone Cereja, houve uma expressão gênica inferior ao apresentado pelo clone Roxinha. Já em frutos verdes, os níveis de transcritos apresentados pelos dois clones não apresentaram nenhuma diferença. O gel apresentou bandas com um nível de transcrito para o clone Cereja similar aquele apresentado pelo clone Roxinha. Esse nível de transcritos apresentados em frutos verdes não se repetiu em frutos semimaduros. Tanto o clone Cereja quanto o clone Roxinha aumentaram significativamente a expressão gênica da L-Galactono-1,4-Lactono desidrogenase, sendo ambos superiores a expressão gênica apresentada pelo elemento constitutivo fator de alongação alfa.. Em frutos maduros, ocorreu uma importante redução dos níveis de transcritos, para ambos os clones. Tanto o clone Cereja quanto o clone Roxinha reduziram drasticamente sua expressão gênica, onde visualmente não havia nenhuma diferença entre os clones.



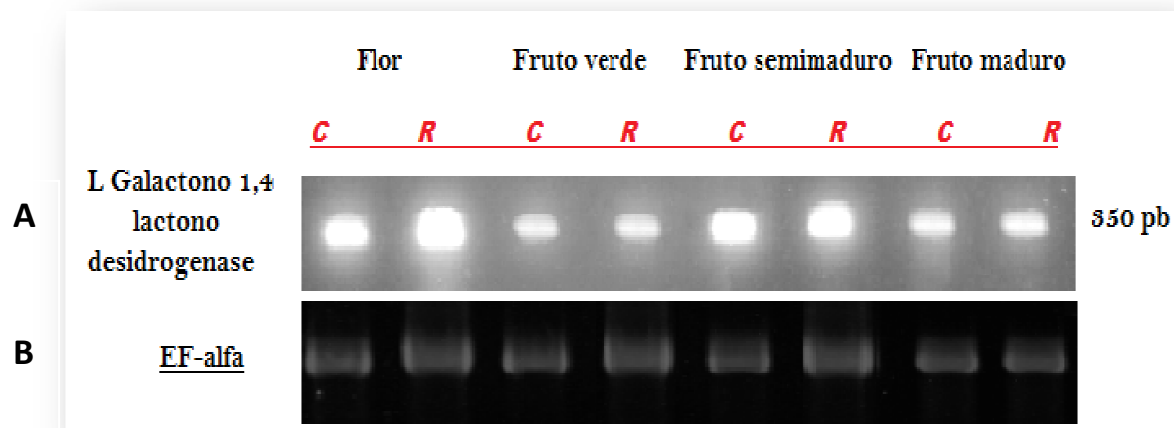


Figura 25. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da L Galactono 1,4 Lactono desidrogenase (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

#### **14. Caracterização da Oxidase alternativa em *Malpighia emarginata* DC.**

A clonagem de sequências gênicas obtidas após a amplificação por PCR revelou que duas isoformas da AOX foram encontradas em *Malpighia emarginata* DC, mostrando a presença de uma AOX1 e uma AOX2. Não houve diferenças dentre as sequências para AOX1 e AOX2 revelando que nessa espécie existe apenas uma AOX de cada isoforma. As sequências foram alinhadas e comparadas com a Oxidase alternativa 1 e oxidase alternativa 2 de *Arabidopsis thaliana* constante no NCBI (Figura 26 e Tabela 12).

MeClone11	AAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEEAENERMHLMTFMVEVAKPKWYERALVFA	60
MeClone34	-GSGLVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEEAENERMHLMTFMVEVAKPKWYERALVFA	59
MeClone19	AAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEEAENERMHLMTFMVEVAKPKWYERALVFA	60
MeClone1	AAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEHSGGWIKALLEEAENERMHLMTFMVEVAKPKWYERALVFA	60
AtAox1	AAVPGMVGGMLLHCKSLRRFEQSGGWIKALLEEAENERMHLMTFMVEVAKPKWYERALVIT	60
MeClone4	AAVPGMVGGMLLHLRSLRKFQSSGGWIKALLEEAENERMHLMTMVELVKPKWYERLLVLA	60
MeClone7	AAVPGMVGGMLLHLRSLRKFQSSGGWIKALLEEAENERMHLMTMVELVKPKWYERLLVLA	60
MeClone15	AAVPGMVGGMLLHLRSLRKFQSSGGWIKALLEEAESERMHLMTMVELVKPKWYERLLVLA	60
AtAox2	AAVPGMVGGMLLHLKSIKRFHSGGWIKALLEEAENERMHLMTMVELVKPKWYERLLVML	60
MeClone11	VQGVFFNAYFLGYLISPKFAHRMVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDTGNIENVPAPAIIDYW	120
MeClone34	VQGVFFNAYFLGYLISPKFAHRMVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDTGNIENVPAPAIIDYW	119
MeClone19	VQGVFFNAYFLGYLISPKFAHRMVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDTGNIENVPAPAIIDYW	120
MeClone1	VQGVFFNAYFLGYLISPKFAHRMVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDTGNIENVPAPAIIDYW	120
AtAox1	VQGVFFNAYFLGYLISPKFAHRMVGYLEEEAIIHSYTEFLKELDKGNIENVPAPAIIDYW	120
MeClone4	VQGVFFNAYFIIYLLSPKLAHRVVGYLEEEAIIHSYTEYKDLKEGKIENVPAPAIIDYW	120
MeClone7	VQGVFFNAYFIIYLLSPKLAHRVVGYLEEEAIIHSYTEYKDLKEGKIENVPAPAIIDYW	120
MeClone15	VQGVFFNAYFIIYLLSPKLAHRVVGYLEEEAIIHSYTEYKDLKEGKIENVPAPAIIDYW	120
AtAox2	VQGIFFNSFFVCYVISPRLAHRVVGYLEEEAIIHSYTEFLKIDNGKIENVAAPAIIDYW	120
MeClone11	CLPPNSTLRDVVTVVRADAEHHR	143
MeClone34	CLPPNSTLRDVVTVVRADAEHHR	142
MeClone19	CLPPNSTLRDVVTVVRADAEHHS	143
MeClone1	CLPPNSTLRDVVTVVRADAEHHR	143
AtAox1	RLPADATLRDVVMVVRADAEHHR	143
MeClone4	RLPKDANLENVITVIRADAEHHR	143
MeClone7	RLPKDANLENVITVIRADAEHHR	143
MeClone15	RLPKDANLEDTVITVIRADAEHHR	143
AtAox2	RLPKDATLKDVTVIRADAEHHR	143

Figura 26. Alinhamento das regiões clonadas e sequenciadas da AOX1 e AOX2 de *Malpighia emarginata* DC, submetidas no programa Clustaw2 presente no banco de genes europeu EMBL, comparadas com os genes da AOX1 e AOX2 de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

Tabela 12. Análise comparativa da identidade da AOX pela percentagem de aminoácidos das sequencias clonadas de *Malpighia emarginata* DC (Me) comparadas com as sequencias da AOX1 e AOX2 de *Arabidopsis thaliana* (At)

Sequencia A	Nome	(Nºaa)	Sequencia B	Name	(Nºaa)	Escore
1	AtAox1	143	2	AtAox2	143	80
1	AtAox1	143	3	MeClone1	143	93
1	AtAox1	143	4	MeClone4	143	80
1	AtAox1	143	5	MeClone7	143	80
1	AtAox1	143	6	MeClone11	143	93
1	AtAox1	143	7	MeClone15	143	79
1	AtAox1	143	8	MeClone19	143	93
1	AtAox1	143	9	MeClone34	143	90
2	AtAox2	143	2	MeClone1	143	79
2	AtAox2	143	3	MeClone4	143	83
2	AtAox2	143	4	MeClone7	143	83
2	AtAox2	143	5	MeClone11	143	79
2	AtAox2	143	6	MeClone15	143	82
2	AtAox2	143	7	MeClone19	143	79
2	AtAox2	143	8	MeClone34	143	76

## 15. Expressão gênica da Oxidase alternativa (AOX1 e AOX2).

A expressão gênica da AOX1 foi analisada nos quatro tecidos demonstrando uma importante variação nos níveis de transcritos (Figura 27). Em flores foi verificado que o clone Cereja apresenta um nível de expressão levemente superior ao encontrado no clone Roxinha. Esse padrão de expressão mudou drasticamente nos frutos verdes, pois o clone Cereja reduziu enormemente os níveis de transcritos quando comparados ao apresentado em flores. O clone Roxinha demonstrou uma conservação dos níveis de transcritos quando comparados aos encontrados em flores. Em frutos semimaduros, ocorreu uma relevante elevação dos níveis de transcritos. No clone Cereja houve um grande aumento da expressão gênica da AOX1, acompanhado por uma elevação dos níveis de transcritos no clone Roxinha, que se mostrou extremamente elevado. Finalmente, em frutos maduros foi constatada uma expressão gênica muito similar entre os dois clones, não sendo visualizada nenhuma diferença nos níveis de transcritos. A expressão gênica nos tecidos que tiveram um nível elevado de expressão foram muito superiores aos encontrados na expressão do elemento constitutivo fator de alongação alfa.

Já a expressão gênica da AOX2 apresentou discreta diferença nos níveis de transcritos observados em flores (Figura 28). O clone Cereja revelou uma expressão gênica da Oxidase alternativa 2 um pouco maior que o apresentado pelo clone Roxinha. Nos frutos verdes não foram encontradas diferenças significantes quando comparados aqueles encontrados em flores. O clone Cereja revelou uma diferença que praticamente não é visualizada. A expressão gênica existente em frutos semimaduros mostrou que nos dois clones houve um singelo aumento, sendo que o clone Cereja permaneceu com seu nível de transcrito mais elevado que o do clone Roxinha. Em frutos maduros de aceroleiras de *Malpighia emarginata* DC foram verificadas duas situações distintas. O clone Cereja reduziu sua expressão a ponto de ficar inferior ao clone Roxinha, essa redução não ocorreu no clone roxinha que permaneceu com seu nível de transcrito inalterado quando comparado ao visto em frutos semimaduros. A expressão gênica da AOX2 quando comparada ao elemento constitutivo não obteve grandes diferenças nos tecidos com o elemento constitutivo.

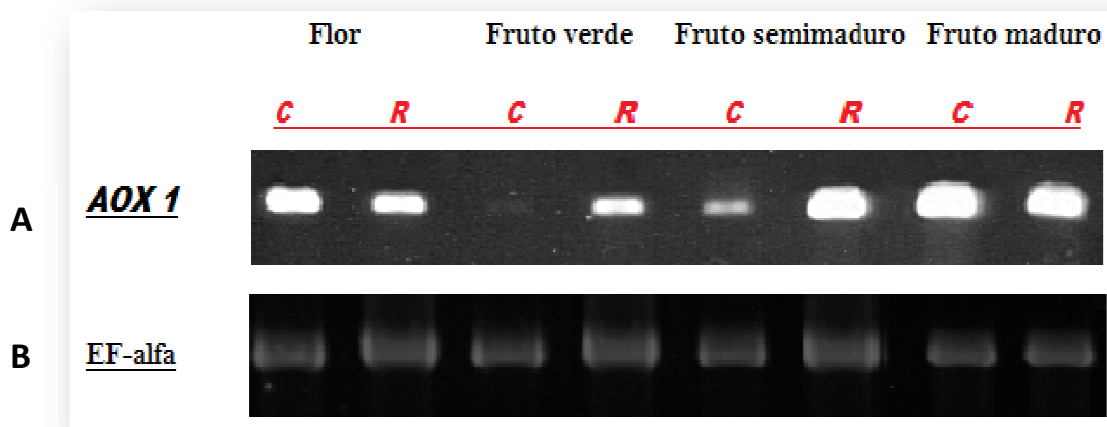


Figura 27. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Oxidase alternativa 1 (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

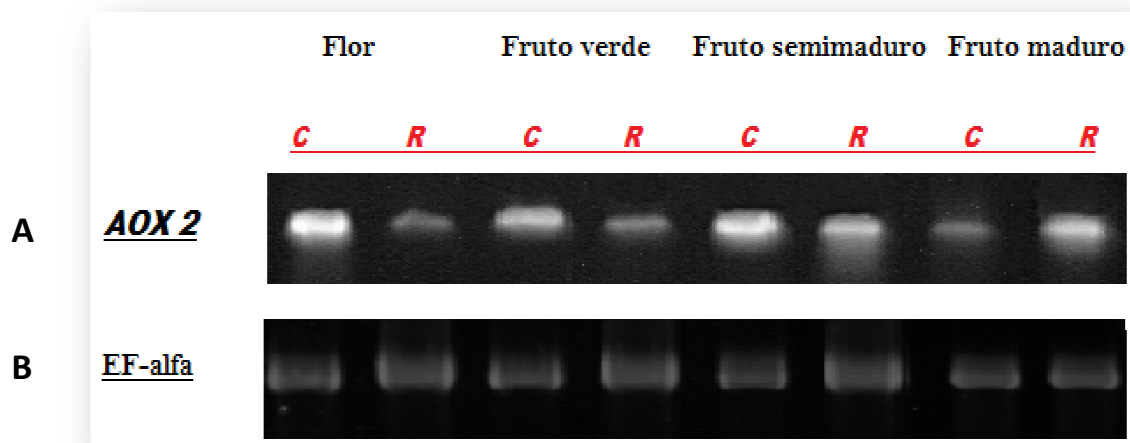


Figura 28. Gel de agarose 1,5% do produto de RT-PCR do gene da Oxidase alternativa 2 (A) após 30 ciclos de flores, frutos verdes, frutos semimaduros e frutos maduros de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC, onde C significa clone Cereja e R clone Roxinha. A corrida eletroforética foi desenvolvida usando 5 $\mu$ l do produto de RT-PCR do gene da Glicose fosfato isomerase e do fator de alongação alfa usado como elemento constitutivo de referência (B).

## 16. Discussão

O presente trabalho desenvolveu uma análise em dois clones comerciais lançados pela EMBRAPA, considerando que os mesmos possuem características padronizadas que vão desde a estrutura da planta até a composição química, sendo que uma das principais os teores de vitamina C que os frutos apresentam. O clone Cereja ou BRS 236 e o clone Roxinha ou BRS 237 tiveram seus frutos analisados em três estádios de desenvolvimento, fruto verde, fruto semimaduro e fruto maduro, onde os teores de ácido ascórbico total foram dosados por titulometria usando o método de Tillman (STROHECKER e HENNING, 1967). A comparação dos resultados surpreende pelas diferenças existentes entre os clones. Em frutos verdes a diferença nos teores de ácido ascórbico favorecendo o clone Cereja é de 53,64%, em frutos semimaduros é de 40,40% e em frutos maduros é de 29,47% (Figura 16). Com respeito a esses teores de vitamina C algumas considerações merecem ser tecidas, principalmente nas diferenças apresentadas nos três estádios de desenvolvimento.

Primeiramente, pode-se observar que em qualquer estágio de desenvolvimento o clone Cereja tem seus teores bem acima daqueles apresentados pelo clone Roxinha, mas uma análise dos dados mostra que isso tende a diminuir mais fortemente a medida que se processa o amadurecimento do fruto nesse clone. A quantidade de ácido ascórbico apresentada entre frutos verdes e maduros do clone Cereja diminuem em mais da metade. Esses valores chegam em torno de 51,74% de diferença. Já a mesma comparação entre frutos verdes e maduros do clone Roxinha revela uma diferença de 26,59% entre esses dois estádios. Nesse sentido, pode-se afirmar que o clone Cereja produz uma maior quantidade de ácido ascórbico no início do desenvolvimento do fruto, mas a diminuição nos teores da vitamina C é muito maior nesse clone a medida que o fruto amadurece. Um segundo fato importante reporta-se a comparação dos teores de ácido ascórbico apresentados entre os frutos maduros do clone Cereja e os frutos verdes do clone Roxinha. Mesmo reduzindo seus teores de ácido ascórbico em até 51,74% o clone Cereja possui taxas de ácido ascórbico em frutos maduros superiores aquelas apresentadas pelo clone Roxinha no estágio de fruto verde. Levando em consideração esse parâmetro, ou seja, os teores de vitamina C presentes entre esses clones pode-se classificar o clone Cereja como uma fonte mais abundante de ácido ascórbico não apenas para consumo da fruta madura *in natura*, mas também para uso biotecnológico no processamento industrial da fruta se o critério de seleção for o teor de vitamina C.

Apesar de não ser uma enzima exclusiva da via biossintética do ácido ascórbico, a expressão gênica da glicose fosfato isomerase foi avaliada objetivando comparar o padrão de expressão existente entre os clones de aceroleiras, pois o produto da reação catalisada pela enzima faz parte da via Wheeler/Smirnoff. Na análise de expressão, verificou-se a existência de diferenças dos níveis de transcritos entre os clones avaliados. Para ambos os clones a expressão gênica não se mostrou suficientemente diferente nos tecidos analisados que justificassem a caracterização dessa enzima como sendo crucial nas diferenças apresentadas nos teores de ácido ascórbico (Figura 17). Esse fato pode ser devido a que a frutose 6 fosfato, o produto da reação, não é um metabólito exclusivo para a síntese de vitamina C, sendo utilizado em outras rotas metabólicas como por exemplo a via glicolítica no metabolismo dos carboidratos. Desse modo, a expressão gênica da glicose fosfato isomerase não representa apenas um evento molecular restrito a biossíntese da vitamina C, mas também a formação de um intermediário fundamental para outras rotas metabólicas.

A manose fosfato isomerase é a primeira enzima que participa efetivamente da via biossintética do ácido ascórbico. Segundo Smirnoff et al., (2001) seu produto de reação a D-Manose-6-P só é encontrada no metabolismo biossintético do ácido ascórbico em plantas, não sendo verificado em outras rotas pertencentes a outros organismos. No caso específico da expressão gênica em diferentes tecidos de dois clones de *Malpighia emarginata* DC o fato importante foi a existência de expressão gênica desse gene, já que segundo Smirnoff et al., (2001) em algumas espécies e ou tecidos não existe expressão desse gene e enzima. No caso da expressão nos dois clones de *Malpighia emarginata* DC, Cereja e Roxinha, foi verificado que não se observa uma relação diretamente proporcional da expressão gênica com o conteúdo de ácido ascórbico acumulado pelos respectivos tecidos. Segundo Maruta et al., (2008), analisando a biossíntese de ácido ascórbico em *A. thaliana* verificaram que apenas a Manose fosfato isomerase 1 e não a manose fosfato isomerase 2 é essencial a síntese do ascorbato. A variação da expressão encontrada em *Malpighia emarginata* DC além de não acompanhar as características de síntese de ácido ascórbico de frutos em diferentes estádios de desenvolvimento, pode ser resultado referente a uma expressão diferencial dos dois genes existentes da enzima (Figura 18). Esse resultado pode não ser totalmente representativo para a expressão específica da Manose fosfato isomerase em *Malpighia emarginata* DC, já que os primers utilizados não eram específicos e assim não distinguiam os genes a serem amplificados por PCR. As bandas reveladas podem ser



representativas da expressão das duas isoformas, onde esse fato pode não ser totalmente característico para a expressão proporcional ao conteúdo de ascorbato existente nos respectivos tecidos.

A fosfomanose mutase é uma enzima que não apresenta na literatura trabalhos que revele características mais aprofundadas de sua estrutura, expressão e regulação, suficientes para um maior entendimento impossibilitando assim, uma análise comparativa dos resultados do presente trabalho com outros presentes na literatura. A conversão executada pela fosfomanose mutase transformando a D-Manose-6-P em D-Manose-1-P revela que esse é um importante passo na biossíntese do ácido ascórbico. Entretanto, a expressão gênica apresentada mostrou que não ocorre um perfeito sinergismo dos níveis de transcritos dessa enzima com o conteúdo de ácido ascórbico apresentado pelos tecidos nos dois clones (Figura 19). O padrão de expressão apresentado varia em relação ao grau de amadurecimento, tendo em frutos verdes uma expressão superior aos demais tecidos, o que demonstra que existe a possibilidade desse gene ser importante nas diferenças existentes nas concentrações dos produtos da via biossintética. Esse fato ocorrido em frutos verdes é reforçado pela diferença de expressão gênica apresentada entre os clones, pois a quantidade de vitamina C em frutos verdes do clone Cereja é superior aos demais tecidos, bem como do clone Roxinha. Isto sugere que a elevação na concentração da vitamina C em frutos verdes pode ser devido ao aumento da expressão gênica da fosfomanose mutase, mas parece não ser o único na definição desta de ácido ascórbico. Nos demais tecidos a diminuição da expressão é proporcional a diminuição nas concentrações de vitamina C a medida que ocorre o amadurecimento dos frutos, mostrando que pode existir uma relação entre a expressão gênica da fosfomanose mutase e a quantidade de vitamina C presente nesses tecidos. Entretanto, não ocorre uma diferença de expressão entre os clones, principalmente em frutos maduros, fato que leva a crer que a fosfomanose mutase pode contribuir, mas não é decisiva na diferenciação dos teores de vitamina C presentes nesses tecidos.

A GDP-manose pirofosforilase ou D-Manose-1-fosfato Guanililtransferase diferentemente das enzimas anteriores da rota Wheeler/Smirnoff, apresenta algumas características bem definidas na literatura. Em relação ao presente trabalho algumas considerações podem ser tecidas, pois a expressão gênica nos diferentes tecidos mostrou que existem diferenças nos níveis de transcritos. A expressão gênica não se mostrou significativamente diferente em flores para os dois clones, mas em frutos verdes verificou-se um menor nível de transcrito apresentado pelo clone Roxinha comparado

ao clone Cereja, que teve um grande aumento em sua expressão. Esse padrão não se repetiu em frutos semimaduros, mas apresentou uma grande diminuição da expressão gênica no clone Cereja, sendo que para o clone Roxinha ocorreu um leve aumento nos níveis de transcrito quando comparado aos de frutos verdes. Em frutos maduros o que se observou foi um aumento indiferente nos níveis de transcritos nos dois clones (Figura 20). Os resultados revelaram que a GDP-manose pirofosforilase é uma enzima que possui uma relação particular de cada clone quanto a expressão gênica e o conteúdo de ácido ascórbico apresentados por cada tecido em *Malpighia emarginata* DC. Entretanto, segundo Badejo et al., (2007), em estudos com *M. Glabra*, a expressão gênica da GDP-manose pirofosforilase possui uma diminuição gradual a medida que os frutos amadurecem, tendo o menor nível de transcritos em frutos totalmente maduros, contrastando com os resultados aqui apresentados nesse mesmo estágio analisado. Esses achados podem ser resultado de fatores como elevadas taxas de luminosidade que podem influenciar no acúmulo de ácido ascórbico em diferentes estádios de desenvolvimento. O estado do Ceará está situado em uma região do globo que possui a característica de ser mais próximo ao Equador, proporcionando uma maior intensidade luminosa durante o dia. Conklin et al., (1999) mostraram que em *Arabidopsis thaliana* mutantes, deficientes do gene da enzima, tinham 25% a menos de ácido ascórbico produzido, comprovando a importância do gene na biossíntese. Segundo Linster e Clark (2008) os níveis de mRNA da GDP-manose pirofosforilase estão correlacionados com os níveis de L-ascorbato acumulados nos tecidos nas mais diferentes espécies de plantas. Finalmente, para comprovar a importância da participação do gene da GDP-manose pirofosforilase no conteúdo de ácido ascórbico acumulado, Badejo et al., (2008) analisaram a expressão gênica dessa enzima em frutos e folhas de *M. glabra* comparando com *Arabidopsis* e tomate, sendo verificado que a expressão era diretamente proporcional ao conteúdo de ascorbato acumulado, sendo mais elevada em *M. glabra*. Ioannidi et al., (2009) demonstraram que a expressão gênica da GDP-manose pirofosforilase em tomate é decrescente com o decorrer do processo de amadurecimento, sendo praticamente imperceptível no estágio mais avançado de desenvolvimento do fruto, corroborando com os achados de Badejo et al., (2007), em estudos com *M. glabra*, sendo ambos, portanto, diferentes em relação aos resultados aqui apresentados em *Malpighia emarginata* DC em estádios de avançado desenvolvimento de frutos. Aparentemente, o que acontece em *Malpighia emarginata* DC é que mesmo apresentando uma elevação da expressão gênica em frutos maduros

esse fato não influencia tanto quanto observado em outras espécies, talvez devido a uma baixa atividade enzimática em frutos maduros a célula procure compensar esse processo com uma elevação da expressão gênica. Mesmo assim, devido ao fato de existir uma maior expressão gênica em frutos verdes no clone Cereja, a GDP-manose pirofosforilase pode ser considerada como a primeira enzima da via Wheeler/Smirnoff a auxiliar na definição dos níveis de ascorbato existentes nos diferentes estádios em frutos de aceroleiras.

O estudo da expressão gênica da GDP-Manose 3'5' epimerase revelou relação entre o grau de amadurecimento dos frutos nos clones Cereja e Roxinha de aceroleiras *Malpighia emarginata* DC e a quantidade de ácido ascórbico que os tecidos analisados apresentam. Essa enzima catalisa um passo importante na biossíntese do ácido ascórbico devido ao fato que ela pode catalisar duas reações distintas, formando uma bifurcação na rota de síntese de compostos, seguindo assim vias distintas de biossíntese do ascorbato. A principal via é aquela derivada da epimerização dos carbonos 3'e 5' da GDP-Manose formando GDP-L-Galactose, caracterizando a via Wheeler/Smirnoff. A segunda reação possível é a epimerização do carbono 5' da GDP-Manose, gerando GDP-L-Gulose como constituinte da via Wolucka/Van Montagu (WOLUCKA e VAN MONTAGU, 2003). Em relação a via Wheeler/Smirnoff, ou via da GDP-L-Galactose a expressão gênica apresentou um sinergismo com o conteúdo de ácido ascórbico que tanto o tecido quanto o clone apresentavam. A diminuição dos níveis de transcritos em relação ao grau de amadurecimento de aceroleira *Malpighia emarginata* DC acompanham uma diminuição das quantidades de ácido ascórbico medidas nos tecidos e clones (Figura 21). Esses achados são similares aqueles apresentados por Ioannidi et al., (2009) em tomate. Esses autores demonstraram que há uma diminuição dos níveis de transcritos da GDP-Manose 3'5' epimerase com o aumento do grau de amadurecimento, entretanto, no tomate ocorre um gradual aumento dos níveis de ácido ascórbico com o decorrer do amadurecimento. Esse aumento nos teores de ácido ascórbico encontrada em tomates não é apenas fruto de síntese da via Wheeler/Smirnoff. A literatura apresenta poucos trabalhos sobre a GDP-Manose 3'5' epimerase, principalmente em relação a estudos de biologia molecular, entretanto, Valpuesta e Botella (2004) defendem que a enzima é crucial na biossíntese de ácido ascórbico, sendo que possivelmente ela seja um ou talvez o principal ponto de regulação da síntese. Aparentemente, segundo esses mesmos autores, ela é a enzima que faz parte do processo evolutivo nos eucariotos onde ocorreu a bifurcação da rota de biossíntese do

ácido ascórbico nas plantas e animais, já que a GDP-L-Gulose é um dos substratos que precedem a formação da vitamina C tanto em animais quanto em plantas. A expressão gênica da GDP-Manose 3'5' epimerase foi estudada em *M. glabra* por Badejo et al., (2008), mostrando um padrão de expressão similar aos demonstrados nesse trabalho, acompanhando uma diminuição gradual igualmente vista aqui, além de ter os teores de ácido ascórbico muito parecidos com aquelas encontradas nos dois clones e nos diferentes estádios de desenvolvimento. Outro fato encontrado que reforça que a GDP-Manose 3'5' epimerase é crucial na síntese da vitamina C em *Malpiguia emarginata* DC reporta-se a diferença apresentada pelos níveis de transcritos entre os clones Cereja e Roxinha. Esse dado demonstra que tanto em flores quanto nos frutos verdes e semimaduros a expressão gênica foi sempre superior no clone que acumula mais ácido ascórbico, ou seja, no clone Cereja. Esses resultados junto com os relatos dos artigos apontam a GDP-Manose 3'5' epimerase como uma das enzimas que mais influenciam a síntese de vitamina C em *Malpiguia emarginata* DC.

O padrão de expressão gênica da GDP-L-Galactose fosforilase ou L-Galactose guanililtransferase demonstrou um importante resultado para efeito comparativo em relação aos teores de ácido ascórbico que cada tecido e clones analisados apresentaram. Inicialmente, foi verificado que nos diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos do clone Cereja não foram encontradas diferenças nos níveis de transcritos, fato que revela uma taxa elevada de síntese do mRNA no fruto durante seu processo de amadurecimento. Esse resultado foi similar aos apresentados nos experimentos de Badejo et al., (2008) em *M. glabra*. A expressão gênica da GDP- GDP-L-Galactose fosforilase mostrou-se similar aos resultados aqui apresentados, excetuando o fato que em frutos maduros ocorreu uma diminuição significativa da expressão gênica no trabalho desses autores e no presente trabalho essa expressão permaneceu elevada. Ioannidi et al., (2009) realizando estudos em tomate verificaram um padrão de expressão idêntico aos aqui apresentados. Já para o clone Roxinha verificou-se um processo peculiar. A expressão da GDP-L-Galactose fosforilase em frutos verdes se mostrou mais baixa, o que corrobora com o fato de que nesse clone há uma menor síntese de ácido ascórbico que no clone Cereja, entretanto, diverge grandemente com os níveis de ácido ascórbico que esse tecido apresenta, pois sua expressão foi extremamente baixa quando comparada aos outros dois estádios de desenvolvimento (Figura 22). Aparentemente, o clone Cereja intensifica a síntese do mRNA da enzima desde os primórdios da formação do fruto, o que justificaria uma maior quantidade de

ácido ascórbico, mas esse padrão de expressão não explica o fato das quantidades de ácido ascórbico diminuírem. Esse processo pode ser devido a uma menor atividade enzimática em frutos maduros ou a uma relação mais íntima de outra enzima com os níveis de ácido ascórbico encontrados nesses tecidos. No clone Roxinha, a expressão gênica da GDP-L- Galactose fosforilase revela que pode existir de fato um controle da síntese de ácido ascórbico comparado ao clone Cereja principalmente no estágio de fruto verde. Entretanto, os níveis de transcritos foram tão baixos que levantam duas possibilidades. A primeira que a atividade enzimática nesse tecido em frutos verdes do clone Roxinha é muito alta, mas não o suficiente para superar a do clone Cereja. A segunda é que a atividade é mais alta que a do clone Cereja, mas como os níveis de transcritos foram tão significativamente superiores no clone Cereja que mesmo com uma elevada atividade enzimática não seja suficiente para superar os conteúdos de ácido ascórbico superiores do clone Cereja.

Resultados importantes de Bulley et al., (2009) endossam os resultados aqui encontrados com os clones de *Malpighia emarginata* DC, corroborando com o fato que a GDP-L-Galactose fosforilase é uma das enzimas que regulam, através da expressão gênica a biossíntese de ácido ascórbico. Esses autores, estudando a expressão gênica em frutos de kiwi e a superexpressão gênica em *Arabidopsis* do gene da GDP-L- Galactose fosforilase de kiwi encontraram teores até quatro vezes mais elevados de ácido ascórbico quando a enzima de kiwi foi expressa em *Arabidopsis* e de até sete vezes quando o gene da GDP-Manose 3'5' epimerase foi co expresso. Esse fato sustenta a hipótese que a GDP-L- Galactose fosforilase é uma das enzimas que controlam a síntese de ácido ascórbico em acerolas, pois tanto em frutos verdes quanto em frutos maduros há uma significativa diferença entre os clones, favorecendo o clone Cereja, exatamente aquele que os tecidos apresentam maiores teores da vitamina C.

A L-Galactose 1 fosfato fosfatase converte L-Galactose 1 fosfato em L-Galactose, sendo esse o antipenúltimo passo da via Wheeler/Smirnoff na biossíntese do ascorbato em plantas. Entretanto, apenas em 2004 com os experimentos de Laing et al., a enzima foi inicialmente estudada. Esses autores verificaram que a enzima purificada em frutos de kiwi (*Actinidia deliciosa*) possuía propriedades similares a uma outra enzima oriunda de rebentos de *A. thaliana*, identificada posteriormente como sendo a mio-inositol 1 fosfato fosfatase. Esse fato é relevante devido a função dessa outra fosfatase na biossíntese de ácido ascórbico presente em uma outra rota metabólica chamada de via do Mio-inositol. Após a expressão de ambas as enzimas em *E.coli* foi

verificada uma velocidade 14 vezes mais alta da L-Galactose 1 fosfato fosfatase quando comparada a mio-inositol 1 fosfato fosfatase. No presente trabalho, a expressão do gene da L-Galactose 1 fosfato fosfatase foi avaliada inicialmente como uma real participante da biossíntese em clones de aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC). Os transcritos presentes nos diferentes tecidos nos clones Cereja e Roxinha não apresentaram diferenças significantes nos padrões de expressão gênica, sendo que além desse fato há uma grande diferença dos níveis de transcritos do gene da L-Galactose 1 fosfato fosfatase com os transcritos do agente constitutivo, o fator de alongação alfa (Figura 23). Aparentemente a participação dessa enzima, assim como de outras da via é promover a síntese de intermediários, não sendo um ponto de regulação que determine os teores de ácido ascórbico biossintetizados. Esse papel não pode ser provado apenas com a análise da expressão gênica, mas esse estudo em dois clones que sintetizam diferentes quantidades de ácido ascórbico mostrou que há uma forte tendência de que outros genes sofram uma regulação gênica mais significativa que o gene da L galactose 1 fosfato fosfatase em *Malpighia emarginata* DC.

A L-Galactose desidrogenase (L-Galdh) converte L-Galactose (L-Gal) em L-Galactono 1,4 Lactono. Esse é o penúltimo passo biossintético da via Wheeler/Smirnoff, formando o produto que será convertido em seguida em ácido ascórbico. Ela assim como outras enzimas dessa via é muito pouco conhecida. Entretanto, um importante estudo realizado por Gatzek et al., (2002), elucidou pontos até então desconhecidos. Nesse trabalho os autores realizaram respectivamente superexpressão e supressão antisense da L-Galdh em tabaco e Arabidopsis. Como resultado desse trabalho duas observações a respeito da atividade da L-Galdh foram propostas: a primeira é que a superexpressão da L-Galdh em tabaco não afeta a concentração final de ascorbato. A segunda é que em baixa intensidade luminosa, quando a quantidade de ascorbato é conhecidamente mais baixa, a redução na atividade da L-Galdh não afeta a quantidade de ascorbato. Segundo esses autores a L-Gal pode exercer uma forte influencia no fluxo biossintético da via ou seja, na síntese de um importante intermediário. No mesmo trabalho a baixa concentração de L-Gal encontrada em tipos selvagens sugere que a capacidade da L-Galdh de usar esse substrato na reação é muito maior que sua taxa de síntese. Outro ponto relevante para a análise da expressão gênica em clones de *Malpighia emarginata* DC refere-se ao resultado apontado pelos autores anteriormente citados que afirmam que nas linhagens antisense de L-Galdh havia um grande acúmulo de L-Gal, quando essas plantas eram

colocadas sob forte intensidade luminosa. As quantidades persistiam quando havia mudanças para períodos posteriores de baixa e alta intensidade luminosa. Esses mesmos autores sugerem que a capacidade de sintetizar a L-Gal é mais fortemente determinada pela quantidade da(s) enzima(s) que precedem essa etapa da via, do que a disponibilidade de substrato ou de algum tipo de propriedade de controle das enzimas. No presente trabalho foi visto que nos clones Cereja e Roxinha de aceroleiras de *Malpighia emarginata* DC houve um padrão de síntese muito peculiar, a começar de flores. Nesse tecido não foi encontrada diferença assim como em frutos maduros. Somente foram encontradas diferenças em frutos verdes e frutos semimaduros. Nos primeiros verificou-se uma baixa expressão gênica da L-Galactose desidrogenase, sendo um pouco superior no clone Cereja. Já em frutos semimaduros houve um expressivo aumento nos níveis de transcritos, principalmente em frutos do clone Cereja. Aparentemente a diferença na expressão gênica apresentada entre os clones não representa um fator que possa determinar os diferentes níveis de ascorbato presentes nos tecidos dos dois clones por dois motivos. Primeiramente devido ao fato que as taxas de ascorbato são decrescentes a medida que os frutos amadurecem, fato inversamente achado com os transcritos obtidos nesse trabalho (Figura 24). O segundo ponto remete-se a esses níveis de transcritos justificarem os achados de Gatzek et al., (2002), ou seja, que a quantidade de ascorbato acumulado não é fruto da atividade da L-Galdh, nem tampouco da quantidade da enzima. Lembrando que a superexpressão da L-Galdh em tabaco não afetou a concentração final de ascorbato e nas linhagens antisense de L-Galdh em *Arabidopsis* gerou um grande acúmulo de L-Gal, quando essas plantas eram colocadas sob forte intensidade luminosa. Portanto, ambos os resultados suportam que a expressão gênica da L-Galdh não é um fator determinante das diferenças de ácido ascórbico que os clones apresentam.

A L-Galactono-1,4 lactono desidrogenase (L-GalLdh) é a última enzima da via Wheeler/Smirnoff, responsável pela conversão de L-Galactono-1,4 lactono em ácido ascórbico. Esse passo ocorre na mitocôndria, pois segundo Siedones et al., (1999) a L-GalLdh está localizada na membrana mitocondrial interna, especificamente posicionada entre o complexo III e o complexo IV (BARTOLI et al., 2000). Para sintetizar o ácido ascórbico a enzima necessita de dois substratos, a L-Galactono-1,4 lactono e o citocromo C em sua forma oxidada. No presente trabalho foi verificada uma pequena variação da expressão gênica em flores, sendo que o clone Roxinha apresentou uma expressão gênica superior ao clone Cereja. Quando foram analisados os níveis de

transcritos em frutos verdes nenhuma diferença de expressão foi encontrada entre os clones entretanto, verificou-se redução nos níveis de transcritos nos dois clones quando comparados aos apresentados em flores. Esse fato ocorrido em *Malpighia emarginata* DC foi comparado a resultados encontrados em outras espécies, como em tomate (IOANNIDI et al., 2009). Tal como no tomate a acerola tende a diminuir a expressão gênica da L-GalLdh a medida que se processa o amadurecimento. Entretanto, diferentemente do tomate a acerola diminui a quantidade de ácido ascórbico do decorrer de seu processo de amadurecimento. Esse dado impõe uma relevante comparação nessas espécies. Seria a L-GalLdh a enzima responsável pelo conteúdo de ascorbato sintetizado em um determinado tecido? Outro ponto é se o nível de ácido ascórbico sintetizado é fruto de uma elevada atividade enzimática da L-GalLdh ou de um grande aumento nos níveis de transcritos. Algumas respostas para essas questões foram propostas quando Pateraki et al., (2004). Estudando os níveis de transcritos da L-GalLdh em melão esses autores verificaram que ocorria expressão gênica em todos os tecidos estudados (incluindo verticilos florais), mas especificamente em frutos a expressão gênica elevava-se com o decorrer do processo de amadurecimento. Pouco tempo depois, Bartoli et al., (2005) mostraram que em dois cultivares de trigo que diferiam na quantidade de ácido ascórbico sintetizada em folhas, que ao serem submetidos a estresse hídrico as plantas apresentavam diferentes valores na síntese protéica e na atividade enzimática da L-GalLdh, tendo uma elevação na cultivar que sintetizava menos ácido ascórbico e nenhuma alteração na cultivar que produz mais ácido ascórbico. Notadamente nesse trabalho de pesquisa não foram verificadas mudanças nas taxas de ácido ascórbico em nenhuma das cultivares. Segundo esses autores nem a quantidade da proteína nem a atividade enzimática podem ser usados como um indicador para mudanças na capacidade de biossíntese de ascorbato, conflitando com os achados de Pateraki et al., (2004). Alhag Dow et al., (2007), silenciaram o gene da L-GalLdh em tomate usando a estratégia do RNAi, demonstrando que os teores de ácido ascórbico total não se alteravam mesmo com reduções nos níveis de transcritos e na atividade enzimática. Segundo Di Matteo et al. (2010), em um estudo verificando o processo de degradação da pectina em tomates, observou que os teores de ácido ascórbico aumentavam durante o amadurecimento graças a uma elevação da expressão gênica de proteínas envolvidas com a vias dos ácidos glucurônico (via Mio inositol) e L-galactônico, ao invés da via Wheeler/Smirnoff. Segundo eles a quebra dos polímeros de pectina existentes na parede celular aumenta a disponibilidade de precursores para a



biossíntese de ácido ascórbico presentes na via do ácido L-galactônico. Desse modo ao se verificar os resultados obtidos por Di Matteo et al., (2010) com aqueles que Alhaghdow et al., (2007) obtiveram torna-se evidente o motivo pelo qual o silenciamento da L-GalLdh não resultou em uma diferença nas concentrações de ácido ascórbico. A via Wheeler/Smirnoff está presente nos frutos de tomate, mas a expressão gênica e a atividade enzimática da L-GalLdh não interferem nos conteúdos de ácido ascórbico acumulados, sendo a via do ácido L-galactônico mais importante e decisiva no processo biossintético nessa espécie.

No presente estudo com *Malpiguia emarginata* DC a expressão gênica da L-GalLdh em frutos verdes é idêntica em ambos os clones, sendo muito baixas quando comparadas com o elemento constitutivo (Figura 25). Essa expressão sofre um aumento em frutos semimaduros em ambos os clones e em seguida diminui em frutos maduros. Nesse aumento e nessa diminuição não foram encontradas diferenças de expressão entre os clones que justificasse uma diferença na biossíntese. Não foram realizadas medições da atividade enzimática da L-GalLdh em nenhum dos clones, mas segundo Bartoli et al., (2005) anteriormente citados a atividade enzimática não influencia no conteúdo de ácido ascórbico nos tecidos. Como os teores de ácido ascórbico decrescem com o amadurecimento do fruto, aparentemente assim como em outros frutos, a L-GalLdh não é uma enzima determinante dos teores acumulados de ácido ascórbico nos tecidos avaliados de *Malpiguia emarginata* DC.

Para o estudo da expressão gênica da AOX em *Malpiguia emarginata* DC inicialmente foi realizada a caracterização gênica das isoformas presentes nessa espécie. Segundo o atual modelo de classificação já se esperava que a acerola possuísse pelo menos duas isoformas, uma AOX1 e uma AOX2 (CONSIDINE et al., 2002). Esse fato confirmou-se quando depois de realizada a amplificação por PCR, clonagem, minipreparação e seqüenciamento, sendo as duas isoformas reveladas (Figura 26 e Tabela 12). A partir daí novos primers dessa vez específicos foram desenhados e deu-se início o estudo de expressão gênica. A oxidase alternativa (AOX) é uma importante enzima no processo preventivo de síntese das espécies reativas do oxigênio (EROS), devido a capacidade de reduzir o oxigênio molecular formando água como produto da reação. Esse fato só é possível graças inicialmente ao ponto que a enzima está localizada, entre o complexo II e o complexo III na membrana mitocondrial interna. A AOX poder receber do pool de ubiquinona os elétrons necessários para a redução do oxigênio sendo que esse processo desacopla o transporte de elétrons da fosforilação, daí

ela ser denominada como uma proteína desacopladora. Durante esse processo a energia que seria usada na fosforilação é dissipada na forma de calor, caracterizando uma segunda função da AOX, a termogênese. Resumidamente esse processo ajuda na manutenção da homeostase tecidual, regulando de forma gradual a manutenção das funções celulares. A AOX possui seu sítio ativo projetado para a matriz mitocondrial, sendo composta por dois monômeros formando um homodímero ligando-se covalentemente através de resíduos de cisteínas (forma oxidada) ou através de interações hidrofóbicas (forma reduzida) (BERTHOLD e STENMARK, 2003). Os estudos que envolvem a AOX são baseados nas principais características da enzima, mas fundamentalmente um grande número de trabalhos se baseia na propriedade preventiva da membrana mitocondrial formar espécies reativas nas reduções parciais do oxigênio que acontecem no complexo IV. Atualmente, tem sido cogitado que a AOX pode participar de outros processos celulares, mas até o presente momento nenhum fez referência direta da enzima na biossíntese do ácido ascórbico. Essa relação tem sido buscada devido ao fato que a membrana mitocondrial interna (MMI) possui duas enzimas diferentes, mas possuidoras de uma característica em comum. A primeira dessas enzimas é a Oxidase alternativa, como já citada está posicionada entre o complexo II e o complexo III. A segunda é a L-Galactono-1,4 lactono desidrogenase ou L-GalLdh, posicionada entre os complexos III e IV. Afora a particularidade que ambas possuem de estarem na MMI, elas tem a capacidade de controlarem os níveis de espécies reativas do oxigênio de duas formas. A AOX trabalharia na prevenção, ou seja, equilibrando o fluxo de elétrons que migram pela cadeia evitando as reduções parciais do oxigênio que ocorrem no complexo IV, já a L-GalLdh operaria na síntese do ácido ascórbico, que agiria diretamente contra os radicais livres já produzidos ou como cofator enzimático de diversas enzimas que detoxificam o meio celular desses agentes danosos. Interessantemente, ambas são separadas apenas pelo complexo III na MMI, segundo a proposta de Bartoli et al., (2000). Devido a esse fato é coerente propor que haja um possível engajamento das enzimas acima na biossíntese da vitamina C. A relação se basearia inicialmente no controle do fluxo de elétrons pelas enzimas, passando pela necessidade de uma regulação da atividade de uma ou das duas, findando com um processo que caracterize a expressão gênica, ou um conjunto integrado desses e até outros meios celulares de controle.

No presente trabalho a expressão gênica de duas AOX (1 e 2) foram examinadas em diferentes tecidos de dois clones de *Malpighia emarginata* DC (Figuras 27 e 28).

Cada uma dessas AOX possui características que lhes são inerentes. A AOX1 é conhecida uma enzima que se expressa mais fortemente em situações de estresse, tanto em mono como em dicotiledôneas, já a AOX2 comporta-se mais como uma enzima constitutiva presente apenas em dicotiledôneas. O estudo revelou que a expressão das duas AOX é diferente. A AOX1 apresentou uma elevação nos níveis de transcritos a medida que os frutos avançam no grau de amadurecimento. Nos dois clones foi verificado esse aumento, mas ele foi bem mais intenso no clone Roxinha, tendo em frutos maduros níveis similares entre os clones. A AOX2 também apresentou uma variação de expressão entre os clones. A expressão gênica da AOX2 no clone Cereja foi praticamente a mesma em todos os tecidos, diminuindo em frutos maduros. Já o clone Roxinha apresentou um aumento gradual da expressão em frutos semimaduros, permanecendo em frutos maduros. O padrão de expressão gênica das duas AOX era esperado, devido as características fisiológicas e bioquímicas que a acerola detém e de resultados encontrados em outras espécies, mas as diferenças apresentadas entre os clones merecem considerações a respeito desse processo em *Malpighia emarginata* DC. Inicialmente, pelo fato de ser um fruto climatérico a acerola apresenta um elevado pico da taxa respiratória (900 mL CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup>h, em média), mas com uma baixa taxa no pico de produção de etileno (3 µL C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> h) (CARRINGTON e KING, 2002). Esse elevado consumo de oxigênio e liberação de CO<sub>2</sub> dar-se no final do período de maturação e começo da senescência e vem acompanhado da síntese de etileno. A elevação da expressão gênica da AOX1 a partir do estágio de fruto semimaduro em ambos os clones representa uma resposta em nível molecular e bioquímico devido não apenas ao aumento no consumo de oxigênio, mas também a possibilidade de biossíntese de espécies reativas do oxigênio. Esse aumento na expressão gênica reflete que uma ou as duas possibilidades acima estão ocorrendo nesse estágio. O pico climatérico pode coincidir com o estágio de maturação que a acerola teve a expressão gênica da AOX1 aumentada. Desse modo seria natural concluir que essa se revela uma possível relação da expressão gênica da AOX com o estágio de maturação climatérico da acerola. Entretanto, de modo bastante interessante se observa que a expressão gênica da AOX1 é muito mais intensa exatamente no clone que sintetiza menos ácido ascórbico, ou seja, no clone Roxinha. Um ponto relevante é que essa expressão mais elevada não acontece apenas em frutos semimaduros e maduros, mas em frutos verdes já se observava que a diferença entre os dois clones era muito mais favorável ao clone que sintetiza menos ácido ascórbico, ou seja, no clone Roxinha.

A partir daí, a relação existente entre o aumento da expressão gênica da AOX1 e a elevação do grau de amadurecimento climatérico da acerola aparentemente deixa de ser tão estreita, dando ênfase a outro processo bioquímico na qual a AOX esteja participando. A diferença dos níveis de transcritos existentes em frutos verdes evidencia que muito antes de ser estabelecido o pico climatérico a AOX1 se expressa fortemente, mas apenas no clone Roxinha. Somado a esse fato, ocorre outro importante em uma possível ligação da expressão gênica da AOX com a biossíntese do ácido ascórbico. Esse se dá quando são analisados os transcritos da AOX2. Essa enzima é mais conhecida por possuir um padrão de expressão gênica constitutivo, entretanto, quando são comparados os transcritos nos diferentes estádios se pode facilmente comprovar que em um clone a expressão se eleva e no outro clone a expressão reduz gradualmente. Como já foram citadas as diferenças são visíveis, mas ao se observar o clone Cereja reduz sua expressão, contrariamente ao clone Roxinha que a tem gradualmente aumentada. Uma questão relevante quanto a expressão gênica da família de genes AOX2 em eudicotiledôneas se refere ao padrão constitutivo que é amplamente citado na literatura. Durante anos essa idéia foi sistematicamente citada em diferentes artigos, entretanto, recentemente, Costa et al., (2010) com um estudo de expressão em *Vigna unguiculata* mostrou pela primeira vez que uma AOX2 (*VuAOX2b*) se expressava em condições de estresse. Esse achado pôde fundamentar os resultados aqui apresentados em dois clones de *Malpighia emarginata* DC, devido aos padrões de expressão encontrados em ambos os clones. No clone Roxinha, aquele que produz uma taxa bem mais reduzida da vitamina C, existe uma elevação da expressão gênica da AOX2. Essa linha de raciocínio só seria coerente se a expressão gênica da AOX2 no clone Cereja, ou seja, aquele que produz uma quantidade de vitamina C muito superior ao clone Roxinha obtivesse um padrão totalmente diferente. O que foi observado é que realmente esse padrão de expressão no clone Cereja é inversamente proporcional ao do clone Roxinha, diminuindo com o desenvolvimento do fruto. Sendo assim, fica nítido que devido ao fato do clone Cereja produzir elevadas taxas de ácido ascórbico, aparentemente não há a necessidade dos dois genes da AOX (*MeAOX1* e *MeAOX2*) realizarem uma co-expressão, mas o mesmo pensamento para o clone Roxinha que produz até 50% a menos do antioxidante essa co-expressão se revelaria um processo compensatório ante ao combate de espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres.

Esses achados revelam que existe uma diferença marcante nesses dois clones que é fundamental para produzir um resultado tão contrastante na expressão gênica não

apenas da AOX1, mas também da AOX2. O fato que os clones diferem em suas taxas de ácido ascórbico em até 50% reforçam a hipótese que esse processo biossintético é suficientemente impactante no padrão de expressão gênica da AOX em geral. Sendo então a AOX uma enzima que influencia o fluxo de elétrons que migram pela via clássica, desviando-os para a rota alternativa, a quantidade de elétrons existente no complexo III útil na atividade da L-Galactono-1,4 lactono desidrogenase seria evidentemente “regulada” com o aumento da atividade ou da expressão gênica da AOX. Segundo Millar et al., (2003), não se pode descartar que o controle do processo de respiração pode influenciar realmente a síntese de ácido ascórbico nas plantas. Esses mesmos autores relatam que o suprimento de L-Galactono-1,4 lactono, ou seja, do substrato oriundo da mitocôndria é o principal fator da produção e acúmulo de ácido ascórbico nas plantas. Sendo assim, o papel da AOX não seria o principal na biossíntese do ácido ascórbico, mas ela ocuparia uma função secundária ou coadjuvante no processo. A escassez de trabalhos que auxiliem na compreensão do papel da AOX na biossíntese de ácido ascórbico dificulta o estabelecimento de novas proposições que possibilitem o estabelecimento de uma relação entre a enzima e a síntese da vitamina C.

No entanto, um trabalho realizado por Bartoli et al., (2006) trouxe novas perspectivas nessa relação AOX/síntese de ácido ascórbico. Primeiramente, os autores conseguiram superexpressar a AOX1 em *Arabidopsis thaliana* para verificarem se havia relação com a síntese de ácido ascórbico, juntamente com isso as plantas transgênicas foram expostas a diferentes níveis de radiação para se comparar em quais níveis havia mais ácido ascórbico acumulado. O resultado foi que em folhas de *A. thaliana* transformadas houve um aumento significativo da quantidade de ácido ascórbico acumulado quando comparado com o tipo selvagem. Um segundo resultado igualmente importante foi que as atividades enzimáticas da L-Galactono-1,4 lactono desidrogenase apresentadas pelo tipo selvagem e pelas plantas transformadas não apresentavam nenhuma diferença. Esses achados juntamente com os resultados apresentados no presente trabalho com dois clones de *Malpighia emarginata* DC demonstram que a síntese de ácido ascórbico pode ser influenciada pela atividade AOX, que também regula o estado de alta energia da membrana, drenando os elétrons e reduzindo a produção de ROS. A expressão genica mais elevada no clone Roxinha em todos os estádios de desenvolvimento revela que o equilíbrio proporcionado pela atividade da AOX provoca uma doação regulada de elétrons do pool de ubiquinona ao complexo III e conseqüentemente a L-GalLdh; que seria assim mais ajustada as necessidades da L-

GalLdh na síntese de ácido ascórbico. Assim como a intensidade luminosa influencia, pelo menos mais dois fatores com uma característica comum aparentemente se fazem necessários para uma elevação da biossíntese de ácido ascórbico em um nível de MMI. O primeiro em nível de prioridade é a disponibilidade de L-Galactono-1,4 lactono, produzido anteriormente no citoplasma para ser usado como substrato da L-GalLdh, o segundo é a atividade da AOX e o fator em comum é a quantidade de elétrons, ou seja, o estado redox necessário para a atividade da L-GalLdh. Outra consequência crucial para a atividade da L-GalLdh em função da atividade da AOX é o fato da AOX ser uma enzima desacopladora. Esse processo faz com que no decorrer da atividade da AOX uma quantidade cada vez menor de elétrons chegue ao complexo IV até resultar na diminuição ou parada da síntese de ATP. É exatamente aí que a inexistência ou a diminuição de elétrons revelaria que o citocromo C não estaria mais em sua forma reduzida e sim em sua forma oxidada, sendo esse fator essencial para a atividade da L-GalLdh, levando a síntese de ácido ascórbico (Figura 30). Essa linha de interpretação conduziria a um ponto importante relativo a atividade da AOX, que a síntese de ácido ascórbico pela L-GalLdh pode auxiliar na produção de ATP, devido ao fato que a maior parte de citocromo C que dantes estava oxidado resultante da atividade desacopladora da AOX, pode ser revertiva e então ser gerado uma considerável quantidade de citocromo C em sua forma reduzida para posterior doação dos elétrons no complexo IV. Evidentemente que essa “*síntese de ATP associada a via biossíntese de ácido ascórbico pela L-GalLdh*” se configura um modelo totalmente teórico, entretanto ela é perfeitamente plausível de ocorrer devido ao fato que o potencial de elétrons existente entre os complexos impede o retorno dos mesmos ganhos pelo citocromo C para o complexo III resultante da atividade da L-GalLdh, tendo um único destino final, o complexo IV. Não havendo nenhum inibidor no complexo IV e existindo prótons no espaço intermembranar em quantidade suficiente para estabelecer o gradiente de prótons não existiria motivo para não ocorrer a fosforilação do ADP. Aparentemente, a regulação proporcionada pela AOX parece levar a um aumento da síntese da vitamina C, ou pelo menos evita a diminuição da síntese. Esse fato pode ser confirmado quando se compara as diferenças existentes entre os conteúdos de ácido ascórbico e a expressão gênica nos estádios de fruto semimaduro e maduro. Nessa avaliação se pode comprovar que as diferenças nos teores de ácido ascórbico entre os frutos semimaduros e maduros do clone Roxinha são estatisticamente significantes, mas esses teores apresentam uma diferença que ao serem comparadas com a expressão gênica nesses dois estádios existe

uma proximidade de expressão muito maior que no clone Cereja. Ao se observar a diferença na expressão da AOX1 no clone Cereja e os teores de ácido ascórbico nesses dois estádios se pode comprovar que a maior diferença de expressão é diretamente proporcional a maior diferença nos teores de ácido ascórbico, ou seja, a maior expressão da AOX1 no clone Roxinha não proporciona uma elevação da síntese do ácido ascórbico suficiente para superar os teores do clone Cereja, mas favorece positivamente ao evitar o mesmo nível de declínio da síntese que ocorre no clone Cereja. O comportamento apresentado pelo aumento da expressão gênica da AOX1 e AOX2 em *Malpighia emarginata* DC parece ser uma resposta proporcional a quantidade de L-Galactono-1,4 lactono produzido, fruto de um conjunto integrado das atividades das enzimas de sua expressão gênica, ou de ambas presentes na via Wheeler/Smirnoff.

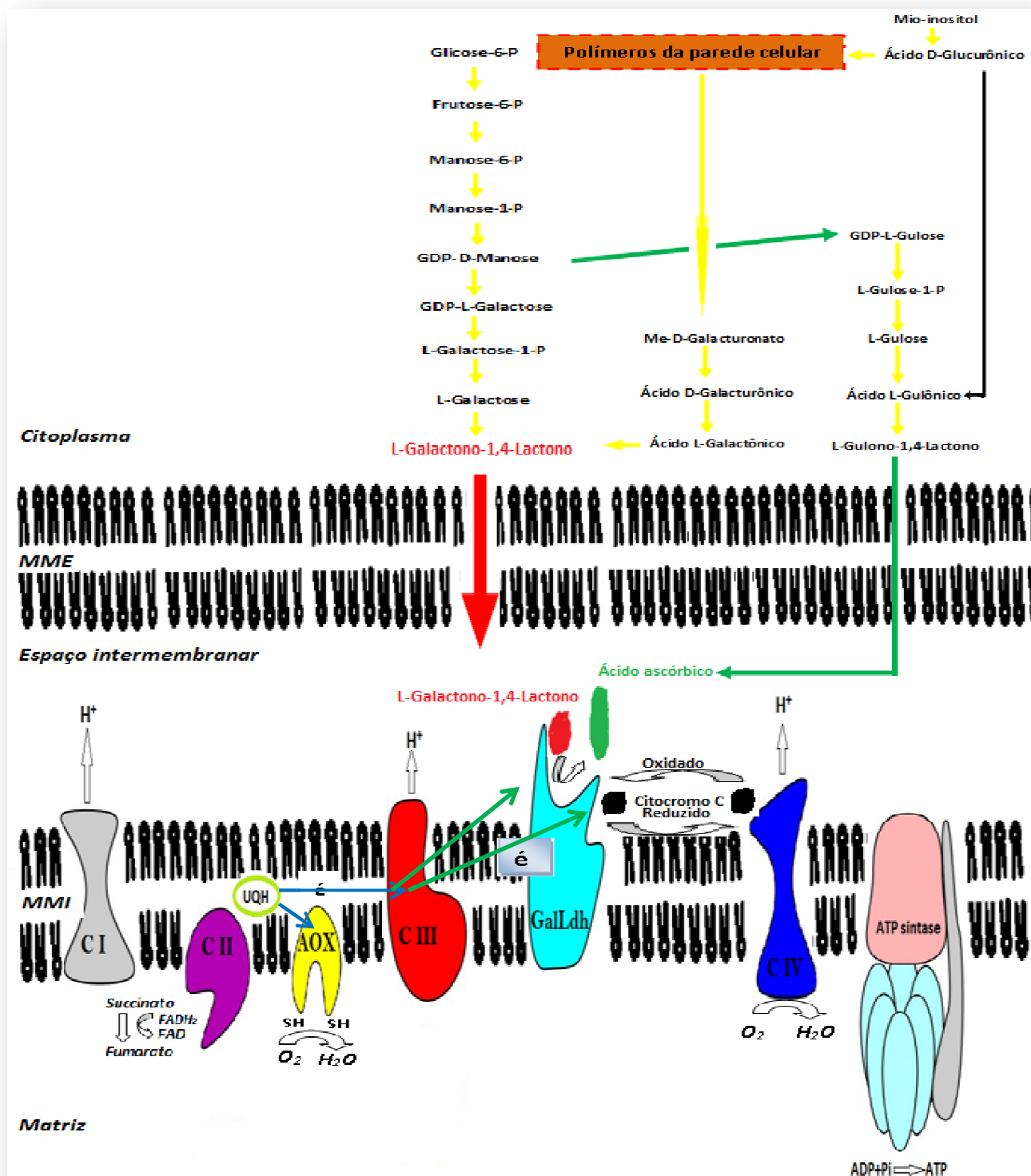


Figura 29. Esquema ilustrando a dinâmica da biossíntese do ácido ascórbico em plantas, mostrando a interação das reações do citoplasma com as reações existentes na membrana mitocondrial interna, principalmente as que envolvem o Complexo III (CIII) com a GalLdh, AOX e o Citocromo C. A GalLdh necessita de L-Galactono 1,4 lactono produzido no citoplasma e do Citocromo C oxidado para gerar o ácido ascórbico. A AOX drena o fluxo de elétrons que é gerado pelo pool de ubiquinona, dosando a quantidade destes para o C III e, por conseguinte para a GalLdh.



## 17. Conclusões

1. As análises do acúmulo de ácido ascórbico existente nos três estádios de desenvolvimento dos clones revelaram que o clone Cereja acumula mais ácido ascórbico que o clone Roxinha, entretanto, a diferença dos níveis existentes entre frutos verdes e frutos maduros revela que o clone Cereja diminui mais acentuadamente as quantidades de ácido ascórbico que o clone Roxinha a medida que se processa o amadurecimento.
2. As enzimas da Via Wheeler/Smirnoff se expressam de forma diferenciada nos três estádios e clones, revelando que nem todas são responsáveis pelas diferenças apresentadas nos níveis de ácido ascórbico dos clones Cereja e Roxinha de *Malpighia emarginata* DC.
3. Três enzimas se destacaram na relação da expressão gênica com a síntese ou acúmulo de ácido ascórbico, sendo as prováveis responsáveis pelas diferenças existentes entre os clones Cereja e Roxinha de *Malpighia emarginata* DC nos diferentes estádios de desenvolvimento. São elas: Manose pirofosforilase, GDP-Manose 3'5' epimerase e GDP Galactose fosforilase. Com maior destaque para a GDP-Manose 3'5' epimerase e GDP Galactose fosforilase.
4. As expressões gênicas da AOX1 e da AOX2 nos dois clones de acerola demonstram que existe um fenômeno bioquímico que influencia fortemente as diferenças nos níveis de transcritos, não sendo descartado que pode ocorrer algum mecanismo de conexão com os diferentes teores de ácido ascórbico produzidos nesses clones.

## 18. Referências bibliográficas

AGUIAR, L. P.  $\beta$ -Caroteno, vitamina C e outras características de qualidade de acerola, caju e melão em utilização no melhoramento genético. 87p. **Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2001.

ALHAGDOW, M.; MOUNET, F.; GILBERT, L.; NUNES-NESI, A.; GARCIA, V.; JUST, D.; PETIT, J.; BEAUVOIT, B.; FERNIE, R. A.; ROTHAN, C.; BALDET, P. Silencing of the Mitochondrial Ascorbate Synthesizing Enzyme L-Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase Affects Plant and Fruit Development in Tomato. **Plant Physiology**, vol. 145, p. 1408–1422 December, 2007.

ALMEIDA, J.I.L.; de ARAUJO, F.E. de. A acerola Instruções preliminares de cultivo. Fortaleza, CE: **EPACE**, 6p. 1992.

ALVES, R. E. Características das frutas para exportação. In: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO ABASTECIMENTO E DA REFORMA AGRÁRIA. Acerola para exportação: procedimentos de colheita e pós-colheita. Brasília: **EMBRAPA/FRUPEX**, p. 9-21, 1996.

ALVES, R. E.; DONADIO, L. C.; MARTINS, A. B. G.; VALENTE, J. P. Cultura da acerola. In: **Fruticultura Tropical**. Jaboticabal: FUNEP, p.15-37, 1992.

ALVES, R. E. Qualidade de Acerola Submetida a Diferentes Condições de Congelamento, Armazenamento e Aplicação Pós-colheita de Cálcio. Lavras: ESAL, 117p. **Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais**, 1999.

ALVES, R.E. Cultura da acerola. In: DONADIO, L.C.; MARTINS, A.B.C.; VALENTE, J.P. **Fruticultura Tropical**. Jaboticabal: **FUNEP/UNESP**, p. 15-37, 1992.

ALVES, R. E.; SILVA, A. Q.; SILVA, H.; MASSER, R.S. Contribuição ao estudo da acerola I. Efeitos do IBA e da sacarose no enraizamento de estacas. In: **CONGRESSO**

BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, Petrolina, PE. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 2, out. p. 19-26, 1991.

ALVES, R. E.; MENEZES, J. B. Caracterização pós-colheita de acerolas vermelhas e amarelas colhidas em pomar comercial. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, 13.,1994, Salvador. Anais. Salvador: SBF, p.99, 1994.

AMARAL, M.Q.G. do. Efeito de topos de ramos sobre o enraizamento de estacas de acerola (*Malpighia glabra* L.) em diferentes substratos. Mossoró, RN: ESAM, 36p. **Tese de graduação**, 1992.

AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M. DRI: Síntese Comentada das Novas Propostas sobre Recomendações Nutricionais para Antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas, v.14, n. 1, p. 71-78, jan./abr, 2001.

AGIUS F.; LAMOTHE R.G.; CABALLERO J.L.; BLANCO J.M.; BOTELLA M.A.; VALPUESTA V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. **Nat Biotech** 21: 177–181, 2003.

ANDERSON J.W.; FOYER C.H.; WALKER D.A. Light-dependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts. **Planta** 158: 442-450, 1983.

AONO, M.; SAJI, H.; FUJIYAMA, K.; SUGITA, M.; KONDO, M.; TANAKA, K.; Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. **Plant Physiology** 107: 645-648, 1995.

ARANHA, F.Q.; MOURA, L.S.A.; SIMÕES, M.O.S. Normalização dos níveis séricos de ácido ascórbico por suplementação com suco de acerola (*Malpighia glabra* L.) ou farmacológica em idosos institucionalizados. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 17, n.3, p.309-317, 2004.

ARAÚJO, P. G. L.; FIGUEIREDO, R. W.; ALVES, R. E.; MAIA, G. A.; PAIVA, J. R.  $\beta$ -Caroteno, ácido ascórbico e antocianinas totais em polpa de frutos de aceroleira

conservada por congelamento durante 12 meses. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 104-107, jan./mar, 2007.

ARAÚJO, P. S. R.; MINAMI, K. Acerola. Campinas: **Fundação Cargill**, 8p, 1994.

ARGLES, G.K. *Malpighia glabra* – Barbados cherry. In: GARNER, R.J. & CHAUDHRI, S.A. The propagation of tropical fruit trees. Fernham Royal, UK: FAO/CAB, p. 386-402 (CAB. **Horticultrual Review**, 4 ), 1976.

ARNHOLDT-SCHMITT, B.; SANTOS MACEDO, E.; PEIXE, A.; CARDOSO, H.C.G.; CORDEIRO A.M. AOX A potential marker for efficient rooting of olive shoot cuttings. Proc. **OLIVEBIOTEQ** 2006, 5 10 Nov. Marsala - Marsara del Vallo, Italy, Vol. 1, p. 249-254, 2006.

AROSTEGUI, F.; PENNOCK, W. La acerola. Rio Piedras. Universidade de Puerto Rico, Estacion Experimental agrícola, 9p. (Universidad de Puerto Rico, EEA. **Publicacion Miscelânea**, 15), 1955.

ARRIGONI, O.; ARRIGONI-LISO, R.; CALABRESE G. Lycorine as an inhibitor of ascorbic acid biosynthesis. **Nature**. 256: 513-514, 1975.

ARRIGONI, O.; BITONTI, M.B.; COZZA, R.; INNOCENTI, A.M.; LISO, R.; VELTRI, R. Ascorbic acid effect on pericycle cell line in *Allium cepa* root. **Caryologia**. 42: 213-216, 1989.

ARRIGONI, O. Ascorbate system in plant development. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, 1994.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **A. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.** 50, 601-639, 1999.

ASENJO, C.E. Acerola. In: NAGY, S.; SHAW, P.E. Tropical and subtropical fruit-composition, properties and uses. **Westport: AVI**, p.341-374, 1980.

BADEJO, A. A.; JEONG, S.T.; GOTO-YAMAMOTO, N.; ESAKA, M. Cloning and expression of GDP-D-mannose pyrophosphorylase gene and ascorbic acid content of acerola (*Malpighia glabra* L.) fruit at ripening stages. **Plant Physiology and Biochemistry** 45, 665-672, 2007.

BADEJO, A. A.; TANAKA, N.; ESAKA, M. Analysis of GDP-D-Mannose Pyrophosphorylase Gene Promoter from Acerola (*Malpighia glabra* L) and Increase in Ascorbate Content of Transgenic Tobacco Expressing the Acerola Gene. **Plant Cell Physiology** 49(1): 126–132, 2008.

BADEJO, A. A.; FUJIKAWA, Y.; ESAKA, M. Gene expression of ascorbic acid biosynthesis related enzymes of the Smirnoff-Wheeler pathway in *Malpighia glabra* L. **Journal of Plant Physiology**. 2008.

BARNABÉ, D.; VENTURINI FILHO, W.G. Características Físico-químicas e Sensoriais de Refrigerantes de Acerola Produzidos a partir de Suco Desidratado e Extrato Seco da Fruta. **Journal of Food Technology**, v. 7, p. 69- 76, jan./jun., 2004.

BARATA-SOARES, A.D.; GOMEZ, M.L.P.A.; MESQUITA, C.H. de; LAJOLO, F.M. Ascorbic acid biosynthesis: a precursor study on plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 16(3): 147-154, 2004.

BARTOLI, C.G.; PASTORI G.M.; FOYER G.M. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. **Plant Physiology** 123, 335–343, 2000.

BARTOLI, C. G.; GUIAMET, J. J.; KIDDLE, G.; PASTORI, G. M.; DI CAGNO, R.; THEODOULOU, F. L.; FOYER, C. H. 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** 28, 1073–1081, 2005.

BARTOLI, C.G.; YU, J.; GOMEZ, F.; FERNANDEZ, L.; MCINTOSH, L.; FOYER C.H. Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid

synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 57, No. 8, p. 1621–1631, 2006.

BATISTA, F.A.S.; MUGRUET, B.R.R.; BELTRÃO, A.E.S. Comportamento, da aceroleira na Paraíba. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, 10, Fortaleza, 1989. **Anais**. Fortaleza, SBF/BNB, p.26-32, 1991.

BERTHOLD, D.A.; STENMARK, P. Membrane-bound diiron carboxylate proteins. **Annual Review of Plant Biology**. V.54, p. 497-517, 2003.

BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E.; SILVA, M.F.F. da; SOUZA, A.A. de M. Enraizamento de estacas de acerola com ácido endolbutírico e ácido alfa-naftalenoacético com baixas concentrações em duas épocas. IN: **CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA**, 12, 1992, Porto Alegre, RS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1, p. 1-6, 1992.

BRUNINI, M. A.; MACEDO, N. B.; COELHO, C. V.; SIQUEIRA, G. F. Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 26, n. 3, p. 486-489, dezembro, 2004.

BULLEY, S. M.; RASSAM, M.; HOSER, D.; OTTO, W.; SCHUNEMANN, N.; WRIGHT, M.; MACRAE, E.; GLEAVE, A.; LAING, W. Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 765–778, 2009.

CAMPILLO, A. del; ANSEJO, C.F. The distribution of ascorbic acid, dehydroascorbic acid, and diketogulonic acid in the acerola fruit at different stages of development. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**, v.41, p. 161-166, 1957.

CARRASCO-LUNA, J.; CALATAYUD, A.; GONZALEZ-DAROS, F. DE VALLE-TASCON S. Hexacyanoferrate (III) stimulation of elongation in coleoptile segments from *Zea mays* L. **Protoplasma** 184: 63-71, 1995.

CARRINGTON, C.M.S.; KING, R.A.G. Fruit development and ripening in Barbados cherry, *Malpighia emarginata* D.C. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.92, n.1, p.1-7, 2002.

CASTILLO, F.J.; GREPPIN, H. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. **Environmental and Experimental Botany** 28: 231-238, 1988.

CITTERIO, S.; SGORBATI, S.; SCIPPA, S.; SPARVOLI, E.; Ascorbic acid effect on the onset of cell proliferation in pea root. **Physiologia Plantarum**. 92: 601-607, 1994.

CLELAND, R. E.; GRACE, S. C. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. **FEBS Letters** 457, 348-352, 1999.

CLIFTON, R.; LISTER, R.; PARKER, K.L.; SAPPL, P.G.; ELHAFEZ, D.; MILLAR, A.H.; DAY, A.D.; WHELAN, J. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology** V.58: p. 193-212, 2005.

CONKLIN, P.L.; SARACCO S.A.; NORRIS S.R.; LAST, R.L. Identification of ascorbic acid-deficient *Arabidopsis thaliana* mutants. **Genetics** 154, 847-856, 2000.

CONKLIN, P.L.; WILLIAMS, E.H.; LAST, R.L. Environmental stress sensitivity of an ascorbate deficient *Arabidopsis* mutant. **Proceedings of the National Academy of Science, USA**, 1996.

CONKLIN, P.L.; GATZEK, S.; WHEELER, G.L.; DOWDLE, J.; RAYMOND, M.J.; ROLINSKI, S.; ISUPOV, M.; LITTLECHILD, J.A.; SMIRNOFF, N. *Arabidopsis thaliana* VTC4 Encodes L- Galactose-1-P Phosphatase, a Plant Ascorbic Acid Biosynthetic Enzyme. **The journal of biological chemistry** V. 281, n. 23, p. 15662-15670, 2006.

CONKLIN, P.L.; NORRIS, S.R.; WHEELER, G.L.; WILLIAMS, E.H.; SMIRNOFF, N. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 96: 4198–4203, 1999.

CONSIDINE, M.J.; HOLTZAPFFEL, R.C.; DAY, D.A.; WHELAN, J.; MILLAR, A.D. Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. **Plant Physiology**. V.129: p. 949-953, 2002

COSTA, L. C.; PAVANI, M. C. M. D.; MORO, F. V.; PERECIN, D. Viabilidade de Sementes de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC): Avaliação da Vitalidade dos Tecidos. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.25, n.3, p. 532-534, dezembro, 2003.

COSTA, M. J. C. Estimativas de repetibilidade de alguns caracteres de produção em mangueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 263-266, mar./abr., 2003.

COSTA, J. H.; MOTA, E. F. ; CAMBURSANO, M. V.; LAUXMANN, M. A. ; DE OLIVEIRA, NOGUEIRA L.M. ; SILVA LIMA, M. DA G. ; ORELLANO, E. G. ; FERNANDES DE MELO, D. . Stress-induced co-expression of two alternative oxidase (VuAox1 and 2b) genes in *Vigna unguiculata*. **Journal of Plant Physiology**. v. 167, p. 561-570, 2010.

COSTA, J. H. ; JOLIVET, Y. ; HASENFRATZ-SAUDER, M. P. ; ORELLANO, E. G.; LIMA, M. S. ; DIZENGREMEL, P. ; FERNANDES DE MELO, D. Alternative oxidase regulation in roots of *Vigna unguiculata* cultivars differing in drought/salt tolerance. **Journal of Plant Physiology** v. 164, p. 718-727, 2007.

DE LEO P.; DALESSANDRO, G.; DE SANTIS, A.; ARRIGONI, O. Inhibitory effect of lycorine on cell division and cell elongation. **Plant and Cell Physiology**. 14: 481-486, 1973.

DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W.W.I. The carotenoid zeaxanthin and high-energy-state quenching of chlorophyll fluorescence. **Photosynthesis Research** 25, 187–198, 1990.



DI MATTEO, A.; SACCO, A.; ANACLERIA, M.; PEZZOTTI, M. DELLEDONNE, M.; FERRARINI, A.; FRUSCIANTE, L.; BARONE, A. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. **BMC Plant Biology**, 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15. 1990.

DOWDLE, J.; ISHIKAWA, T.; GATZEK S.; ROLINSKI, S.; SMIRNOFF, N. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. **The Plant Journal** 52, 673–689, 2007.

ESAKA, M.; FUJISAWA, K.; GOTO, M.; KISU, Y. Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. **Plant Physiology** 100: 231-237, 1992.

ESAKA, M.; FUKUI, H.; SUZUKI, K.; KUBOTA, K. Secretion of ascorbate oxidase by suspension-cultured pumpkin cells. **Phytochemistry** 28: 117-119, 1989.

ESAKA, M.; HATTORI, T.; FUJISAWA, K.; SAKAJO, S.; ASAHI T. Molecular cloning and nucleotide sequence of full-length cDNA for ascorbate oxidase from cultured pumpkin cells. **European Journal of Biochemistry** 191: 537-541, 1990.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RTVAS, C., WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUEIRA, C. Anthocyanin based natural colorants: a new source of antiradical activity for food stuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 1588-1592, 2000.

FERREIRA, R. M. DE A.; AROUCHA, E. M. M.; SOUZA, P.A.; QUEIROZ, R.F. PONTES FILHO, F.S.T. Ponto de colheita da acerola visando à produção industrial de polpa. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.4, n.2, p. 13 - 16 abril/junho, 2009.

FINNEGAN, P. M.; WHELAN, J.; MILLAR, A. H.; ZHANG, Q.; SMITH, M.K.; WISKICH, J.T; DAY, D.A. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. **Plant Physiology** 114: 455–66, 1997.

FINNEGAN, P.F.; SOOLE, K.L.; UMBACH, A.L. Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. In Day, D.A., Millar, H., Whelan, J. **Plant mitochondria: from genome to function**. V. 17: p. 163-320, 2004.

FORNARO, A. e COICHEV, N. Ácido l-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. **Química Nova**, Vol. XXI, No. 05, 642-650, 1998.

FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta** 133, 21-25, 1976.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; GALAP, C.; KUNERT, K.J. Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. **Plant Physiology** 97: 863-872, 1991.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In: Yamamoto HY, Smith CM, eds. *Photosynthetic responses to the environment*. Rockville, Maryland: **American Society of Plant Physiologists**, 88-101, 1993.

FOYER, C.H.; SOURIAU, N. PERRET, S.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J.; PRUVOST, C.; JOUANIN L. Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. **Plant Physiology** 109: 1047-1057, 1995.

FOYER, C.H. Ascorbic acid. In: Alscher RG, Hess JL, eds. **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 31-58, 1993.

FORTI, G.; JAGENDORF, A. T. Photosynthetic phosphorylation in the absence of redox dyes: oxygen and ascorbate effects. **Acta Biochimica Biophysica**. 54, 322-330, 1961.

GATZEK, S.; WHEELER, G.S.; SMIRNOFF, N. Antisense suppression of L-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated L-galactose synthesis. **The Plant Journal**. 541-553. 2002.

GOMES, E.; DILERMANO, P.; MARTINS, A. B. G.; FERRAUDO, A. S. Análise de grupamentos e de componentes principais no processo seletivo em genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* DC). **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.22, n.1, p. 36-39, abril, 2000a.

GOMES, J. E.; PERECIN, D.; MARTINS, A. B. G.; ALMEIDA, E. J. Variabilidade fenotípica em genótipos de acerola. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p.2205-2211, novembro, 2000c.

GONZAGA NETO, L. Melhoramento genético da aceroleira na Embrapa Semi-Árido. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: **Embrapa Semi-Árido/Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, <http://www.cpatsa.embrapa.br/servicos/catalogo/livrorg/acerolasemiariid> o.doc. Acesso em: 18/02/ 2005, 1999.

GONZALEZ-REYES J.A.; ALCAIN, F.J.; CALER, J.A.; SERRANO, A.; CORDOBA, F.; NAVAS, P. Stimulation of onion root elongation by ascorbate and ascorbate free radical in *Allium cepa* L. **Protoplasma** 184: 31-35, 1995.

GONZALEZ-REYES, J.A. HIDALGO, A.; CALER, J.A.; PALOS, R.; NAVAS, P. Nutrient uptake changes in ascorbate free radical-stimulated roots. **Plant Physiology** 104: 271-276, 1994.

GRIFFIN, A.M., POELWIJK, E.S., MORRIS, V.J. e GASSON, M.J. Cloning of the *aceF* gene encoding the phosphomannose isomerase and GDP-mannose pyrophosphorylase activities involved in acetan biosynthesis in *Acetobacter xylinum*. **Fems Microbiology Letters** 154: 389-396, 1997.

HAGER, A. Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der Enzymatischen Violaxanthin- zu Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. **Planta** 89, 224–243, 1969.

HEBER, U.; MIYAKE, C.; MANO, J.; OHNO, C.; ASADA, K. Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectroscopy is a sensitive probe of oxidative stress in intact leaves. **Plant Cell Physiology** 37, 1066-1072, 1996.

HIDALGO, A.; GONZALEZ-REYES, J.A.; NAVAS, P. Ascorbate free radical enhances vacuolarization in onion root meristems. **Plant, Cell and Environment**. 12: 455-460, 1989.

HOLMQUIST, J.de D. Ensayo comparativo de injertación del semeruco a acerola (*Malpighia glabra* L.). **Proceedings of the Caribbean Region American Society for Horticultural Science** v.10, p. 46-56, 1966.

INNOCENTI, A.M.; BITONTI, M.B.; ARRIGONI, O.; LISO, R. The size of the quiescent center in roots of *Allium cepa* L. grown with ascorbic acid. **New Phytologist**. 114: 507-509, 1990

INTERNATIONAL BOARD PLANT GENETIC RESOURCES (Rome, Italy). *Malpighia emarginata* (Acerola). In: **INTERNATIONAL BOARD FOR PLANT GENETIC RESOURCES** (Rome, Italy). Genetic resources of tropical and subtropical fruits and nuts (excluding musa). Rome, p. 52-54, 1986.

IOANNIDI, E.; KALAMAKI, M.S.; ENGINEER, C.; PATERAKI, I.; ALEXANDROU, D.; MELLIDOU, I.; GIOVANNONNI, J.; KANELIS, A. K. Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. **Journal of Experimental Botany**. p.1-16, 2009.

ISHERWOOD, F.A.; CHEN, Y.T.; MAPSON, L.W. Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. **Biochemistry Journal**. 56, 1–21, 1954.

JORGENSEN, K.; SKIBSTED, L.H. Carotenoid scavenging of radicals. *Z. Lebensm Unters Forsch*, n.5, p.423-429,1993.

KERK, N.M.; FELDMAN, L.J. A biochemical model for the initiation and maintenance of the quiescent center-implication for organisation of root meristems. *Development*. 121: 2825, 1995.

LAING, W. A.; BULLEY, S.; WRIGTH, M.; COONEY, J.; JENSEN, D.; DI BARRACLOUGH; MACRAE, E. A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *PNAS*. 48, 16976-16981, 2004.

LEDIN, R. B. A comparison of three clones of barbados cherry and the importance of improved sections for comercial planting. *The Processings of Flórida State Horticultural Society*, Goldenrod, v. 69, p. 293-297, 1956.

LEDIN, R.B. The Barbados or West Indian cherry: Gainesville: **University of Florida**, p.28, 1958.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, L. S.; NASCIMENTO, P. P. Caracterização físico- química e sensorial de pitanga roxa. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 22, n. 3, p. 382-385, dezembro, 2000.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; MACIEL, M. L S.; LIMA, D. E. S. Avaliação de teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 101-103, 2003.

LIN, L-S.; VARNER, J.E. Expression of ascorbic acid oxidase in zucchini squash (*Cucurbita pepo* L.). *Plant Physiology* 96: 159-165, 1991.

LINSTER, C.L.; GOMEZ, T.A.; CHRISTENSEN, K.C.; ADLER, L.N.; YOUNG, B.D.; BRENNER, C.; CLARKE, S.G.. Arabidopsis *VTC2* encodes a GDP-L-Galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic

acid in plants. **The journal of biological chemistry** vol. 282, n. 26, p. 18879–18885, june, 2007.

LINSTER, C.L.; CLARKE, S.G. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. **Trends in plant science**. p. 1360-1385, 2008.

LISO, R.; INNOCENTI, A.M.; BITONTI, M.B.; ARRIGONI, O. Ascorbic acid induced progression of quiescent centre cells from G1 to S phase. **New Phytologist**. 110: 469-471, 1988.

LOPES, R.; BRUCKNER, C. H.; LOPES, M. T. G. Polinização e vingamento de frutos em aceroleira (*Malpighia puniceifolia* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 22, n. 3, p. 314-317, 2000.

LOPES, R.; PAIVA, J. R. Aceroleira. In: BRUCKNER, C.H. Melhoramento de Fruteiras Tropicais. Editora **Universidade Federal de Viçosa/UFV**. p. 63-99, 2002.

LUCAS, A.P. Acerola: suco da saúde conquista o mundo inteiro. **Manchete Rural**, Rio de Janeiro, v.5, n. 69, p.10-13. Janeiro,1993.

LUWE, M.W.F.; TAKAHAMA, U.; HEBER, U. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. **Plant Physiology** 101: 969, 1993.

MAPSON, L. W. Photo-oxidation of ascorbic acid in leaves. **Biochemistry Journal**. **85**, 360-369, 1962.

MARIANO NETTO, L. Acerola: A cereja tropical. São Paulo: **Nobel**, 94p, 1986.

MARRE, E.; ARRIGONI, O.; ROSSI, G. Ascorbic acid and photosynthesis. II. Anaerobic photo-oxidation of ascorbic acid by chloroplast fragments and by whole chloroplasts. **Biochimica.Biophysica Acta** 36, 56-64, 1959.

MARTINS, C. G. M.; LORENZON, M. C. A.; BAPTISTA, J. L. Eficiência de Tipos de Polinização em Acerola. **Caatinga**, Mossoró, v.12, n. 1, p. 55-59, dezembro, 1999.

MARTY, G.M.; PENNOCK, W. Práticas agronômicas para el cultivo comercial de la acerola em Puerto Rico. **Revista de Agricultura de Puerto Rico**, v. 52, p. 107-111, 1965.

MARUTA, T.; YONEMITSU, M.; YABUTA, Y.; TAMOI, M.; ISHIKAWA, T.; SHIGEOKA, S. *Arabidopsis* Phosphomannose isomerase 1, but not Phosphomannose isomerase 2, is essential for ascorbic acid biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry** vol. 283, No. 43, p. 28842–28851, 2008.

MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; SILVA, L. F. M. Suco de Acerola Microfiltrado: Avaliação da Vida de Prateleira. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n. 2, p.293-297, abril-junho, 2004.

MAXWELL, D.P.; WANG, Y. E MCINTOSH, L., The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. **Plant Biology**. V.96: p. 8271-8276, 1999.

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin- modelling and structural relationships. **European Journal of Biochemistry** 187: 341-352, 1990.

MILLAR, A. H.; MITTOVA, V.; KIDDLE, G.; HEAZLEWOOD, J. L.; BARTOLI, C.G.; THEODOULOU, F.L.; FOYER, C.H. Control of Ascorbate Synthesis by Respiration and Its Implications for Stress Responses **Plant Physiology**, October Vol. 133, p. 443–447, 2003.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in the thylakoids. **Plant and Cell Physiology** 33: 541-553, 1992.

MOSER, O.; KANELLIS, A.K. Ascorbate oxidase of *Cucumis melo* L. var *reticulatus*: purification, characterization and antibody production. **Journal of Experimental Botany** 45: 717-724, 1994.

MUSSER, R. S.; LEMOS, M. A.; LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LEDERMAN, I. E.; SANTOS, V. F. Características Físico-químicas de Acerolas do Banco Ativo de Germoplasma de Pernambuco. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 556 - 561, 2004.

MUSSER, R. S.; LEMOS, M. A.; LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LEDERMAN, I. E.; SANTOS, V. F. Caracterização física e de produção de acerola do banco ativo de germoplasma em Pernambuco. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 27, n. 2, p. 320-323, 2005.

NAKASONE, H.Y.; YAMANE, G.M.; MIYASHITA, R.K. Selection, evaluation, and naming of acerola (*Malpighia glabra* L.) Cultivar. **University of Hawaii**. 19p. (Circular n. 65),1968.

NASCIMENTO, C.E. da S. Efeito do ácido indolbutírico sobre o enraizamento de estacas semilenhosas de acerola, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 11, 1991, Petrolina PE. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 3, out. p. 255-257, 1991.

NAVAS, P.; GOMEZ-DIAZ, C. Ascorbate free radical and its role in growth control. **Protoplasma**. 184: 8-13, 1995.

NEUBAUER, C.; YAMAMOTO, H.Y. Mehler-peroxidase reaction mediates zeaxanthin formation and zeaxanthin-related fluorescence quenching in intact chloroplasts. **Plant Physiology** 99: 1354-1361, 1992.

NEUBAUER, C.; YAMAMOTO, H.Y. The role of ascorbate in the related ascorbate peroxidase, violaxanthin de-epoxidase and non-photochemical fluorescence-quenching activities. In: Yamamoto HY, Smith CM, eds. *Photosynthetic responses to the environment*. Rockville, Maryland: **American Society of Plant Physiologists**, 166-171, 1993.

NIYOGI, K. K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. **Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology**. 50, 333-359, 1999.



NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology** 49, 249-279, 1998.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; MORAES, J. A. P. V.; BURITY, H. A.; JÚNIOR, J. F. S. Efeitos do Estádio de Maturação dos Frutos nas Características Físico-Químicas de Acerola. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 463-470, abril, 2002.

ÔBA, K.; ISHIKAWA, S.; NISHIKAWA, M.; MIZUNO, H.; YAMAMOTO, T. Purification and properties of L-galactono-c-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. **Jounal Biochemistry** 117: 120–124, 1995.

OHKAWA, J.; NISHI, Y.; OKADA, N.; YOSHIDA, K.; TAKANO, M.; SHINMYO A. Primary structure of cucumber (*Cucumis sativa*) ascorbate oxidase deduced from cDNA sequence-homology with blue copper proteins and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 86: 1239-1243, 1989.

OHKAWA, J.; OHYA, T.; NOZAWA, H.; TAKANO, M. Structure of the genomic DNA encoding cucumber ascorbate oxidase and its expression in transgenic plants. **Plant Cell Reports** 13: 481-488, 1994.

OLIVEIRA, R. G.de, GODOY, H. T. e PRADO, M. A. Quantificação dos isômeros ácido l-ascórbico e ácido d-*iso*-ascórbico em geleias de frutas por cromatografia líquida de alta eficiência. **Quimica. Nova**, Vol. XY, No. 00, 1-5, 2011.

O'MALLEY, D.M.; WHETTEN, R.; BAO, W.; CHEN, C.L.; SEDEROFF, R.R. The role of laccase in lignification. **The Plant Journal** 4: 751-757, 1993.

ØSTERGAARD, J.; PERSIAU, G.; DAVEY, M.W.; BAUW, G.; VAN MONTAGU M. Isolation of a cDNA coding for l-galactono-g-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Jounal Biology Chemistry** 272: 30009–30016, 1997.

PADH, H. Cellular functions of ascorbic acid. **Biochemistry and Cell Biology** 68, 1166–1173, 1990.

PAIVA, J. R.; ALVES, R. E.; BARROS, L. M. Melhoramento genético da aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.) na Embrapa Agroindústria Tropical. In: QUEIROZ, M. A.; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R., (Ed.) Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina: **Embrapa Semi Árido**; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999a.

PAIVA, J. R.; ALVES, R. E.; BARROS, L. M.; CRISÓSTOMO, J. R.; MOURA, C. F. H.; ALMEIDA, A. S. Seleção de clones de acerola (*Malpighia emarginata*) no Estado do Ceará, Brasil. **Proc. Interamer. Soe. Trop. Hort.**, v. 47, p. 99-102, outubro, 2003.

PAIVA, J. R.; CAVALCANTI, J. J. V.; NETO, H. S.; FREITAS, A. S. M., SOUSA, F. H. L. Variabilidade genética em caracteres morfológicos de populações de plantas jovens de acerola. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v. 23, n. 2, p. 350-352, 2001a.

PAIVA, J.R.; ALVES, R.E.; ALMEIDA, A. S.; PINTO, S.A.A. Conteúdo de vitamina C em plantas de acerola selecionadas nas gerações paternal e filial. Fortaleza: **Embrapa-CNPAT** . 3p, 1998.

PATERAKI, I.; SANMARTIN, M.; KALAMAKI, M.; S.; GERASOPOULOS, D.; KANELLIS, A. K. Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 403, p. 1623–1633, August, 2004.

PETINARI, R. A.; TARSITANO, M. A. A. Análise Econômica da Produção de Acerola para Mesa, em Jales-SP: Um estudo de caso. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal**, v.24, n.2, p. 411- 415, agosto, 2002.

POLLE, A.; CHAKRABARTI, K.; SCHURMANN, W.; RENNENBERG, H. Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular

and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). **Plant Physiology** 94: 312-319, 1990.

RADZIO, J. A.; LORENCE A.; CHEVONE B.I.; NESSLER C.L. L-Gulonolactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient Arabidopsis vtc mutants. **Plant Molecular Biology** 53, 837–844, 2003.

RAUTENKRANZ, A.A.F; LI, L.; MACHLER, F.; MARTINOIA, E.; OERTLI, J.J. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acids across protoplast and vacuole membranes isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.cv Gerbel) leaves. **Plant Physiology** 106: 187-193, 1994.

RITZINGER, R.; KOBAYASHI, A. K.; OLIVEIRA, J. R. P. A cultura da acerola. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 198p, 2003.

SIENDONES, E.; GONZALEZ-REYES, J.; SANTOS-OCANA, C.; NAVAS, P.; CÓRDOBA, F. Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean: l-galactono-g-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. **Plant Physiology** 120: 907–912, 1999.

SILVA, D. S. Estabilidade do suco tropical de goiaba (*Pisidium guajava* L) obtido pelos processos de enchimento à quente e asséptico. 2007. 82p. Dissertação (**Mestrado em Tecnologia de Alimentos**) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SILVA, J. J. M. Fatores que afetam o conteúdo do ácido ascórbico da acerola (*Malpighia glabra* L.). **Caderno de Agricultura**, v. 1, n. 1, p. 23,1994.

SIMÃO, S. Cereja das Antilhas. In: SIMÃO, S. **Manual de Fruticultura**. São Paulo: Agronômica Ceres, cap.15, p. 477-485, 1971.

SMIRNOFF, N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff N, ed. *Environment and plant metabolism. Flexibility and acclimation*. Oxford: **Bios Scientific Publishers**, 217-243, 1995.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion Plant Bioogy**. **3**, 229-235, 2000.

SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P.L.; LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. **Annual Review Plant Physiology. Plant Mol. Biol.** 52:437-67, 2001.

SOUZA, H. K. O.; SILVA, V. E.; FILGUEIRA, M. A.; CHAVES, J. W. N. Infestação da Aceroleira por *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera, Tephritidae) em Mossoró-RN. **Caatinga**, Mossoró, v. 12, n. 1, p. 25-28, dezembro, 1999.

STROHECKER, R., HENNING, H. M. Analisis de vitaminas: métodos comprobados. **Madrid: Paz Montalvo**. 428p., 1967.

STURGEON, B. E.; SIPE, H. J.; BARR, D. P.; CORBETT, J. T.; MARTINEZ, J. G.; MASON, R. P. The fate of the oxidizing tyrosyl radical in the presence of glutathione and ascorbateöimplications for the radical sink hypothesis. **Jounal Biology Chemistry**. 273, 30116-30121, 1998.

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. The association of ascorbate and ascorbate oxidase in the apoplast with IAA-enhanced elongation of epicotyls from *Vigna angularis*. **Plant and Cell Physiology** 35: 257-266, 1994.

TAKAHAMA, U.; VELJOVIC-IONANOVIC, S.; HEBER, U. Effects of the air pollutant SO<sub>2</sub> on leaves. Inhibition of sulphite oxidation in the apoplast by ascorbate and of apoplastic peroxidase by sulfate. **Plant Physiology** 100: 261-266, 1992.

VALPUESTA, V.; BOTELLA, M.A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: New pathways for an old antioxidant. **Trends in Plant Science**. p.573-574, 2004.

VANNUCCHI, H. A. F.; JORDÃO JÚNIOR. Vitaminas hidrossolúveis, In J. E. Dutra-de-Oliveira, & J. S. Marchini. **Ciências Nutricionais**. São Paulo: Sarvier. v. 403, p.191-208, 1998.

WHEELER, G.L.; JONES, M.A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature** 393, 365–369, 1998.

WOLUCKA, B.A.; VAN MONTAGU M. GDP-mannose-3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. **Journal Biology Chemistry** 278: 47483–47490, 2003.

WTCR/AICR - World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research. Food Nutrition and Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington: WTCR/AICR, p.670, 1997.