**ATIVACÃO DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL DESACOPLADORA E
OXIDASE ALTERNATIVA EM TUBÉRCULOS DE BATATA ARMAZENADOS
SOB REFRIGERAÇÃO**

FAGONI FAYER CALEGARIO

Engenheiro Agrônomo

Orientador de Programa: Prof. Dr. DURVAL DOURADO NETO

**Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura
“Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Agronomia,
Área de Concentração: Fitotecnia.**

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Março - 2001

ERRATA

Página	Linha	Onde se lê	Lê-se
9	11-12	oxidação fosforilativa	fosforilação oxidativa
10	15	ΔpH	$\Delta \Psi$
10	15	$\Delta \Psi$	ΔpH
31	12	0,5 mg de proteína	0,5 mg mL ⁻¹ de proteína
28	14	frutos	tubérculos
-	-	kD	kDa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Calegario, Fagoni Fayer

Ativação de proteína mitocondrial desacopladora e oxidase alternativa em
tubérculos de batata armazenados sob refrigeração / Fagoni Fayer Calegario. - -
Piracicaba, 2001.

75 p.

Tese (doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Armazenamento refrigerado 2. Batata armazenada 3. Metabolismo vegetal 4.
Mitocôndria 5. Proteína 6. Tubérculo I. Título

CDD 633.491

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Data de depósito junto à CPG/ESALQ

05 / 03 / 2004

À Natasha, o amor da minha vida

À minha mãe, minha fonte de calma e paz

Ao meu pai, o carinho em pessoa

Em memória de Mariazinha Faier

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Anibal Vercesi pela orientação, amizade e pela oportunidade de treinamento e aprendizado que tive junto de sua equipe. Ao Laboratório de Bioenergética, Departamento de Patologia Clínica, UNICAMP, onde este trabalho foi realizado.

À FAPESP, FINEP/PRONEX e CAPES pelo auxílio financeiro.

À Márcia Fagian e Ricardo Cosso pela colaboração em vários experimentos. Ao Matheus Vercesi e Claudia Silva pelas preparações mitocondriais. À Graziela Milani pelas sugestões nos experimentos do oxígrafo. Aos amigos do Laboratório pela colaboração e apoio em momentos difíceis.

A Helymar Machado, Andréa Semoline e Cleide Silva pelas análises estatísticas.

Ao Prof. Roger Castilho pelas sugestões e pela solidariedade.

Aos Profs. Antonio Lucchesi (*in memoriam*) e Durval Dourado Neto pelo grande incentivo. Ao Prof. Durval pela formatação final da tese.

Ao Prof. Wilson Jardim pela colaboração e amizade. À Fernanda Almeida, pela imensa ajuda nos problemas de bancada e na redação do artigo. Ao José Roberto Guimarães pelas sugestões. Ao Carlos Furtado por me acompanhar na lavoura de tomates. Ao GIA pelo empréstimo de materiais. Aos Profs. Célio Pasquini e Jarbas Rohwedder pelo esclarecimento de várias dúvidas. Ao Ivo Raimundo Jr. pela revisão do artigo. À Andrea Pompei e demais amigos do Laboratório de Química Ambiental, IQ/UNICAMP, pela amizade e alegre convivência.

Ao Sr. Gentil do Prado pelo fornecimento dos frutos e ao Sr. Herval Almeida pela assistência no campo. Ao Valdemir Ravagnani pela localização das lavouras de tomate Santa Clara.

Aos Profs. Paulo Arruda, Adilson Leite e ao Laboratório de Genética de Plantas, CBMEG/UNICAMP, pelos equipamentos e reagentes usados nas imunodeteccções. Aos amigos Ivan Maia e Jiri Borecky por me ensinarem a técnica e pelas valiosas sugestões. À Andrea Almeida, Prof. Jorge Vega e Prof. Thomas Elthon pelo fornecimento de anticorpos. A Andréa Almeida, Alba Chiesse e aos amigos do Laboratório de Plantas

pelas sugestões. À Adriana Capella pelo carinho e apoio. A Euripedes Ribeiro Júnior por estar presente durante várias fases da elaboração desta tese, sugerindo e ajudando.

Ao Prof. Ricardo Oliveira e sua família pelo incentivo.

Ao Paulo Bagdonas por cuidar da Natasha para que eu pudesse desenvolver meu trabalho com tranquilidade.

À minha família e, principalmente, a meus pais pela imensa ajuda em todos os sentidos.

A Deus, presente mesmo quando todos estavam ausentes.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xiv
SUMMARY	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Metabolismo em produtos vegetais colhidos.....	3
2.2 Glicólise.....	5
2.3 Mitocôndrias	7
2.4 Ciclo dos ácidos tricarboxílicos	8
2.5 Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa	9
2.6 Avaliações da taxa respiratória de produtos colhidos	11
2.7 Respiração resistente a cianeto ou respiração sustentada pela AOX	14
2.8 Proteína desacopladora.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo	21
3.1.1 Construção do equipamento (aparato).....	21
3.1.2 Material vegetal.....	24
3.1.3 Tratamentos	26
3.1.4 Avaliações do material vegetal	27
3.1.5 Delineamento experimental.....	27
3.2 Indução de proteína mitocondrial desacopladora em tubérculos de batata armazenados sob refrigeração	27
3.2.1 Material vegetal.....	27
3.2.2 Tratamentos	28
3.2.3 Avaliações do material vegetal	28
3.2.4 Delineamento experimental.....	34

4	RESULTADOS.....	35
4.1	Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo	35
4.1.1	O equipamento.....	35
4.1.2	Calibração do teor de CO ₂ no reator	36
4.1.3	Precisão do método	37
4.1.4	Saturação de CO ₂	37
4.1.5	Medida da taxa respiratória.....	38
4.1.6	Taxa respiratória de frutos do tomateiro colhidos em diferentes estádios de maturidade.....	39
4.2	Indução de proteína desacopladora em tubérculos de batata armazenados sob refrigeração.....	42
4.2.1	Taxa respiratória de tubérculos de batata inteiros.....	42
4.2.2	Atividade da PUMP estimada pela formação de potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\Psi$)	44
4.2.3	Atividade da PUMP estimada pelo consumo de oxigênio pelas mitocôndrias: respiração sustentada pela PUMP	46
4.2.4	Detecção imunológica da PUMP	48
4.2.5	Capacidade da AOX estimada pelo consumo de oxigênio pelas mitocôndrias.....	49
4.2.6	Detecção imunológica da AOX	54
5	DISCUSSÃO	55
5.1	Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo	55
5.2	Indução de proteína desacopladora em tubérculos de batata armazenados sob refrigeração.....	57
6	CONCLUSÕES	62
6.1	Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo	62

6.2 Indução de proteína desacopladora em tubérculos de batata armazenados
 sob refrigeração..... 62

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representação dos carreadores de elétrons (I a IV) e ATP sintetase (componentes FoF ₁), ilustrando a teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria (Lehninger et al., 1993).	11
2. Representação dos carreadores de elétrons (complexo I, NADH desidrogenase; complexo II, succinato desidrogenase; complexo III, Citocromo <i>bc₁</i> ; complexo IV, citocromo oxidase; AOX - Oxidase alternativa; UQ - Ubiquinona; cit <i>c</i> - Citocromo <i>c</i> ; Ext. - NADH desidrogenase externa; ? - outra NADH desidrogenase, proposta para plantas), dos três sítios de conservação de energia (flechas verticais indicando a liberação de prótons), e do sítio de ação de alguns inibidores na membrana interna das mitocôndrias vegetais (Lima Júnior, 1999; Taiz & Zeiger, 1991; Vanlerberghe & McIntosh, 1997).	16
3. Modelo protonofórico da proteína desacopladora (UCP), que propõe um ciclo fútil de ácidos graxos através da bicamada lipídica, por um mecanismo de “flip-flop” (Skulachev, 1991). Ácidos graxos aniônicos presentes no interior das mitocôndrias particionam-se na membrana mitocondrial, com seus grupamentos hidrofílicos abaixo do nível das outras cabeças lipídicas, difundindo-se lateralmente na membrana e alcançando o sítio de ligação na UCP. A proteína desacopladora catalisa o transporte do ânion, deixando o grupamento hidrofílico exposto no citoplasma. No exterior das mitocôndrias, os ácidos graxos se desligam do sítio de ligação se difundindo lateralmente na membrana, se protonam e, na forma neutra, retornam rapidamente para a matriz mitocondrial por “flip-flop”, resultando no transporte líquido de um H ⁺ para cada ciclo (Garlid et al., 1996; Garlid et al., 1998).	18
4. Representação esquemática do sistema de fluxo contínuo com detecção condutométrica para medidas de evolução de CO ₂ . A bomba peristáltica fornece um fluxo contínuo de água deionizada a 6,8 mL min ⁻¹	22

5. Cella de difusão mostrando o CO_2 permeando a membrana de Teflon®, reagindo com a água destilada e deionizada e produzindo HCO_3^- e H^+ 23
6. Reator (frasco de vidro) hermeticamente fechado onde os frutos são encerrados para avaliação da sua taxa respiratória. Tubos de Teflon® (entrada e saída de gás) são ligados ao sistema em fluxo. 24
7. (A) Flores do tomateiro marcadas na ocasião da antese; e (B) frutos do tomateiro (de idades conhecidas) em crescimento. 25
8. Frutos do tomateiro, de idades conhecidas, em diferentes estádios de maturidade. 25
9. Frutos do tomateiro colhidos em diferentes estádios de maturidade: (i) verde-maduro (fruto totalmente verde, apresentando mudança de cor da região estilar de verde-escura para verde-clara); (ii) vermelho incipiente (início de coloração amarelo-avermelhada na região estilar); (iii) vermelho visível (coloração vermelha bem visível na região estilar, estendendo-se à região lateral dos frutos). 26
10. Reator sendo purgado com ar sintético antes do início da medição de CO_2 produzido pelos tubérculos..... 29
11. Sistema de análise em fluxo para detecção condutométrica do CO_2 . (1) Reservatório de água destilada e deionizada; (2) Reator hermeticamente fechado; (3) Bomba peristáltica; (4) Cella de difusão; (5) Cella de condutividade; (6) Condutivímetro; (7) Registrador. 35
12. Detalhes da cela de difusão: MT) membrana de Teflon®; CA) Corpo em acrílico que sustenta a membrana de Teflon®. Para garantir máxima deionização da água, colunas com resinas de troca catiônica e aniônica (CT) podem ser instaladas no fluxo aquoso do sistema. 36
13. Curva analítica para CO_2 em amostras gasosas. Várias injeções de 1000 μL de CO_2 (indicadas pelas setas) deram origem a uma curva de calibração em forma de escada, composta por degraus de várias alturas (H1 a H5). A linha base foi obtida depois do sistema inteiro ter sido purgado com nitrogênio gasoso..... 38

14. Curva típica de respiração. Respiração de três tomates var. Santa Clara monitorada por cerca de 7 minutos a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. As taxas respiratórias foram obtidas por interpolação das alturas inicial (H_i) e final (H_f) na curva analítica (Figura 13). O intervalo de tempo (T) e a massa dos frutos foram usados para calcular a taxa respiratória expressa em $\text{mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de CO_2 produzido..... 39
15. Taxa respiratória de frutos de tomateiro (cv. Santa Clara) classificados como (A) verde-maduros; (B) coloração vermelha incipiente; e (C) coloração vermelha visível. Cada ponto representa a taxa respiratória média de quatro repetições (três tomates formando cada repetição). Linhas verticais indicam o desvio padrão das medidas. Frutos obtidos no mercado atacadista local (frutos comerciais)..... 40
16. Taxa respiratória de frutos de tomateiro (cv. Santa Clara) classificados como (A) verde-maduros; (B) coloração vermelha incipiente; e (C) coloração vermelha visível. Cada ponto representa a taxa respiratória média de quatro repetições (três tomates formando cada repetição). Linhas verticais indicam o desvio padrão das medidas. Frutos colhidos em uma plantação comercial (frutos colhidos). No experimento C, os frutos não foram avaliados após 4 dias de armazenamento..... 41
17. (A) Taxas respiratórias de tubérculos inteiros de batata (cv. Bintje) armazenados durante 10 dias a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ (■) ou $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (◆). A avaliação das taxas respiratórias foi realizada a 20°C , depois que os tubérculos foram termostatizados. Cada ponto representa a taxa respiratória média de quatro repetições (cada repetição formada por um grupo de quatro tubérculos). O sinal (*) indica diferença estatística ($p<0,05$) entre os tratamentos ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$). (B) Razão entre a evolução de CO_2 em tubérculos de batata armazenados a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ sobre a evolução de CO_2 em tubérculos de batata armazenados a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. As linhas verticais indicam o desvio padrão das medidas. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p<0,01$)...... 43

18. Efeito de 2 mM ATP, 0,1% BSA e 1 mM KCN sobre o potencial elétrico transmembrânico ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de batata cv. Bintje (0,5 mg mL⁻¹). As batatas foram armazenadas por 4 dias a 25±2°C (linha *a*) ou a 5±1°C (linha *b*). Os experimentos foram realizados usando um meio de reação (30°C) contendo 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2, 0,33 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM fosfato inorgânico, 5 mM succinato de potássio, 2 µg oligomicina mL⁻¹ proteína, 7 µM atractilósídeo, 300 µM propranolol, 0,1 mM ATP e 10 µM LA. $\Delta\Psi$ foi estimado em função do decréscimo de fluorescência da safranina O (unidades arbitrárias, aqui representadas por u.a.)..... 45
19. Determinação da respiração sustentada pela PUMP. Mitocôndrias (0,5 mg proteína mL⁻¹) foram incubadas em meio de reação (28°C) descrito no item 3.2.3.3 mais 2 mM BHAM. Adições de 10 µM LA, 0,5% BSA, 5 mM ATP, e 1 µM FCCP foram feitas (onde indicado pelas setas). Os números em parênteses referem-se às taxas de consumo de O₂ (nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína), sendo valores médios de três determinações. A inclinação 2 refere-se à atividade total da PUMP mais vazamento de prótons (respiração depois da adição de LA) e a inclinação 3 refere-se ao vazamento total de prótons (respiração após adição de BSA e ATP). 48
20. Imunodeteção de proteína desacopladora (PUMP) em tubérculos de batata armazenados a 25±2°C ou 5±1°C durante 1 a 10 dias. As proteínas mitocondriais foram submetidas a uma eletroforese, transferidas para uma membrana de nylon e imunodetectadas, usando anticorpo policlonal contra PUMP de batata. Todos os passos da imunodeteção para ambas as temperaturas de armazenamento foram realizados simultaneamente. 49

21. Determinação da capacidade de respiração pela via alternativa (AOX). Mitocôndrias ($0,5 \text{ mg proteína mL}^{-1}$) foram incubadas em meio (28°C) contendo 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2, $0,33 \text{ mM}$ EGTA, 1 mM MgCl_2 , $2,5 \text{ mM}$ fosfato inorgânico, $2,5 \text{ }\mu\text{g}$ oligomicina mg^{-1} proteína, $2 \text{ }\mu\text{M}$ atractilosídeo, $300 \text{ }\mu\text{M}$ propranolol, 5 mM succinato de potássio (mais $5 \text{ }\mu\text{M}$ rotenona), $0,1 \text{ mM}$ ATP, 1 mM DTT, $0,15 \text{ mM}$ piruvato e $0,5\%$ BSA. Adições de 2 mM KCN e 2 mM BHAM foram feitas (onde indicado pelas setas). Inclinação 1 indica a respiração total; inclinação 1 menos inclinação 2 refere-se à respiração sensível a cianeto; e inclinação 2 menos inclinação 3 refere-se à capacidade total da AOX. 51
22. Consumo de O_2 por mitocôndrias de tubérculos de batata armazenados por 1, 2, 3, 4, 7, e 10 dias a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ (■) ou $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ (◆). (A) Respiração total; (B) Capacidade da AOX; (C) Respiração sensível a cianeto. Cada ponto representa a média de consumo de O_2 de pelo menos três experimentos (como o descrito na Figura 21). As linhas verticais indicam o desvio padrão das avaliações. 52
23. Imunodeteção da proteína oxidase alternativa (AOX) em proteína mitocondrial total de tubérculos de batata cv. Bintje armazenados por 4 dias a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ ou $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, usando anticorpos monoclonais contra AOX de *Sauromatum guttatum*. Os números à esquerda (kD) indicam o peso molecular dos marcadores de proteína usados como referência. Mitocôndrias de tomates verdes foram utilizadas como controle positivo. 54

ATIVACÃO DE PROTEÍNA MITOCONDRIAL DESACOPLADORA E OXIDASE ALTERNATIVA EM TUBÉRCULOS DE BATATA ARMAZENADOS SOB REFRIGERAÇÃO

Autora: Fagoni Fayer Calegario

Orientador de Programa: Prof. Durval Dourado Neto

RESUMO

Uma proteína mitocondrial desacopladora de plantas (PUMP), possivelmente envolvida em produção de calor em vegetais, foi isolada, reconstituída em lipossomos e clonada (Vercesi et al., 1995; Maia et al., 1998). Com o objetivo de investigar um possível papel termogênico da PUMP em tecidos intactos, avaliamos a atividade respiratória de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L., cv. Bintje) inteiros armazenados por dez dias a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Essas taxas foram comparadas com a atividade e expressão da PUMP e com a capacidade da proteína oxidase alternativa (AOX) em mitocôndrias isoladas destes tecidos.

Um sistema de análise em fluxo acoplado a um detetor condutométrico de CO_2 foi construído visando medir a taxa respiratória de tubérculos inteiros. O método foi testado utilizando-se frutos do tomateiro e mostrou-se capaz de fornecer resultados precisos, a baixo custo.

A taxa de produção de CO_2 , medida a 20°C , nos tubérculos de batata caiu rapidamente de 13 a $8 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ durante os dois primeiros dias de armazenamento a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e diminuiu lentamente de 8 a $6,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ durante os 7 dias seguintes. Em contraste, a evolução de CO_2 das batatas armazenadas a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ não se alterou significativamente no primeiro dia, subiu para $14,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ durante os 2 dias seguintes e então diminuiu para cerca de $12 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ nos 7 dias seguintes. A atividade respiratória mais alta dos tubérculos intactos armazenados a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ foi associada a um aumento na expressão da PUMP, evidenciado na imunodeteção desta proteína, e a aumentos de 44% na atividade da PUMP e de cerca de dez vezes na capacidade da AOX, estimados pelo consumo de oxigênio mitocondrial. Conclui-se que a refrigeração causou aumento da taxa respiratória em tubérculos inteiros associado a aumentos na atividade e expressão da PUMP e na capacidade da AOX em mitocôndrias isoladas.

ACTIVATION OF UNCOUPLING MITOCHONDRIAL PROTEIN AND ALTERNATIVE OXIDASE IN POTATO TUBERS STORED UNDER REFRIGERATION

Author: Fagoni Fayer Calegario

Program Adviser: Prof. Durval Dourado Neto

SUMMARY

A *plant uncoupling mitochondrial protein* (PUMP), possibly involved in heat generation in plants, was isolated, reconstituted into liposomes, and cloned (Vercesi et al., 1995; Maia et al., 1998). In order to investigate a possible thermogenic role of PUMP in intact tissues, we evaluated the respiratory activity in intact potato (*Solanum tuberosum* L., cv. Bintje) tubers stored for 10 days at $5\pm1^{\circ}\text{C}$ and $25\pm2^{\circ}\text{C}$. These respiration rates were compared with PUMP activity and expression and with the capacity of the alternative oxidase protein (AOX) in mitochondria isolated from these tissues.

A flow analysis system coupled to a conductometric CO_2 detector was built in order to measure the respiration rate of intact potato tubers. The method was tested using tomato fruit and showed to be reliable to supply precise results, at a low cost.

The rate of CO_2 production by potato tubers, measured at 20°C , sharply declined from 13.0 to $8.0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ during the first two days of storage at $25\pm2^{\circ}\text{C}$ and decreased slowly from 8.0 to $6.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ during the following 7 days. In contrast, CO_2 evolution from potatoes stored at $5\pm1^{\circ}\text{C}$ did not significantly change during the first day, increased up to $14.5 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ during the following 2 days and then decreased to about $12.0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the following 7 days. The higher respiratory activity of the intact tubers stored at $5\pm1^{\circ}\text{C}$ was associated with an increased expression of PUMP, shown by the immunodetection of this protein, and with a 44% increase in the activity of PUMP and a 10 times increase in the capacity of the AOX, estimated by O_2 consumption by mitochondria. In conclusion, refrigeration caused an increase of the respiration rate of the intact potatoes associated with increase in PUMP activity and expression, and with increase in the AOX capacity in mitochondria isolated.

1 INTRODUÇÃO

A dissipação de energia em mitocôndrias vegetais pode ser mediada principalmente por dois processos: um sistema de dissipação do potencial redox, a proteína oxidase alternativa (AOX), ramificada a partir da cadeia respiratória principal ao nível da ubiquinona (Vanlerberghe & McIntosh, 1997; Wagner & Moore, 1997); e um sistema de dissipação do potencial eletroquímico de prótons, a proteína mitocondrial desacopladora (PUMP) (Vercesi et al., 1995). Ambos os sistemas levam ao mesmo efeito final: uma diminuição na produção de ATP associada a um aumento na produção de calor. Também foi proposto que essas proteínas poderiam contribuir para diminuir a produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (Purvis, 1997; Popov et al., 1997; Kowaltowski et al., 1998; Braidot et al., 1999; Parsons et al., 1999; Pastore et al., 2000) e estar envolvidas na regulação metabólica (Sluse et al., 1998).

A AOX é codificada por gene(s) nucleares e consiste de uma a três proteínas entre 32 e 39 kD, dependendo da planta ou tecido (McIntosh, 1994). Ela catalisa a oxiredução ao nível da ubiquinona, oxiredução essa não ligada ao bombeamento de prótons para fora da matriz, portanto, o gradiente eletroquímico de prótons não é formado. Essa enzima não é sensível a inibidores da via dos citocromos tais como cianeto, antimicina A ou mixotiazol, mas é inibida por ácidos hidroxâmicos tais como o benzohidroxamato (BHAM), e pode ser estimulada por α -ceto ácidos tais como piruvato (Millar et al., 1993; Day et al., 1994). Além disso, a atividade da AOX pode ser regulada pelo estado de redução da enzima, sendo o dímero oxidado menos ativo do que a forma reduzida (Umbach & Siedow, 1993; Umbach et al., 1994).

A PUMP foi descoberta por Vercesi et al. (1995) em mitocôndrias de tubérculos de batata como uma proteína desacopladora sensível a nucleotídeos de purina e “ativada” por ácidos graxos livres (FFA) (Jezek et al., 1996, 1997) com características

similares à proteína desacopladora do tecido adiposo marrom, UCP1. Garlid et al. (1996) e Skulachev (1991) encontraram evidências indicando que as proteínas desacopladoras funcionam como transportadores de ânions, exportando ácidos graxos livres aniônicos da mitocôndria, que podem subsequenteiramente retornar na forma protonada através da bicamada fosfolipídica da membrana pelo mecanismo “flip-flop” deixando um próton na matriz para cada ciclo de transporte de FFA.

Apesar da habilidade dessas proteínas medirem a geração de calor, seu papel termogênico foi caracterizado apenas em tecidos vegetais especializados. A AOX desempenha importante papel em processos reprodutivos como, por exemplo, em espádices de Araceae (Lidén & Akerlund, 1993) e as UCPs em tecido adiposo marrom de mamíferos recém nascidos, aclimatados ao frio e hibernantes (Nicholls, 1979). Um possível papel fisiológico das proteínas vegetais desacopladoras na geração de calor tem sido evidenciado em experimentos que mostram que a expressão da PUMP, assim como do gene StUcP, que codifica uma proteína desacopladora em raízes e flores da planta da batata (Laloi et al., 1997), e do gene AtPUMP, que codifica a PUMP em *Arabidopsis thaliana* (Maia et al., 1998), são estimulados por baixa temperatura. Além disso, foi observado que durante o amadurecimento de tomate, o desacoplamento mediado pela PUMP aumentou progressivamente provavelmente devido ao aumento nas concentrações de FFA (Costa et al., 1999). É interessante notar que, enquanto o aumento no teor de FFA estimula a atividade da PUMP e, conseqüentemente, a geração de calor, inibe a atividade da AOX, indicando que essas proteínas não apresentam atividades máximas simultaneamente (Sluse et al., 1998).

Em função do desconhecimento do papel fisiológico da PUMP em tecidos intactos, e tendo como hipótese básica de que a respiração do tubérculo inteiro de batata é influenciada pela refrigeração e essa mudança está associada à elevação da respiração mitocondrial e da expressão da PUMP, o presente trabalho teve por objetivos: (i) construir um sistema capaz de fornecer as medidas das taxas respiratórias de frutos ou hortaliças intactos; e (ii) analisar se o armazenamento de tubérculos de batata à baixa temperatura resulta em aumento da expressão e atividade da PUMP e da AOX associado a um acréscimo na taxa respiratória dos tubérculos inteiros.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo em produtos vegetais colhidos

Os produtos vegetais colhidos estão vivos e, portanto, continuam a funcionar metabolicamente mesmo depois de separados da planta-mãe. Uma característica fundamental dos seres vivos é que eles respondem de várias formas aos estresses a que estão expostos, visando manter o mais próximo possível uma condição homeostática dentro de seu organismo (Kays, 1991).

Entende-se por metabolismo o conjunto das várias atividades bioquímicas que ocorrem dentro das células. A aquisição (e armazenamento) de energia e a utilização desta energia armazenada são dois dos processos centrais do controle do metabolismo em plantas. A aquisição de energia nas plantas ocorre via fotossíntese e sua reciclagem via rotas respiratórias. Fotossíntese e respiração podem ser vistas, de modo geral, como forças opostas. A fotossíntese não ocorre em todos os produtos colhidos nem tampouco em produtos desprovidos de clorofila. Já a respiração ocorre em todas as células vivas e é essencial para a manutenção da vida dos produtos depois da colheita.

O tema central dos estudos em Bioenergética é a tentativa de se entender os mecanismos pelos quais a energia disponibilizada através da oxidação de substratos ou pela absorção de luz pode ser utilizada para sustentar reações que requerem energia (Nicholls & Ferguson, 1982).

Respiração é o termo usado para representar uma série de reações de oxirredução, onde uma variedade de substratos encontrados dentro das células são oxidados a dióxido de carbono. Ao mesmo tempo, oxigênio absorvido da atmosfera é reduzido para formar água. Na sua forma mais simples, a oxidação completa da glicose pode ser assim escrita:

Os produtos desta reação são gás carbônico, água, e mais importante, energia, que é requerida nos processos essenciais dentro das células. Muita da energia gerada na respiração de produtos colhidos é perdida na forma de calor. No entanto, quantidades significativas são retidas pelas células em formas químicas que podem ser utilizadas para esses processos essenciais.

A rigor, a respiração é muito mais complexa que esta reação generalizada apresentada acima. As rotas glicolítica, dos ácidos tricarboxílicos, da pentose fosfato, e do sistema de citocromos estão envolvidas na quebra de muitos dos substratos comuns utilizados pela célula. Frequentemente, durante a oxidação de um substrato, a conversão a CO_2 não é completa e os intermediários formados são utilizados pelas células para reações de síntese tais como a formação de aminoácidos, nucleotídeos, pigmentos, lipídeos e componentes do flavor (sabor e aroma). Portanto, as rotas respiratórias fornecem precursores chamados de esqueletos carbônicos, que são necessários para a síntese de um grande número de produtos vegetais.

As séries de passos na oxidação respiratória de açúcar ou amido envolvem três principais rotas que interagem. A rota inicial é a da glicólise, onde açúcar é quebrado em ácido pirúvico (composto de três carbonos). Esse processo é realizado por um grupo de enzimas solúveis localizadas no citossol. A segunda rota é o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou ciclo de Krebs. Nele, ácido pirúvico é oxidado nas mitocôndrias. Oxigênio, embora não reagindo diretamente nesses passos, é necessário para que a rota aconteça, assim como são necessários vários ácidos orgânicos. A terceira rota, a cadeia de transporte de elétrons, transfere elétrons para o oxigênio molecular, sendo essa transferência acoplada à fosforilação oxidativa. Energia é armazenada quimicamente na forma de ATP^1 . Uma quarta rota respiratória, a rota das pentoses fosfato, que não é essencial para a completa oxidação dos açúcares, funciona fornecendo

¹ Outros nucleotídeos fosforilados, tais como uridina trifosfato (UTP), guanosina trifosfato (GTP) e citidina trifosfato (CTP) também podem desempenhar um importante papel na transferência de energia celular.

esqueletos carbônicos, NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase) reduzido, necessário em certas reações sintéticas, e ribose-5-fosfato para a síntese de ácidos nucléicos. Esta rota parece ser operante, em graus variáveis, em todas as células que respiram.

Enquanto o oxigênio não é necessário para a operação da rota glicolítica, ele é essencial para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, para a rota das pentoses fosfato, e para a cadeia de transporte de elétrons. Durante o manuseio pós-colheita de produtos vegetais, a ocorrência de anaerobiose pode gerar uma série de problemas. Quando a concentração de oxigênio dentro dos tecidos cai abaixo de um limiar, ácido pirúvico não pode mais prosseguir através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e, ao invés disso, forma etanol, que pode ser acumulado em níveis tóxicos. Exposições prolongadas a condições de anaerobiose, portanto, resultam na morte das células e perda do produto colhido. Exposições por períodos curtos freqüentemente resultam na formação de odores estranhos em produtos comestíveis, que podem ou não, dependendo do tecido e tempo de exposição, ser eliminados após retorno a condições aeróbicas.

2.2 Glicólise

A rota glicolítica quebra glicose do amido ou da sacarose em uma seqüência de passos para formar o ácido pirúvico. Inicialmente, a glicose precisa ser fosfatada. Se o composto inicial é glicose livre, a reação é catalisada pela enzima hexoquinase e forma glicose-6-fosfato. Se a glicose é encontrada fazendo parte de uma molécula de amido, como ocorre em muitos produtos colhidos, fósforo é adicionado pela enzima amido fosforilase, formando glicose-1-fosfato, que é subsequenteemente convertida a glicose-6-fosfato. A fosforilação de glicoses livres requer energia, na forma de molécula de ATP, enquanto a fosforilação da glicose quando ela faz parte de uma molécula de amido não requer energia.

A molécula de glicose (6 carbonos) progride de frutose-1-fosfato para frutose-1,6-bisfosfato antes de ser separada pela enzima aldolase em dois compostos de 3 carbonos: dihidroxiacetona fosfato e 3-fosfogliceraldeído. A molécula de 3-fosfogliceraldeído é o primeiro composto a perder elétrons na rota respiratória,

formando ácido 1,3-difosfoglicérico, quando dois átomos de hidrogênio são removidos e aceptados tanto por NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou NADP. O ácido 1,3-difosfoglicérico então progride através de três passos enzimáticos adicionais, resultando na formação de ácido pirúvico².

Se condições anaeróbicas ocorrerem no tecido colhido devido à restrição à entrada de oxigênio ou a um suprimento ineficiente da atmosfera ao redor do fruto ou hortaliça, o ácido pirúvico se acumula e é usualmente descarboxilado para formar dióxido de carbono e acetaldeído, que é subsequentelemente reduzido a etanol. A reação requer energia, que é provida por NAD reduzido ou NADP reduzido formados durante a oxidação prévia do 3-fosfogliceraldeído na rota. A reação completa simplificada é a seguinte:

Quando etanol é produzido, duas moléculas de ATP são necessárias, mas quatro são formadas para cada molécula livre de glicose, gerando uma produção líquida de dois ATPs. Essa quantidade representa somente um terço da produção de energia que seria gerada a partir da rota glicolítica quando oxigênio suficiente está presente, e é apenas 1/18 que deriva quando a glicose é completamente oxidada (glicólise e ciclo dos ácidos tricarboxílicos). Além disso, álcool se acumula dentro do tecido. Como as células trocam o seu fluxo de carbono em direção ao álcool, a produção de dióxido de carbono aumenta. Este aumento é devido à diminuição da produção de energia sob condições anaeróbicas; portanto, muito mais glicose precisa ser oxidada para satisfazer os requerimentos de energia da célula.

² A rota glicolítica pode prosseguir em ambas as direções, ou seja, em direção à formação de ácido pirúvico (direção glicolítica) ou em direção oposta (gliconeogênese) com a formação de açúcares. O carbono freqüentemente flui em ambas as direções dentro de um produto. Quando uma banana amadurece, por exemplo, o amido localizado nos plastídeos é quebrado em compostos de três carbonos (triose fosfatos) que entram no meio da rota glicolítica. Alguns desses carbonos são usados para a formação de energia (direção glicolítica), mas a maioria é convertida em açúcares, dando à banana sua doçura característica quando madura.

2.3 Mitocôndrias

Mitocôndrias são organelas celulares responsáveis pela transferência de energia da oxidação de substratos para produção de compostos fosfatados de alta energia. Dentro delas ocorrem os processos de conversão de energia do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o sistema de transporte de elétrons. Como consequência, as mitocôndrias são de crítica importância na reciclagem de energia armazenada depois da colheita.

A transdução de energia está associada a complexos enzimáticos ligados a um tipo especial de membranas que ocorre na membrana plasmática de células procarióticas, na membrana interna da mitocôndria ou na membrana tilacóide dos cloroplastos (Nicholls & Ferguson, 1982).

As mitocôndrias estão encerradas dentro de uma membrana dupla. A membrana externa possui proteínas que agem como poros não específicos para solutos de menos de 10 kD; a membrana interna, onde ocorre a transdução de energia, contém numerosas dobras tubulares ou extensões chamadas cristas. Quanto maior for a atividade respiratória do tecido do qual as mitocôndrias estão sendo isoladas, maior será o número de cristas na membrana interna. A membrana interna contém os carreadores de íons responsáveis pelo transporte de substratos metabólicos entre a matriz e o citossol. Livres dentro da matriz mitocondrial estão as enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, com exceção da succinato desidrogenase, que está ligada à face da membrana interna voltada para a matriz. Também localizados nesta porção aquosa da mitocôndria estão o RNA e DNA, que controlam a síntese de certas enzimas mitocondriais. A presença de informação genética leva alguns cientistas a acreditarem que as mitocôndrias originalmente foram organismos autônomos que se tornaram associados a células eucarióticas no início da evolução da vida.

As suspensões de mitocôndrias isoladas são geralmente preparadas por uma cuidadosa homogeneização do tecido em meio isotônico de sacarose, seguida por centrifugação diferencial para separar as mitocôndrias dos núcleos, partículas celulares e microssomos (fragmentos do retículo endoplasmático).

2.4 Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

O ácido pirúvico produzido pela rota glicolítica é quebrado no ciclo do ácido tricarboxílicos (TCA), também chamado ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Ácidos tricarboxílicos se referem aos três grupos carboxil que estão presentes em alguns dos ácidos no ciclo e ácido cítrico é um importante intermediário inicial na seqüência de reações.

As reações do ciclo de Krebs ocorrem provavelmente na superfície das membranas internas das mitocôndrias. Ácido pirúvico, portanto, precisa se mover do citoplasma, onde ocorre a glicólise, para dentro das mitocôndrias para que prossigam as oxidações.

No início, ácido pirúvico perde CO_2 e se combina com a coenzima A, formando o composto de dois carbonos acetil CoA. Acetil CoA então se combina com a molécula de quatro carbonos do ácido oxaloacético, produzindo ácido cítrico que se move através de uma série de reações terminando com a formação de ácido oxaloacético, permitindo que o ciclo se reinicie. Energia é produzida na forma de NAD reduzido ($\text{NADH} + \text{H}^+$) na conversão de ácido isocítrico a ácido α -cetoglutárico, ácido α -cetoglutárico a succinil CoA, e ácido málico a ácido oxaloacético. Um único ATP é produzido na transferência de succinil CoA a ácido succínico e uma molécula de FADH_2 é produzida na conversão do ácido succínico a ácido fumárico. CO_2 é liberado na remoção dos ácidos pirúvico, isocítrico e α -cetoglutárico.

Cada ciclo de uma molécula de piruvato através do ciclo do ácido tricarboxílico libera três moléculas de CO_2 e produz 4 pares de elétrons na forma de 4 moléculas de $\text{NADH} + \text{H}$ e um par de elétrons na forma de uma molécula de FADH_2 . Combinando essa liberação com os dois pares de elétrons ($2\text{NADH} + \text{H}$) a partir da rota glicolítica, resulta num total de 12 pares de elétrons formados com a completa oxidação de uma única molécula de glicose. Somente 12 desses elétrons (H) são provenientes da glicose; os 12 remanescentes são da água que é adicionada em vários passos no ciclo.

2.5 Cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa

O NAD que foi reduzido a NADH no ciclo de Krebs, durante a glicólise e por outras reações, precisa ser reciclado, uma vez que sua quantidade é finita na célula, mas sua presença essencial para o processo respiratório. Sob condições aeróbicas, a reoxidação do NADH é realizada por uma série complexa de reações que ocorrem na membrana interna mitocondrial, conhecidas como cadeia de transporte de elétrons. O efeito final desse processo é a transferência de elétrons do NADH para o oxigênio, que é reduzido a água. A transferência de elétrons para o oxigênio não é direta, mas ocorre em uma sequência ordenada de passos durante os quais ocorre a liberação de energia livre. Esta energia não é desperdiçada, mas usada pelas mitocôndrias para realizar a fosforilação do ADP a ATP. Esse processo de síntese de ATP é chamado de oxidação fosforilativa. Assim sendo, o papel da cadeia de transporte de elétrons é oxidar NADH (e FADH_2) e, no processo, utilizar alguma da energia livre para dirigir a síntese de ATP (Chesworth et al., 1998).

A cadeia de transporte de elétrons dos vegetais contém carreadores organizados em uma série de quatro complexos multiprotéicos (complexo I a IV), localizados na membrana interna mitocondrial (Figura 1). Existem milhares de sistemas de transporte de elétrons em cada mitocôndria (Salisbury & Ross, 1992). Elétrons do NADH gerados na matriz mitocondrial durante o ciclo de Krebs são oxidados pelo complexo I (NADH desidrogenase), que, por sua vez, transfere esses elétrons para a ubiquinona, uma espécie de benzoquinona que existe em forma de “pool” dentro da membrana interna mitocondrial. Enquanto os elétrons são transferidos para a o “pool” de ubiquinona, o complexo I libera os prótons para o espaço intermembranar. A succinato desidrogenase, enzima do ciclo de Krebs, também faz parte do complexo II, para que os elétrons derivados da oxidação do succinato sejam transferidos para o “pool” de ubiquinona. O complexo III oxida ubiquinona reduzida, transfere os elétrons para o citocromo c e também libera prótons no espaço intermembranar. O citocromo c é a única proteína da cadeia de transporte de elétrons que não é proteína integral de membrana. Funciona como um carreador móvel que transfere elétrons entre os complexos III e IV (citocromo

oxidase). Na citocromo oxidase ocorre a redução do O_2 a H_2O e a transferência de prótons para o espaço intermembranar (Figura 1) (Taiz & Zeiger, 1991).

A ATP sintetase, complexo enzimático da membrana mitocondrial interna que sintetiza ATP, possui dois componentes principais, as unidades F_o e F_1 . A letra “o” denota a porção da ATP sintetase que confere sensibilidade à oligomicina, um potente inibidor deste complexo enzimático e, consequentemente, da fosforilação oxidativa.

A natureza da ligação entre o transporte de elétrons e a síntese de ATP confundiu os bioquímicos por muitos anos. Durante muito tempo procurou-se por um intermediário químico que acoplasse a fosforilação oxidativa à síntese de ATP, até que, em 1961, Peter Mitchell elaborou a hipótese quimiosmótica. Ele sugeriu que o único “intermediário” seria um gradiente eletroquímico de prótons formado através da membrana. Como mostra a Figura 1, elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através da cadeia de carreadores arranjados assimetricamente na membrana (I a IV). O fluxo de elétrons é acompanhado pela transferência de prótons através da membrana mitocondrial, produzindo tanto gradiente elétrico ($\Delta\psi$) como gradiente químico (ΔpH). A membrana mitocondrial interna é impermeável a prótons; prótons podem entrar novamente na matriz somente através de canais específicos (F_o). A força próton motora que dirige os prótons de volta para a matriz fornece energia para a síntese de ATP, catalisada pelo complexo F_1 associado com F_o (Lehninger et al., 1993).

A hipótese de Mitchell foi experimentalmente comprovada e reconhecida no meio científico. Em 1978, esse pesquisador recebeu o Prêmio Nobel de Química, por descobrir o mecanismo chamado modelo quimiosmótico de síntese de ATP. Na verdade, agora se sabe que os mecanismos quimiosmóticos não estão envolvidos somente na síntese de ATP, mas também em vários processos dependentes de energia, tal como o transporte ativo através das membranas.

Figura 1. Representação dos carreadores de elétrons (I a IV) e ATP sintetase (componentes FoF₁), ilustrando a teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria (Lehninger et al., 1993).

2.6 Avaliações da taxa respiratória de produtos colhidos

Sob o ponto de vista da pós-colheita, a respiração dos vegetais é importante em virtude de seus principais efeitos. Além disso, a taxa respiratória também fornece uma indicação da taxa metabólica geral da planta ou de parte dela.

Todas as mudanças metabólicas que ocorrem depois da colheita são importantes, especialmente aquelas que exercem um efeito direto sobre a qualidade do produto. Entretanto, a posição central da respiração no metabolismo geral do vegetal e sua medida relativamente fácil permitem que ela seja usada como medida geral da taxa metabólica.

As células vivas de produtos vegetais colhidos respiram continuamente, utilizando reservas armazenadas e oxigênio (O₂) do ambiente e liberando dióxido de

carbono (CO_2) para o meio. Esta habilidade de respirar é um componente essencial dos processos metabólicos que ocorrem em produtos colhidos vivos. A ausência de respiração é, portanto, a maior diferença entre produtos vegetais processados e produtos vegetais vivos.

A taxa respiratória é um dos indicadores mais importantes da senescência de frutos e hortaliças, assim como a perda de massa, teor de pigmentos, firmeza da polpa ou produção de etileno (Meir et al., 1992; Maharaj et al., 1999). Uma vez que um decréscimo na respiração durante o armazenamento é benéfico à manutenção da qualidade, uma determinação precisa da taxa respiratória se tornou um importante fator na pesquisa de alimentos (Wareham & Persaud, 1999).

As taxas respiratórias em vegetais colhidos são geralmente quantificadas através da análise da produção de CO_2 ou do consumo de O_2 por quilograma de massa de matéria fresca por hora. Várias técnicas podem ser usadas para se coletar uma amostra gasosa de um fruto no qual deseja-se monitorar a taxa respiratória (Kays, 1991). O fruto ou hortaliça pode ser encerrado por um certo período de tempo dentro de um reator (frasco fechado) e a diferença entre CO_2 ou O_2 da respiração pode ser medida. Deve-se tomar cuidado para não manter o produto fechado no frasco por muito tempo, uma vez que a diminuição na concentração de oxigênio ou o aumento na concentração de dióxido de carbono podem, subseqüentemente, afetar a taxa respiratória que está sendo avaliada.

Como as mudanças nas concentrações de O_2 que ocorrem com a respiração são muito pequenas em relação à alta concentração de O_2 no ar, é geralmente mais fácil medir a produção de CO_2 do que o consumo de O_2 (Bower et al., 1998).

Cromatografia gasosa (GC), análise de gás por infravermelho (IRGA) (Dilley & Dewey, 1969), titulação colorimétrica, detetores Kitagawa ou mudanças na pressão/volume (Forcier et al., 1987) podem ser usados para medir o dióxido de carbono liberado na respiração. Métodos físicos para análise de amostras gasosas são preferidos devido sua velocidade, precisão e sensibilidade (Wills et al., 1998). Dentre esses métodos, CG e IRGA são os mais freqüentemente usados. Apesar de serem métodos muito precisos, mesmo a concentrações muito baixas de dióxido de carbono, o preço dos equipamentos utilizados nesses métodos é bem elevado. Detetores Kitagawa requerem

que volumes gasosos relativamente grandes (100 mL) sejam amostrados. O método de titulação colorimétrica em fluxo contínuo de CO_2 aquoso é relativamente barato, no entanto demanda um sistema de bombeamento de ar muito preciso. Wareham & Persaud (1999) utilizaram o método de espectrometria de massa para monitorar a respiração de vegetais minimamente processados. Esse procedimento permite a avaliação simultânea tanto de CO_2 produzido quanto de O_2 consumido. Herman et al. (1999) propuseram uma nova metodologia para a detecção de CO_2 baseada em fluoróforos que contêm grupamentos amino, eliminados por um mecanismo de transferência de elétrons fotoinduzido. Esses autores sugerem que esta metodologia pode dar origem a vários sensores para matrizes gasosas e aquosas. Piergiovanni et al. (1999) desenvolveram um procedimento computadorizado rápido e simples para estimar taxas respiratórias. Tal procedimento é aplicado não somente em laboratórios de pesquisa, mas também na indústria. Bower et al. (1998) descreveram um interessante respirômetro, equipado com um termômetro e sensores de O_2 e CO_2 , destinado a medir as alterações respiratórias em tecidos vegetais destacados da planta. A atmosfera no interior do dispositivo pode ser renovada com ar ou com uma mistura especial de gases depois do tecido vegetal ter consumido uma certa quantidade de O_2 .

No presente trabalho, um sistema fechado de análise em fluxo acoplado a um detetor condutométrico de CO_2 é proposto para medir diretamente o CO_2 gasoso eliminado na respiração de frutas ou hortaliças. O método proposto apresenta precisão similar a GC ou IRGA, com a vantagem de usar um aparato barato, com baixo custo de manutenção e análise. Como exemplo de utilização, o sistema de fluxo foi utilizado para avaliar a taxa respiratória pós-colheita de tomates var. Santa Clara em diferentes estádios de maturidade. As medidas começaram a ser feitas logo após a colheita e continuaram ao longo do armazenamento dos frutos. Este procedimento foi baseado no trabalho de Jardim et al. (1990), que monitoraram CO_2 aquoso eliminado na respiração de bactérias, e no trabalho de Almeida et al. (1999b), que monitoraram as concentrações de CO_2 gasoso, visando avaliar a qualidade do ar no interior de um Centro Cirúrgico. O sistema proposto no presente trabalho pode ser adaptado para diferentes objetivos, assim como

para a avaliação de outros frutos ou hortaliças, fornecendo uma determinação da taxa respiratória em menos de 10 minutos.

2.7 Respiração resistente a cianeto ou respiração sustentada pela AOX

Além dos carreadores de elétrons descritos anteriormente, as mitocôndrias de plantas contêm alguns componentes não encontrados comumente em outras mitocôndrias. Estes carreadores incluem um complexo de NADH desidrogenase, localizado na membrana interna mitocondrial, voltado para o espaço intermembranar, que facilita a oxidação de NADH citoplasmático e, possivelmente, NAD(P)H. Os elétrons dessa NADH desidrogenase externa entram na cadeia de transporte de elétrons ao nível do “pool” de ubiquinona (Figura 2). Uma segunda característica peculiar de mitocôndrias vegetais é a presença de duas rotas de oxidação de NADH da matriz. O fluxo de elétrons pelo complexo I, descrito anteriormente, é sensível à inibição por rotenona. No entanto, mitocôndrias isoladas de plantas mostram a presença de uma rota de oxidação do NADH derivado do ciclo de Krebs resistente à rotenona (Figura 2).

Tanto monóxido de carbono (CO) quanto ácido cianídrico (HCN) são potentes inibidores do transporte de elétrons, uma vez que se combinam com o átomo de ferro da citocromo oxidase, a enzima final da cadeia de transporte de elétrons. Nos tecidos vegetais existe uma segunda rota chamada de alternativa ou sistema de transporte de elétrons resistente a cianeto. Ela segue a rota eletrônica normal até atingir um ponto de ramificação na ubiquinona. Nesse ponto, os elétrons são transferidos para uma flavoproteína de potencial intermediário, e daí para uma oxidase alternativa, e subsequente para oxigênio, formando água (Figura 2). É importante notar que somente um (ou nenhum) ATP é gerado ao invés de três ATPs na rota normal; o restante de energia é perdido na forma de calor. Portanto, a rota alternativa representa um sistema ineficiente de conservação de energia, que se desvia da rota normal, aumentando substancialmente a carga de calor respiratório do produto.

A rota alternativa de transporte de elétrons é encontrada em várias plantas e partes de plantas que são colhidas e armazenadas como, por exemplo, tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L.), raízes de cenoura (*Daucus carota* L.) e frutos de abacate

(*Persea americana* Mill.) e banana (*Musa* spp.) (Kays, 1991). Em algumas flores ou inflorescências de algumas espécies pertencentes às famílias Annonaceae, Araceae, Aristochiaceae, Cyclanthaceae e Nymphaeaceae, a temperatura elevada causada pela rota alternativa na flor resulta na volatilização de uma variedade de compostos atrativos de insetos que facilitam a polinização. Nessas flores termogênicas, a rota alternativa é ativada no dia do florescimento e permanece ativa por apenas algumas horas. Apesar da existência da rota alternativa ser conhecida por mais de 70 anos, o seu significado fisiológico na maioria das situações (ex: nos tecidos de reserva) não foi ainda verificado. É possível que essa rota funcione sob certas condições quando altos níveis de intermediários são requeridos para reações de síntese dentro das células. Se a taxa de produção desses intermediários é limitada pela taxa em que o sistema normal de transporte de elétrons ocorre, o sistema resistente a cianeto pode prover uma alternativa irrestrita que permita respiração acelerada e produção desses intermediários.

O fluxo de elétrons através da AOX pode ser inibido especificamente por vários compostos como ácidos hidroxâmicos, como o ácido salicilhidroxâmico (SHAM) e o ácido benzohidroxâmico (BHAM) (Schonbaum et al., 1971), n-propil galato (Parrish & Leopold, 1978; Siedow & Grivin, 1980) e dissulfiram (Grover & Laties, 1978). Portanto, a diagnose da atividade da AOX é dada pelo nível de consumo de oxigênio resistente a cianeto e sensível a um desses inibidores (Sluse & Jarmuszkiewicz, 1998).

Figura 2. Representação dos carreadores de elétrons (complexo I, NADH desidrogenase; complexo II, succinato desidrogenase; complexo III, Citocromo *bc_L*; complexo IV, citocromo oxidase; AOX - Oxidase alternativa; UQ - Ubiquinona; cit c - Citocromo *c*; Ext. - NADH desidrogenase externa; ? - outra NADH desidrogenase, proposta para plantas), dos três sítios de conservação de energia (flechas verticais indicando a liberação de prótons), e do sítio de ação de alguns inibidores na membrana interna das mitocôndrias vegetais (Lima Júnior, 1999; Taiz & Zeiger, 1991; Vanlerberghe & McIntosh, 1997).

2.8 Proteína desacopladora

O armazenamento de energia na mitocôndrias só é possível devido ao acoplamento entre a cadeia respiratória e o complexo enzimático F_0F_1 ATP sintetase, responsável pela fosforilação do ADP (Nicholls & Ferguson, 1982). No entanto, as

mitocôndrias do tecido adiposo marrom (BATM) de recém-nascidos, hibernantes ou mamíferos adaptados ao frio possuem uma proteína de 32 kD (UCP1), que desacopla a cadeia respiratória da fosforilação oxidativa (Nicholls, 1979). Na presença de ácidos graxos, a UCP1 permite que os prótons liberados na cadeia respiratória entrem novamente na matriz mitocondrial, desviando-se da ATP sintetase, promovendo, assim, a dissipação do gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\mu H^+$) como calor, em um processo chamado termogênese. O conteúdo de UCP1 de BATM aumenta durante o estresse por baixa temperatura (Nicholls & Locke, 1984). O desacoplamento pode ser mediado pela UCP1 por um mecanismo cíclico de ácidos graxos (Skulachev, 1991; Garlid et al., 1996), no qual a UCP1 transloca ânions de ácidos graxos para fora da matriz mitocondrial. Subseqüentemente, esses ânions de ácidos graxos tornam-se protonados e entram na matriz nesta forma, lá liberando o próton (Figura 3).

Uma série de eventos fisiológicos no reino vegetal tais como amadurecimento e senescência de frutos, exalação de perfume pelas flores e germinação de sementes têm seu início associado a um grande estímulo respiratório e à produção de calor (Day & Wiskich, 1995; Krab, 1995). A termogênese em plantas é, em geral, atribuída a um aumento do fluxo metabólico associado à via mitocondrial alternativa de transporte de elétrons, desacoplada da fosforilação oxidativa e insensível a cianeto (Day & Wiskich, 1995; Krab, 1995; Moore et al., 1995; Whelan, 1996). A associação termogênese via alternativa, contudo, é refutada por outros dados que indicam uma dissociação entre os eventos fisiológicos que parecem requerer termogênese e a respiração insensível a cianeto (Heaton et al., 1978). Alguns autores têm sugerido que esta via alternativa possa estar envolvida na regulação da concentração intracelular tanto de substratos respiratórios reduzidos como de compostos fosfatados de alta energia (Bahr & Bonner, 1973a,b; Lambers, 1980). Vários relatos da literatura mostraram que diversos compostos influenciam significativamente esta via alternativa, tanto de modo estimulador quanto inibidor, como por exemplo, BSA (albumina de soro bovino) e ADP (Bahr & Bonner, 1973a,b), ácidos graxos livres (Decker & Tanner, 1975).

Figura 3. Modelo protonoforético da proteína desacopladora (UCP), que propõe um ciclo fútil de ácidos graxos através da bicamada lipídica, por um mecanismo de “flip-flop” (Skulachev, 1991). Ácidos graxos aniônicos presentes no interior das mitocôndrias particionam-se na membrana mitocondrial, com seus grupamentos hidrofílicos abaixo do nível das outras cabeças lipídicas, difundindo-se lateralmente na membrana e alcançando o sítio de ligação na UCP. A proteína desacopladora catalisa o transporte do ânion, deixando o grupamento hidrofílico exposto no citoplasma. No exterior das mitocôndrias, os ácidos graxos se desligam do sítio de ligação se difundindo lateralmente na membrana, se protonam e, na forma neutra, retornam rapidamente para a matriz mitocondrial por “flip-flop”, resultando no transporte líquido de um H^+ para cada ciclo (Garlid et al., 1996; Garlid et al., 1998).

O amadurecimento e a senescência de frutos climatéricos também têm sido relacionados com a respiração resistente a cianeto (Solomos & Laties, 1976; Day et al., 1980; Day & Wiskich, 1995). Estes autores demonstraram que o gás etileno está envolvido nestes eventos, constatando, porém, este envolvimento somente na presença da via alternativa. Outros autores demonstraram a dependência da produção do gás etileno para o amadurecimento e a senescência de frutos climatéricos utilizando tomates geneticamente deficientes em uma enzima chave na via biossintética do gás etileno (Oeller et al., 1991).

É geralmente aceito que a alta permeabilidade a H^+ e ânions em mitocôndrias de plantas é consequência de vazamento através de uma membrana alterada pelos

procedimentos de isolamento. Entretanto, o desacoplamento de mitocôndrias vegetais não pode ser atribuído, exclusivamente, a artefatos de preparação. As plantas contêm altas concentrações de lipases, que liberadas ao meio após a ruptura celular, produzem quantidades significativas de ácidos graxos livres (Galliard, 1980). Ao mesmo tempo sabe-se que a adição de BSA aumenta o grau de acoplamento dessas mitocôndrias (Day et al., 1980). O efeito de BSA, uma proteína solúvel, não pode ser atribuído ao reparo de danos na membrana mitocondrial causados pela preparação. BSA complexa eficientemente ácidos graxos livres e, assim, o efeito reacoplador pode estar associado à diminuição da concentração destes no meio de ensaio mitocondrial.

Uma análise detalhada do controle respiratório de mitocôndrias de plantas, bem como o efeito acoplador de BSA mais ATP levaram Beavis & Vercesi (1992) a proporem a existência de um fator semelhante à UCP em plantas até que, recentemente, uma proteína semelhante à UCP1 foi descoberta em tubérculos de batata, recebendo o nome de PUMP (*plant uncoupling mitochondrial protein* ou proteína mitocondrial desacopladora de plantas) (Vercesi et al., 1995). Da mesma forma que a UCP1, a PUMP é fracamente inibida por nucleotídeos de purina e transloca ânions de ácidos graxos (Jezek et al., 1996; Jezek et al., 1997; Sluse et al., 1998). Jezek et al. (1998), usando anticorpos construídos contra a PUMP de batata, encontraram esta proteína em várias frutas, e evidências para seu possível papel na dissipação da energia respiratória durante o amadurecimento de tomate foram encontradas por Almeida et al. (1999a).

A expressão do gene da *St*UCP, que codifica uma proteína desacopladora em batata (Laloi et al., 1997), e o gene *At*PUMP, que codifica a PUMP em *Arabidopsis thaliana* (Maia et al., 1998), são estimulados por baixa temperatura, como também foi verificado por Nicholls & Locke (1984), estudando a UCP1.

Os estudos realizados até o momento indicam fortemente que a proteína desacopladora exerce importante papel fisiológico em mitocôndrias isoladas. No entanto, não existem trabalhos relacionando-se esse papel com a taxa respiratória de tubérculos quando seus tecidos permanecem intactos.

Com o objetivo de investigar um possível papel termogênico da proteína desacopladora de vegetais em tecidos intactos, comparamos a taxa respiratória de

tubérculos de batata armazenados à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e sob refrigeração ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) com a atividade da PUMP e sua expressão em mitocôndrias isoladas destes tecidos. Para tanto, foi construído um sistema para a determinação da taxa respiratória de frutas ou hortaliças intactas. Tomates colhidos em diferentes estádios de maturação foram utilizados para se testar a confiabilidade do sistema de determinação da taxa respiratória. Um possível contribuição da AOX neste processo também foi investigada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo

3.1.1 Construção do equipamento (aparato)

O sistema de análise em fluxo é composto por um fluxo gasoso (doador de CO₂) e um fluxo de água deionizada fresca (receptor de CO₂). Esses dois fluxos correm em direção a lados opostos de uma membrana de teflon® permeável a gás, mas impermeável a água, sustentada por uma célula acrílica (célula de difusão). Uma bomba peristáltica de quatro canais (Ismatec) é usada para circular os fluxos gasoso e aquoso. O fluxo receptor flui para dentro de uma micro célula de condutividade (com volume de 40 µL), conectada em um condutivímetro (Analyser 600), cuja saída liga-se a um registrador potenciométrico (Kipp&Zonen). A Figura 4 mostra uma ilustração esquemática do sistema.

Figura 4. Representação esquemática do sistema de fluxo contínuo com detecção condutométrica para medidas de evolução de CO_2 . A bomba peristáltica fornece um fluxo contínuo de água deionizada a $6,8 \text{ mL min}^{-1}$.

O método é baseado na difusão de CO_2 gasoso através da membrana de Teflon® da amostra para o fluxo de água deionizada. O CO_2 , ao entrar em contato com a água deionizada, dissocia-se produzindo íons, como mostra a Figura 5. Os íons gerados, ao atravessarem a cela de condutividade, geram um gradiente de condutividade registrado na forma de picos (para sistemas com injeção da amostra, não utilizados no presente trabalho) ou curvas (para sistemas com passagem contínua da amostra). O incremento na condutividade é proporcional à concentração de CO_2 contido nas amostras. Os sinais obtidos no condutivímetro são enviados para o registrador.

Figura 5. Cella de difusão mostrando o CO_2 permeando a membrana de Teflon®, reagindo com a água destilada e deionizada e produzindo HCO_3^- e H^+ .

Uma vez que é possível ocorrer fotossíntese em frutos verdes de tomate (Piechulla et al., 1987; Knee, 1995) o frasco deve ser completamente coberto com uma folha de alumínio para proteger os frutos da incidência de luz. Assim é possível prevenir que as taxas respiratórias sejam subestimadas devido ao consumo fotossintético de CO_2 .

O reator de 3,4 L é composto por duas partes (Figura 6). A parte inferior é usada para acomodar os frutos e a parte superior, usada para fechar hermeticamente o frasco, com ajuda de uma fina camada de silicone. Além dos frutos, um pequeno ventilador elétrico (ventoinha de computador) é colocado dentro do frasco para manter homogênea a atmosfera interna. Uma pequena abertura na parte superior do frasco é coberta por um septo de borracha. Dois furos nesse septo permitem a inserção de dois tubos de teflon® (diâmetro interno de 0,8 mm), sendo uma entrada e uma saída de gás. O fio elétrico do ventilador é inserido através de um terceiro furo no septo de borracha. Um frasco de cal sodada é conectado ao sistema de detecção de CO_2 e é usado somente antes do início das medições da taxa respiratória. Por aproximadamente 1 minuto, o ar que será confinado no sistema é bombeado a partir da atmosfera através do frasco de cal sodada com o objetivo de se gerar uma linha base, indicativa de ausência de CO_2 no fluxo gasoso. Depois que essa condição é atingida, a válvula de três canais, que fica inserida no frasco de cal sodada, é fechada, e o sistema agora é forçado a trabalhar sob condições fechadas durante todo o tempo quando o CO_2 está sendo medido.

Figura 6. Reator (frasco de vidro) hermeticamente fechado onde os frutos são encerrados para avaliação da sua taxa respiratória. Tubos de Teflon® (entrada e saída de gás) são ligados ao sistema em fluxo.

3.1.2 Material vegetal

Flores de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*, cv. Santa Clara) da primeira inflorescência (a partir do solo) foram marcadas com fitilhos coloridos no momento da antese (abertura floral) (Figura 7A). A partir da marcação dessas flores, frutos de idades conhecidas (Figura 7B e Figura 8) foram colhidos aos 60 a 68 dias após a antese. Os frutos foram obtidos em uma plantação comercial na cidade de Nova Odessa, (30 km do laboratório), no estado de São Paulo. Uma porção de 3 cm do pedúnculo foi deixada nos frutos, com a finalidade de diminuir a taxa respiratória causada pelo dano mecânico da colheita. Os frutos foram colhidos em três estádios de maturidade, indicados pelas cores: verde-maduro (fruto totalmente verde), vermelho incipiente (início de coloração amarela-avermelhada na região estilar), e vermelho visível (coloração vermelha bem

visível na região estilar). Depois de colhidos, os frutos foram acondicionados em caixas de isopor revestidas de toalhas umedecidas e levados para o laboratório.

Figura 7. (A) Flores do tomateiro marcadas na ocasião da antese; e (B) frutos do tomateiro (de idades conhecidas) em crescimento.

Figura 8. Frutos do tomateiro, de idades conhecidas, em diferentes estádios de maturidade.

Outro grupo de frutos foi adquirido, três dias após colheita, no mercado atacadista local (CEASA-Campinas), e classificados nas mesmas categorias de maturidade citadas acima (Figura 9). Frutos adquiridos comercialmente não apresentavam o pedúnculo ligado ao fruto.

Figura 9. Frutos do tomateiro colhidos em diferentes estádios de maturidade: (i) verde-maduro (fruto totalmente verde, apresentando mudança de cor da região estilar de verde-escuro para verde-clara); (ii) vermelho incipiente (início de coloração amarelo-avermelhada na região estilar); (iii) vermelho visível (coloração vermelha bem visível na região estilar, estendendo-se à região lateral dos frutos).

3.1.3 Tratamentos

Nos dois experimentos (frutos adquiridos comercialmente ou frutos colhidos na plantação) os tratamentos consistiram nos diferentes estádios de maturidade: (i) Verde-maduro; (ii) Vermelho incipiente; e (iii) Vermelho visível (Figura 9).

Os frutos ligados à planta foram colhidos quatro horas antes das avaliações para que a resposta respiratória resultante do estresse mecânico provocado pela colheita não interferisse na avaliação da taxa respiratória. Todos os frutos foram armazenados no escuro dentro de um armário provido de vários recipientes com água, para que a umidade fosse mantida entre 68 e 84%, medida com o auxílio de um termohigrômetro

com registro de máxima e mínima. A temperatura variou de 23,1 a 24,5°C. O armário permaneceu fechado a maior parte do dia, com aberturas ocasionais das portas para promover a circulação do ar.

3.1.4 Avaliações do material vegetal

Para cada estágio de maturidade, 12 frutos, sendo quatro repetições de três frutos, foram usados em avaliações da taxa respiratória durante o amadurecimento pós-colheita.

Os frutos foram pesados e seus volumes determinados através de deslocamento de água.

Na ocasião da avaliação da taxa respiratória, cada grupo de tomates foi removido do armazenamento e hermeticamente fechado dentro do reator previamente purgado com ar sintético (para se uniformizar a atmosfera inicial onde os frutos iriam respirar) ou com ar filtrado pela cal sodada, e a quantidade de CO₂ liberado pela respiração dos frutos foi detectada por um período de sete minutos. Calculando-se a diferença entre as concentrações final e inicial de CO₂ foi possível determinar-se a produção de CO₂ por quilo de tomates por hora.

3.1.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso em esquema fatorial (estádio de maturidade x tempo de armazenamento). Uma análise de variância com medidas repetidas foi realizada com utilização programa SAS (SAS Institute, 1990). O método dos contrastes foi utilizado para se verificar o efeito do tempo de armazenamento sobre a taxa respiratória. Diferenças significativas foram estabelecidas ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$).

3.2 Indução de proteína mitocondrial desacopladora em tubérculos de batata armazenados sob refrigeração

3.2.1 Material vegetal

Tubérculos de batata (*Solanum tuberosum* L., cv. Bintje) lavados foram obtidos comercialmente três dias após a colheita (aqui chamados de tubérculos frescos).

3.2.2 Tratamentos

Os tubérculos de batata foram selecionados com a finalidade de se obter material homogêneo em termos de tamanho e sanidade. A seguir foram divididos em dois grupos. Um dos grupos foi armazenado à temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) e o outro em câmara refrigerada ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$). Ao longo do armazenamento foram realizadas as avaliações descritas a seguir.

3.2.3 Avaliações do material vegetal

3.2.3.1 Taxa respiratória de tubérculos inteiros

A taxa respiratória dos tubérculos de batata foi determinada com a utilização do sistema descrito no item 3.1.1.

Quatro grupos (quatro repetições) de quatro tubérculos de batata foram retirados de seu ambiente de armazenamento ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ou $5\pm 1^{\circ}\text{C}$) e imersos em água à temperatura de 20°C por 40 minutos, com a finalidade de se homogeneizar a temperatura dos tubérculos em 20°C durante o monitoramento da taxa respiratória. Portanto, 16 frutos foram usados em cada tratamento (temperatura de armazenamento e tempo de armazenamento). Após a homogeneização da temperatura, cada grupo de quatro tubérculos foi seco e colocado no reator hermeticamente fechado, previamente purgado com ar comprimido (para se uniformizar a atmosfera inicial onde os frutos iriam respirar) (Figura 10) e a quantidade de CO_2 liberada pela sua respiração foi detectada por um período de 20 minutos. Calculando-se a diferença entre as concentrações final e inicial de CO_2 foi possível determinar-se a produção de CO_2 por quilo por hora.

Figura 10. Reator sendo purgado com ar sintético antes do início da medição de CO_2 produzido pelos tubérculos.

3.2.3.2 Atividade da proteína desacopladora (PUMP) estimada pela formação de potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\psi$)

As mitocôndrias isoladas a partir de tubérculos de batata foram obtidas de acordo com o método descrito por Silva (1991), que tomou por base o trabalho de Diolez & Moreau (1983).

Aproximadamente 1,5 kg de tubérculos de cada tratamento foi descascado, cortado em cubos e triturado em centrífuga doméstica (Walita). O suco obtido foi imediatamente misturado a um volume final de 500 mL de “Meio de Extração” gelado (4°C) contendo 400 mM sacarose, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2, 1 mM EGTA e 3 mM cisteína. Durante a extração do suco, o pH foi mantido entre 7,2 e 7,6 adicionando-se 1M NaOH. O suco foi então coado em quatro camadas de poliéster. Após o ajuste do pH do filtrado para 7,2, uma primeira centrifugação a $1693,4 \times g$, por 2 minutos, foi realizada, visando eliminar o amido. O sobrenadante foi recolhido e submetido a uma nova centrifugação a $10584,0 \times g$, por 15 minutos, sendo o sedimento coletado e

ressuspenso em “Meio de lavagem” contendo 250 mM sacarose, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2 e 0,125% BSA. A suspensão foi, então, centrifugada a 1108,8 x g, por 3 minutos, sendo dispensado o sedimento. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 8901,2 x g, por 15 minutos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspenso em “Meio de lavagem” sem BSA. O sedimento ressuspenso foi submetido a uma última centrifugação a 8901,2 x g, por 15 minutos, sendo coletado o precipitado obtido. Todo o procedimento foi desenvolvido entre 0 e 4°C.

A suspensão mitocondrial obtida (sedimento coletado após a última centrifugação) foi incubada em um meio de reação (30°C) contendo 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2, 0,33 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM fosfato inorgânico, 5 mM succinato de potássio, 2 µg mL⁻¹ oligomicina, 7 µM atractilosídeo, 300 µM propranolol, 10 µM ácido linolêico e 0,1 mM ATP. Em seguida, foram adicionados 2 mM ATP e, posteriormente, 0,1% BSA. Por último, 1 mM KCN foi adicionado. A diferença de potencial elétrico foi medida pelo método da safranina a 5 µM (Åkerman & Wikstrom, 1976), acompanhando-se as mudanças de fluorescência do corante através de um espectrofotômetro de fluorescência Hitachi, modelo F-4500. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão utilizados foram, respectivamente, 495 e 586 nm, utilizando-se fendas de 5 nm de largura.

A calibração do potencial de membrana ($\Delta\Psi$) da mitocôndria foi realizada. Para tanto, 2 mL de meio de reação contendo 200 mM sacarose, 20 mM Hepes (Na⁺), 1 mM MgCl₂, 0,03 mM EGTA (Na⁺), 1 mM P_i (Na⁺) e 6 µM safranina foi colocado em uma cubeta de quartzo e esta cubeta inserida no fluorímetro nas mesmas condições utilizadas para medir o potencial de membrana nos experimentos. Adicionou-se 0,5 mg mL⁻¹ de mitocôndria e, após incubação de 30 s, 5 mM succinato de sódio. Esperou-se estabilizar o potencial e adicionou-se 0,06 µg mL⁻¹ valinomicina. Depois foram feitas adições consecutivas de 1 mM KCl.

Através da equação de Nerst, $\Delta\Psi = 60.\log(K_{\text{int}}/K_{\text{ext}})$, e considerando-se que a concentração interna na mitocôndria (K_{int}) é de 120 mM (Åkerman & Wikstrom, 1976) e

que K_{ext} é a quantidade de K^+ adicionada, plotou-se um gráfico $1/\text{fluorescência} \times \Delta\Psi$ (mV).

Após a avaliação da atividade da proteína desacopladora, cada amostra de suspensão mitocondrial foi congelada a -70°C . Essas amostras foram depois utilizadas para a detecção imunológica dessa proteína.

3.2.3.3 Atividade da proteína desacopladora (PUMP) estimada pelo consumo de oxigênio pelas mitocôndrias

O consumo de oxigênio foi medido com a utilização de um eletrodo tipo Clark (*Yellow Springs Instruments*) em 1,3 mL de meio de incubação (28°C) contendo 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2, 0,33 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 2,5 mM P_i , 2,5 μg oligomicina mg^{-1} proteína, 300 μM propranolol e 2 μM atractilósídeo com 0,5 mg de proteína mitocondrial. Todas as avaliações foram feitas na presença de 5 mM succinato (com 5 μM rotenona), como substrato oxidável, e 2 mM BHAM, para bloquear a respiração resistente a cianeto (rota alternativa). Com a finalidade de se assegurar a completa ativação da succinato desidrogenase, foi adicionado 0,1 mM ATP (Almeida et al., 1999a). Adições de 10 μM de ácido linoléico (LA) foram feitas para ativar a PUMP e 0,5% de BSA e 5 mM de ATP foram adicionados para inibir a atividade da PUMP.

3.2.3.4 Capacidade da oxidase alternativa (AOX) estimada pelo consumo de oxigênio pelas mitocôndrias

A capacidade da AOX foi medida usando-se o meio de incubação descrito no item 3.2.3.3, com exceção de BHAM, mais 1 mM de ditioneitol (DTT) e 0,15 mM de piruvato para ativar a rota alternativa e 0,5% de BSA e 1 mM de ATP para inibir a atividade da PUMP. Adições de 2 mM de cianeto de potássio (KCN) e 2 mM de BHAM foram feitas com a finalidade de inibir a rota resistente a cianeto e a rota dos citocromos, respectivamente.

3.2.3.5 Detecção imunológica da proteína desacopladora (PUMP)

Proteína mitocondrial (até 60 μg), dosada de acordo com Greenberg & Craddock (1982), foi diluída em tampão de amostra contendo SDS 2% (p/v), Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glicerina 10%, azul de bromofenol 0,004% (v/v) e betamercaptoetanol 5% (v/v) e

fervidos por 10 minutos. Após a eletroforese (5% de poliacrilamida no tampão de empilhamento e 12% no tampão de resolução), as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de nylon (Hypobond N, Amersham) em um aparelho de transferência semi-seca (Pharmacia) por 2 horas, a uma corrente constante de $0,8 \text{ mA cm}^{-2}$ de gel. Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 14 horas a 37°C , sob agitação, em TBST [(Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM, NaCl, 137 mM, Tween-200 1% (v/v)] contendo 10% de leite em pó desnatado (Molico®) e depois incubada (1 h, 25°C), sob agitação, em anticorpo policlonal contra a PUMP de batata³ (*Solanum tuberosum*) diluído (1:1000) na mesma solução. Após a incubação, a membrana foi lavada duas vezes, durante 10 minutos, e uma vez, por 15 minutos, no mesmo tampão sem o leite. Foi feita uma incubação da membrana por 1 hora, sob agitação, em TBST contendo anticorpo anti coelho IgG conjugado com fosfatase alcalina (1:5000). Em seguida, a membrana foi lavada novamente conforme descrito acima. Depois das lavagens, a membrana foi incubada por 10 min em tampão contendo Tris-HCl 10 mM, pH 9,5, e NaCl 100 mM e, a seguir, incubada no escuro por 5 min neste mesmo tampão, contendo o substrato quimioluminescente CSPD (Tropix) na diluição 1: 2000. A membrana foi colocada em um cassete contendo um filme de autorradiografia onde a proteína foi detectada por quimioluminescência. A quantificação destas bandas foi feita por densitometria.

Como controle positivo foi utilizada uma amostra de *Maltose Binding Protein* - MBP *At* PUMP, ou seja, PUMP de *Arabidopsis thaliana* fusionada em bactéria.

Um marcador de peso molecular pré corado (Gibco BRL) indicando massas moleculares entre 14.300 e 200 foi utilizado como padrão.

3.2.3.6 Detecção imunológica da oxidase alternativa (AOX)

As proteínas mitocondriais foram incubadas por 30 minutos, a 4°C , em um meio de solubilização contendo Tris 50 mM, pH 7,5, nonidet-40 (NP-40) 0,2%, DTT 1 mM e fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM.

³ Anticorpo cedido pelo Prof. Dr. Paulo Arruda, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Campinas, SP.

Utilizando-se as mesmas amostras de suspensão mitocondrial congeladas a -70°C, até 300 µg de proteína, dosada de acordo com Greenberg & Craddock (1982), foram diluídos em tampão de amostra contendo SDS 2% (p/v), Tris-HCl 50 mM, pH 6,8, glicerina 10%, azul de bromofenol 0,004% (v/v), ditioneitol (DTT) 100 mM e betamercaptoetanol 0,5% (v/v) e fervidas por 5 minutos.

Após a eletroforese (5% de poliacrilamida no tampão de empilhamento e 14% no tampão de resolução), as proteínas foram transferidas eletroforicamente para membrana de nylon, como descrito anteriormente para a imunodeteção da PUMP.

Após a transferência, a membrana foi bloqueada por 2 horas, a 4°C, sob agitação, em TBST contendo 5% de leite desnatado (Molico®) e depois incubada (20h, 25°C) em anticorpo monoclonal⁴ contra a proteína oxidase alternativa de *Sauromattum guttatum* diluído (1:50) em solução TBST contendo 5% leite em pó desnatado (Molico®). Após a incubação, foram feitas 2 lavagens de 10 minutos em TBST mais 2 lavagens de 10 minutos em TBST com leite 2,5%. A membrana foi incubada em TBS contendo anticorpo anti-camundongo IgG conjugado com fosfatase alcalina⁵ (1:1000), por 14 horas sob agitação. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes, durante 10 minutos e mais uma vez, durante 15 minutos, em TBST. A membrana foi incubada no escuro por 10 min em TBST contendo CSPD (Tropix) na diluição 1: 2000. O final do processo foi idêntico ao descrito para a detecção imunológica da PUMP. Como controle positivo para a presença da oxidase alternativa, foi incluída uma amostra de suspensão mitocondrial de tomates verde-maduros, visto que Almeida et al. (1999a) encontraram maior teor desta proteína neste estágio de maturidade. Para tanto, isolamos as mitocôndrias do fruto, purificando-as em seguida em gradiente Percoll, segundo a metodologia descrita por Sluse et al. (1998).

Como referência para determinação da massa molecular das bandas, foi utilizado o mesmo marcador de peso molecular citado anteriormente.

⁴ Cedidos pelo Prof. Dr. Thomas E. Elthon, Iowa State University, EUA e Andréa Almeida.

⁵ Cedido pelo Prof. Dr. Jorge Vega, Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas, SP.

3.2.4 Delineamento experimental

Os experimentos para a determinação da taxa respiratória de tubérculos inteiros seguiram o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (temperatura de armazenamento x tempo de armazenamento). Análise de variância simples (ANOVA) foi realizada com a utilização do programa SAS (SAS Institute, 1990). O método de Duncan foi usado para comparar as taxas respiratórias dos tubérculos de batata de acordo com a temperatura de armazenamento. Diferenças estatísticas foram estabelecidas ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$).

A cada dia de avaliação, os grupos de batatas foram sempre analisados na mesma ordem, sendo o primeiro grupo armazenado à temperatura ambiente, o segundo refrigerado, o terceiro armazenado à temperatura ambiente, o quarto refrigerado, e assim por diante. Assim, os primeiros dois grupos de batatas foram combinados na seqüência de repetições, e calculou-se uma razão entre as taxas respiratórias para cada par de batatas. Essa combinação gerou um valor (razão) para cada dia de armazenamento, correspondente à taxa respiratória das batatas refrigeradas em relação à taxa respiratória das batatas mantidas à temperatura ambiente. Para esses valores gerados, foi feita uma análise de variância simples e o teste de Tukey foi utilizado para comparar a razão entre as taxas respiratórias de acordo com o tempo de armazenamento. Diferenças significativas foram estabelecidas ao nível de 1% de significância ($p < 0,01$).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo

4.1.1 O equipamento

A Figura 11 mostra o aparato construído a partir do esquema apresentado na Figura 4. Optamos por um sistema fechado de passagem contínua de ar do recipiente (reator ou frasco de respiração) para a bomba peristáltica, cela de difusão, e de volta para o reator. A Figura 12 apresenta a cela de difusão em detalhe, mostrando a membrana de Teflon®.

Figura 11. Sistema de análise em fluxo para detecção condutométrica do CO₂. (1) Reservatório de água destilada e deionizada; (2) Reator hermeticamente fechado; (3) Bomba peristáltica; (4) Cella de difusão; (5) Cella de condutividade; (6) Condutivímetro; (7) Registrador.

Figura 12. Detalhes da cela de difusão: MT) membrana de Teflon®; CA) Corpo em acrílico que sustenta a membrana de Teflon®. Para garantir máxima deionização da água, colunas com resinas de troca catiônica e aniônica (CT) podem ser instaladas no fluxo aquoso do sistema.

4.1.2 Calibração do teor de CO_2 no reator

As duas partes do reator foram unidas e o mesmo foi purgado com nitrogênio através da abertura superior, com a finalidade de eliminar todo o dióxido de carbono do interior do frasco. A abertura superior foi fechada imediatamente e ar livre de CO_2 (ou nitrogênio) circulando através do sistema gerou uma linha base, indicativa de ausência de CO_2 . Depois da estabilização da linha base (0 ppmV de CO_2), uma curva de calibração foi obtida injetando-se, no reator, volumes conhecidos de CO_2 . A atmosfera de CO_2 puro foi obtida a partir de um erlenmeyer de 250 mL 99,9% cheio de gelo seco e coberto com um filme de PVC ou diretamente de um cilindro comercial de CO_2 . Os volumes conhecidos de CO_2 foram injetados no frasco através do septo de borracha, utilizando-se uma seringa gas-tight (Hamilton Company). Após cada adição, um aumento na condutividade foi registrado na forma de uma curva ascendente que atingiu um platô. Adições consecutivas de CO_2 permitiram, dessa forma, a geração de uma

curva de analítica forma de escada (Figura 13). Uma curva analítica com uma equação quadrática ($y = -9\text{E-}07x^2 + 0,0244x + 0,1458$; $r^2 = 0,9999$) foi produzida plotando-se a altura de cada degrau (y) contra o volume de CO_2 adicionado (x). Uma equação quadrática (mais que linear) descreve essa curva devido ao comportamento do H_2CO_3 como um eletrólito fraco (Skoog et al., 1990). Para cada dia de análise, duas curvas analíticas foram geradas, uma no início e a outra no final do experimento, com o objetivo de se corrigirem as variações de temperatura que pudessem ocorrer durante as três horas de experimento.

4.1.3 Precisão do método

A precisão deste método foi avaliada de acordo com o seguinte procedimento: o reator foi purgado com nitrogênio durante 3 minutos. Depois disso, uma curva analítica foi obtida como descrito anteriormente. O frasco foi purgado novamente com nitrogênio, e um volume conhecido de CO_2 (2000 μL) foi injetado dentro dele. Este procedimento foi repetido 7 vezes, sempre injetando-se o mesmo volume de CO_2 no frasco. O erro relativo calculado, usando-se esse procedimento, foi de -3,0%. Esses resultados mostraram que o sistema proposto fornece valores confiáveis da taxa respiratória de tomates.

4.1.4 Saturação de CO_2

Visando avaliar a possibilidade de inibição da respiração provocada por altas concentrações de CO_2 no interior do reator, o seguinte experimento foi realizado. Três frutos de tomate foram encerrados no reator e a respiração desses frutos foi monitorada por 190 minutos. A cada intervalo de 5 minutos, a taxa respiratória foi calculada e o valor resultante (y) foi plotado em relação ao intervalo de tempo decorrido (x) (equação linear: $y = 352,88x + 1059,6$; $R^2 = 0,9993$). O intervalo de 190 minutos não foi suficiente para haver saturação de CO_2 dentro do frasco, não sendo atingido nenhum platô indicativo de inibição de respiração causada pela alta concentração de CO_2 . Estes resultados confirmam que, para intervalos até maiores do que aqueles usados nos

experimentos de avaliação respiratória dos tomates, as concentrações de O_2 e/ou CO_2 dentro do reator não influenciam as taxas respiratórias que estão sendo avaliadas.

Figura 13. Curva analítica para CO_2 em amostras gasosas. Várias injeções de $1000 \mu L$ de CO_2 (indicadas pelas setas) deram origem a uma curva de calibração em forma de escada, composta por degraus de várias alturas (H1 a H5). A linha base foi obtida depois do sistema inteiro ter sido purgado com nitrogênio gasoso.

4.1.5 Medida da taxa respiratória

Depois do sistema inteiro ter sido purgado com ar livre de CO_2 , um grupo de três tomates foi pesado e encerrado dentro do reator. Com a passagem superior aberta, ar sintético foi purgado por 3 minutos dentro do frasco (como mostra a Figura 10). O septo de borracha foi rapidamente fechado, o frasco foi conectado ao sistema de detecção e uma curva de respiração no formato de uma curva ascendente (Figura 14) foi gerada em

7 minutos. As quantidades final e inicial de CO_2 dentro do frasco foram calculadas interpolando-se as alturas inicial (Figura 14, H_i) e final (Figura 14, H_f) na equação matemática usada para representar a curva analítica. O espaço livre dentro do reator foi estimado por subtração do volume do fruto (determinado por deslocamento de água) do volume total do frasco. As taxas respiratórias foram expressas em $\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ de CO_2 produzido.

Figura 14. Curva típica de respiração. Respiração de três tomates var. Santa Clara monitorada por cerca de 7 minutos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$. As taxas respiratórias foram obtidas por interpolação das alturas inicial (H_i) e final (H_f) na curva analítica (Figura 13). O intervalo de tempo (T) e a massa dos frutos foram usados para calcular a taxa respiratória expressa em $\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ de CO_2 produzido.

4.1.6 Taxa respiratória de frutos do tomateiro colhidos em diferentes estádios de maturidade

Tomates verde-maduros, obtidos no mercado atacadista local (CEASA - Campinas) (frutos comerciais) apresentaram valores médios de taxa respiratória ao redor de $90 \text{ mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ de CO_2 produzido sem alteração durante o período pós-colheita (Figura 15A). Tomates verde-maduros, colhidos no campo (frutos colhidos, Figura 16A) mostraram comportamento similar ao do grupo anterior no que se refere à pequena

variação no tempo, mas também apresentaram taxas respiratórias mais baixas (em torno de 60 mg kg⁻¹ h⁻¹ de CO₂ produzido). Essas taxas foram provavelmente mais baixas devido à menor ocorrência de injúria mecânica nos frutos colhidos diretamente no campo, sem manuseio por terceiros, e à presença do pedúnculo que proporcionou um tipo de barreira a trocas gasosas. Depois de 7 dias de avaliações, não foi possível identificar nenhuma ascensão climática nos frutos verde-maduros, tanto nos comerciais quanto nos colhidos na planta.

Figura 15. Taxa respiratória de frutos de tomateiro (cv. Santa Clara) classificados como (A) verde-maduros; (B) coloração vermelha incipiente; e (C) coloração vermelha visível. Cada ponto representa a taxa respiratória média de quatro repetições (três tomates formando cada repetição). Linhas verticais indicam o desvio padrão das medidas. Frutos obtidos no mercado atacadista local (frutos comerciais).

Tomates do grupo vermelho incipiente no início do período de armazenamento (tanto em frutos comerciais quanto em frutos colhidos), apresentaram taxas respiratórias

mais altas do que os frutos verde-maduros. Suas taxas respiratórias, em torno de $120 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de CO_2 produzido nos frutos comerciais (Figura 15B) e ao redor de $80 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de CO_2 produzido em frutos colhidos (Figura 16B), atingiram o ponto máximo no quinto e primeiro dia após a colheita, respectivamente. Depois destes pontos, as taxas respiratórias decresceram.

Frutos de coloração vermelho visível, tanto comerciais quanto colhidos no campo, mostraram um padrão respiratório decrescente desde o início até o final do período de armazenamento (Figura 15C e Figura 16C).

Figura 16. Taxa respiratória de frutos de tomateiro (cv. Santa Clara) classificados como (A) verde-maduros; (B) coloração vermelha incipiente; e (C) coloração vermelha visível. Cada ponto representa a taxa respiratória média de quatro repetições (três tomates formando cada repetição). Linhas verticais indicam o desvio padrão das medidas. Frutos colhidos em uma plantação comercial (frutos colhidos). No experimento C, os frutos não foram avaliados após 4 dias de armazenamento.

4.2 Indução de proteína desacopladora em tubérculos de batata armazenados sob refrigeração

4.2.1 Taxa respiratória de tubérculos de batata inteiros

Com objetivo de verificar se a temperatura de armazenamento influenciava a intensidade da taxa respiratória de tubérculos inteiros, o CO_2 liberado pela respiração dos tubérculos de batata armazenada por 10 dias sob refrigeração e à temperatura ambiente foi monitorado continuamente durante um intervalo de tempo de aproximadamente 20 minutos, a 20°C . Desta maneira, para tubérculos de ambos tratamentos, quantidades crescentes de CO_2 foram detectadas, gerando curvas ascendentes (semelhantes à curva mostrada na Figura 14) como resultados da respiração dos tubérculos. As taxas respiratórias foram calculadas da mesma maneira descrita para as taxas respiratórias dos tomates, sendo a evolução de CO_2 expressa em $\text{mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$. Assim, determinamos as taxas respiratórias dos tubérculos refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$) e não refrigerados ($25\pm 2^\circ\text{C}$) ao longo do armazenamento (Figura 17A).

A taxa de evolução de CO_2 decresceu rapidamente de 13 a $8 \text{ mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ durante os 3 primeiros dias de armazenamento a $25\pm 2^\circ\text{C}$ e então caiu lentamente de 8 a $6,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ durante os próximos 7 dias. Em contraste, a evolução de CO_2 nas batatas armazenadas a $5\pm 1^\circ\text{C}$ não se alterou significativamente durante os 3 primeiros dias de armazenamento, aumentou para $14,5 \text{ mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ no dia seguinte e sofreu um lento decréscimo para cerca de $12 \text{ mg kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ durante os próximos 6 dias. A partir do terceiro dia de armazenamento, a taxa respiratória de tubérculos refrigerados foi significativamente ($p<0,05$) maior que a taxa respiratória de tubérculos armazenados à temperatura ambiente (Figura 17A).

A relação entre a taxa respiratória de batatas armazenadas a $5\pm 1^\circ\text{C}$ e a taxa respiratória de batatas armazenadas a $25\pm 2^\circ\text{C}$ aumentou quase duas vezes durante os 3 primeiros dias de armazenamento e manteve-se constante até o final do período de observação (Figura 17B). Esse resultado indica que a respiração dos tubérculos refrigerados foi aproximadamente duas vezes maior que a respiração dos tubérculos mantidos à temperatura ambiente após o terceiro dia de armazenamento (Figura 17B).

Figura 17. (A) Taxas respiratórias de tubérculos inteiros de batata (cv. Bintje) armazenados durante 10 dias a $5\pm 1^\circ\text{C}$ (■) ou $25\pm 2^\circ\text{C}$ (◆). A avaliação das taxas respiratórias foi realizada a 20°C , depois que os tubérculos foram termostatizados. Cada ponto representa a taxa respiratória média de quatro repetições (cada repetição formada por um grupo de quatro tubérculos). O sinal (*) indica diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos ($5\pm 1^\circ\text{C}$ e $25\pm 2^\circ\text{C}$). (B) Razão entre a evolução de CO_2 em tubérculos de batata armazenados a $5\pm 1^\circ\text{C}$ sobre a evolução de CO_2 em tubérculos de batata armazenados a $25\pm 2^\circ\text{C}$. As linhas verticais indicam o desvio padrão das medidas. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,01$).

4.2.2 Atividade da PUMP estimada pela formação de potencial eletroquímico de prótons ($\Delta\Psi$)

Um vez observado que a refrigeração provocou aumento na taxa respiratória de tubérculos no sistema *in vivo*, isto é, nos tubérculos intactos, partimos para a avaliação dos efeitos do estresse por frio no sistema *in vitro*, realizando experimentos com mitocôndrias isoladas.

Batatas armazenadas por 4 dias (momento em que observamos que a refrigeração causou a maior efeito sobre a taxa respiratória nos tubérculos inteiros) tiveram suas mitocôndrias isoladas e submetidas a um experimento cujo objetivo foi testar se a atividade da PUMP, estimada pela formação de $\Delta\Psi$, também diferia segundo a temperatura de armazenamento das batatas.

No início do experimento, um meio de incubação simulando condições fisiológicas e contendo succinato como substrato respiratório foi fornecido às mitocôndrias. Sob estas condições especiais, potencial de membrana foi formado segundos após a adição da suspensão mitocondrial ao meio de reação. Este aumento de potencial elétrico, estimado pelo decréscimo da fluorescência da safranina O, pode ser visto no eixo y da Figura 18. Depois do potencial ter sido formado como indicado tanto na linha *a* (mitocôndrias de batatas armazenadas a $25\pm 2^\circ\text{C}$), quanto na linha *b* (mitocôndrias de batatas armazenadas a $5\pm 1^\circ\text{C}$), adicionou-se ATP, que age como um inibidor alostérico da PUMP, ao meio de reação. Após adição de ATP ocorreu aumento no potencial de membrana, indicado por um decréscimo na fluorescência da safranina, sendo este efeito maior sobre as mitocôndrias de batatas refrigeradas (linha *b*). Da mesma forma, após a adição de BSA (que age quelando os substratos da PUMP) houve aumento de potencial de membrana, mais acentuado nas mitocôndrias de batatas armazenadas a $5\pm 1^\circ\text{C}$ (linha *b*). Efeitos maiores de ATP e BSA sobre as mitocôndrias de batatas refrigeradas indicam maior atividade da PUMP nessas mitocôndrias. Quando adicionam-se substâncias inibidoras da proteína desacopladora, observamos aumento do potencial que antes estava sendo dissipado pela atividade dessa proteína.

Figura 18. Efeito de 2 mM ATP, 0,1% BSA e 1 mM KCN sobre o potencial elétrico transmembrânico ($\Delta\Psi$) de mitocôndrias de batata cv. Bintje ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$). As batatas foram armazenadas por 4 dias a $25\pm 2^\circ\text{C}$ (linha *a*) ou a $5\pm 1^\circ\text{C}$ (linha *b*). Os experimentos foram realizados usando um meio de reação (30°C) contendo 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2, 0,33 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 2,5 mM fosfato inorgânico, 5 mM succinato de potássio, $2 \mu\text{g}$ oligomicina mL^{-1} proteína, $7 \mu\text{M}$ atractilósídeo, $300 \mu\text{M}$ propranolol, 0,1 mM ATP e $10 \mu\text{M}$ LA. $\Delta\Psi$ foi estimado em função do decréscimo de fluorescência da safranina O (unidades arbitrárias, aqui representadas por u.a.).

Apesar da Figura 18 apresentar resultados de experimentos realizados com batatas armazenadas por 4 dias, outros experimentos também foram realizados ao longo

do armazenamento, sendo esses resultados coincidentes com os apresentados na Figura 18. Além de maior efeito de BSA e ATP nas mitocôndrias de batatas refrigeradas, observou-se também a intensificação desse efeito com o aumento do tempo de armazenamento.

Com base nos resultados acima descritos, podemos dizer que a temperatura baixa causou aumento tanto na taxa respiratória dos tubérculos inteiros, quanto no efeito de BSA e ATP sobre a formação do $\Delta\Psi$ em mitocôndrias isoladas, sendo esse aumento intensificado pelo envelhecimento das batatas.

4.2.3 Atividade da PUMP estimada pelo consumo de oxigênio pelas mitocôndrias: respiração sustentada pela PUMP

Com objetivo de verificar se o efeito da temperatura sobre o $\Delta\Psi$ poderia estar associado a um aumento da respiração sustentada pela PUMP, o consumo de oxigênio por essas mitocôndrias foi medido. A atividade da PUMP, induzida por LA em mitocôndrias de tubérculos de batata isoladas na presença de 0,5% BSA, foi medida em meio de reação contendo succinato, rotenona, oligomicina e BHAM. Usando as inclinações das taxas respiratórias dos experimentos descritos na Figura 19, a extensão do estímulo da PUMP por 10 μM LA foi determinada como sendo a diferença entre as taxas respiratórias em “steady-state” (inclinação 2 menos inclinação 1). Depois da adição de LA, a respiração (BHAM+LA) das mitocôndrias isoladas dos tubérculos armazenados sob refrigeração (Figura 19) ($114,5 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) durante quatro dias foi 17,9% mais elevada do que a respiração das mitocôndrias dos tubérculos armazenados a temperatura ambiente ($97,1 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$). As subseqüentes adições de 0,5% BSA e 5 mM ATP inibiram a atividade da PUMP e levaram a uma taxa respiratória sustentada somente pelo vazamento de prótons (inclinação 3). Nesse caso, não houve diferença significativa entre a respiração de mitocôndrias de batatas armazenadas a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ($66,2 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) ou a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ($63,3 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$). Sob as condições da inclinação 2, o vazamento de prótons é insignificante porque o LA provoca uma queda no potencial de membrana a valores próximos da respiração no estado 3 (induzida por ADP). Portanto, a

diferença entre a taxa respiratória estimulada por LA e a taxa respiratória inibida por ATP+BSA (inclinação 2 menos inclinação 3) corresponde à taxa respiratória total sustentada pela PUMP. Essa atividade correspondeu a um consumo de oxigênio sustentado pela PUMP de 33,5 e 48,3 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína nas mitocôndrias isoladas de tubérculos armazenados durante quatro dias a 25±2°C e a 5±1°C, respectivamente. Isto é compatível com um aumento de 44% na atividade da PUMP estimulada pelo estresse por baixa temperatura, um resultado que está de acordo com o resultado do experimento apresentado na Figura 18. As taxas de consumo de oxigênio estimuladas por FCCP são similares (155 e 153 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína) nas mitocôndrias dos tubérculos armazenados em ambas as temperaturas, indicando que a via dos citocromos não foi afetada pelo estresse provocado por baixa temperatura.

Figura 19. Determinação da respiração sustentada pela PUMP. Mitocôndrias (0,5 mg proteína mL⁻¹) foram incubadas em meio de reação (28°C) descrito no item 3.2.3.3 mais 2 mM BHAM. Adições de 10 µM LA, 0,5% BSA, 5 mM ATP, e 1 µM FCCP foram feitas (onde indicado pelas setas). Os números em parênteses referem-se às taxas de consumo de O₂ (nmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína), sendo valores médios de três determinações. A inclinação 2 refere-se à atividade total da PUMP mais vazamento de prótons (respiração depois da adição de LA) e a inclinação 3 refere-se ao vazamento total de prótons (respiração após adição de BSA e ATP).

4.2.4 Detecção imunológica da PUMP

Para verificar se a PUMP estaria exercendo seu papel desacoplador com maior intensidade nas mitocôndrias de batatas refrigeradas devido ao aumento de expressão

dessa proteína, amostras de mitocôndrias de batatas mantidas nas duas diferentes temperaturas foram utilizadas para detecção imunológica da PUMP.

A partir do terceiro dia de armazenamento, a banda referente à PUMP (32 kD) foi mais visível nas amostras de batatas armazenadas a $5\pm1^{\circ}\text{C}$ (Figura 20). Este aumento de intensidade da banda indica aumento na expressão da proteína e ocorreu um dia após o maior aumento da taxa respiratória em frutos inteiros refrigerados, demonstrado na Figura 17.

Figura 20. Imunodeteção de proteína desacopladora (PUMP) em tubérculos de batata armazenados a $25\pm2^{\circ}\text{C}$ ou $5\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 1 a 10 dias. As proteínas mitocondriais foram submetidas a uma eletroforese, transferidas para uma membrana de nylon e imunodetectadas, usando anticorpo policlonal contra PUMP de batata. Todos os passos da imunodeteção para ambas as temperaturas de armazenamento foram realizados simultaneamente.

4.2.5 Capacidade da AOX estimada pelo consumo de oxigênio pelas mitocôndrias

Uma vez verificado que a refrigeração provoca aumento na taxa respiratória de tubérculos inteiros e esse aumento está diretamente relacionado com a atividade e expressão da PUMP, torna-se necessário avaliar também o envolvimento da oxidase alternativa nesse processo.

Para tanto, um experimento representado pelos traçados da Figura 21 foi realizado. A respiração resistente a cianeto ou capacidade da AOX foi medida após a

adição de 2 mM KCN às mitocôndrias isoladas respirando em estado 4 (mais oligomicina) em meio de reação contendo succinato como substrato (mais rotenona) na presença de piruvato e DTT, que são ativadores da AOX (Figura 21). A capacidade da AOX foi corrigida para baixas taxas residuais ($1-2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína) de consumo de O_2 depois da adição de 2 mM BHAM.

A partir das inclinações indicadas no traçado da Figura 21 pelos números 1, 2 e 3, foram realizados cálculos com a finalidade de se determinar a taxa respiratória total (inclinação 1), a capacidade da AOX (inclinação 2 menos inclinação 3) e a respiração sensível a cianeto ou pela rota dos citocromos (inclinação 1 menos inclinação 2).

Esse experimento foi repetido utilizando-se mitocôndrias de batatas armazenadas a $5\pm 1^\circ\text{C}$ e $25\pm 2^\circ\text{C}$, aos 1, 2, 3, 4, 7 e 10 dias de armazenamento. Com base nos cálculos realizados para os resultados obtidos ao longo do armazenamento, a Figura 22 foi apresentada.

A taxa respiratória total (Figura 22A) foi significativamente maior nas mitocôndrias isoladas de batatas armazenadas a $5\pm 1^\circ\text{C}$ durante o primeiro, quarto e décimo dias de armazenamento. Nos outros dias, a taxa respiratória nessas mitocôndrias teve uma tendência a ser mais elevada, mas não apresentou diferença estatística. No tratamento frio, a taxa respiratória foi praticamente constante nos dois primeiros dias de armazenamento, diminuiu de $84,4$ para $64,6 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína do segundo para o terceiro dia de armazenamento, aumentou para $118,5 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína no quarto dia, diminuiu novamente para $94,4 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína no sétimo dia e permaneceu constante até o final do armazenamento. À temperatura ambiente, a taxa respiratória aumentou significativamente de $47,7$ para $75,8 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína nos primeiros dois dias de armazenamento, permaneceu constante no sétimo dia e decresceu para $50,5 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína no último dia de armazenamento.

A capacidade da AOX (Figura 22B) foi significativamente maior ($p<0,01$) nas mitocôndrias isoladas a partir de batatas refrigeradas ao longo de todo o período de armazenamento. No tratamento frio, a taxa respiratória via AOX aumentou do terceiro para o quarto dia de $20,9$ para $42,5 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína e tendeu à constância até o final do armazenamento. À temperatura ambiente, a capacidade da AOX decresceu

do segundo ao terceiro dia de 14,9 para 2,3 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína e permaneceu constante do terceiro dia em diante.

Figura 21. Determinação da capacidade de respiração pela via alternativa (AOX).

Mitocôndrias ($0,5 \text{ mg proteína mL}^{-1}$) foram incubadas em meio (28°C) contendo 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM tampão HEPES, pH 7,2, 0,33 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 2,5 mM fosfato inorgânico, 2,5 μg oligomicina mg^{-1} proteína, 2 μM atractilósídeo, 300 μM propranolol, 5 mM succinato de potássio (mais 5 μM rotenona), 0,1 mM ATP, 1 mM DTT, 0,15 mM piruvato e 0,5% BSA. Adições de 2 mM KCN e 2 mM BHAM foram feitas (onde indicado pelas setas). Inclinação 1 indica a respiração total; inclinação 1 menos inclinação 2 refere-se à respiração sensível a cianeto; e inclinação 2 menos inclinação 3 refere-se à capacidade total da AOX.

Figura 22. Consumo de O₂ por mitocôndrias de tubérculos de batata armazenados por 1, 2, 3, 4, 7, e 10 dias a 5±1°C (■) ou 25±2°C (◆). (A) Respiração total; (B) Capacidade da AOX; (C) Respiração sensível a cianeto. Cada ponto representa a média de consumo de O₂ de pelo menos três experimentos (como o descrito na Figura 21). As linhas verticais indicam o desvio padrão das avaliações.

A respiração sensível a cianeto ou pela rota dos citocromos (Figura 22) foi significativamente mais elevada ($p < 0,01$) no tratamento refrigerado somente no início do armazenamento (primeiro dia). Mitocôndrias isoladas de batatas armazenadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ apresentaram consumo de oxigênio significativamente mais elevado nos terceiro e sétimo dias de armazenamento. À baixa temperatura, a respiração sensível a cianeto permaneceu constante no início do armazenamento, e aumentou significativamente do terceiro para o quarto dia, quando aumentou de 43,7 para 70,9 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína, e permanecendo constante daí em diante. À temperatura ambiente, a taxa respiratória sensível a cianeto aumentou de 32,6 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína no primeiro dia para 60,9 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína no 2º dia de armazenamento, permaneceu constante até o terceiro dia, então aumentou novamente para 81,6 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína no quarto dia. Esta taxa permaneceu constante até o sétimo dia, e diminuiu para 50,5 $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína no décimo dia.

Os resultados de consumo de oxigênio para o tratamento refrigerado apresentaram padrões muito similares para respiração total (Figura 22A), capacidade da AOX (Figura 22B) e respiração sensível a cianeto (Figura 22C), com um significativo aumento de consumo de oxigênio do terceiro ao quarto dia de armazenamento. Um aumento no mesmo período (do terceiro para o quarto dia) foi também observado na taxa respiratória de tubérculos inteiros submetidos à refrigeração (Figura 17A).

Os dados obtidos sobre consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de batatas refrigeradas confirmam os dados obtidos tanto com relação à formação de potencial de membrana quanto à própria taxa respiratória dos tubérculos inteiros. O armazenamento das batatas a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ resultou em maior respiração dos tubérculos intactos associado à maior atividade e expressão da proteína desacopladora e à maior capacidade da oxidase alternativa.

Apesar da refrigeração causar todos esses estímulos, quando monitoramos a temperatura da câmara fria e do interior do tubérculo das batatas, não observamos nenhuma elevação na temperatura do termômetro inserido no tubérculo em relação ao posicionado na câmara fria. Isso indica que, mesmo havendo aumento na taxa

respiratória sustentada pela PUMP e pela AOX, a capacidade dessas proteínas gerarem calor parece não ser compatível com o papel termogênico de ambas.

4.2.6 Detecção imunológica da AOX

Uma vez que foi observado que a refrigeração das batatas causou aumento significativo da capacidade da proteína oxidase alternativa ao longo de todo o período de armazenamento, realizamos ensaios de imunodeteção dessa proteína. Dessa maneira, pretendíamos detectar imunologicamente a mesma em amostras de batatas armazenadas durante 4 dias a $5\pm1^{\circ}\text{C}$ e a $25\pm2^{\circ}\text{C}$ (Figura 23). Os anticorpos monoclonais utilizados reagiram somente com a banda relativa ao controle positivo (mitocôndrias isoladas de frutos verdes do tomateiro).

Figura 23. Imunodeteção da proteína oxidase alternativa (AOX) em proteína mitocondrial total de tubérculos de batata cv. Bintje armazenados por 4 dias a $5\pm1^{\circ}\text{C}$ ou $25\pm2^{\circ}\text{C}$, usando anticorpos monoclonais contra AOX de *Sauromatum guttatum*. Os números à esquerda (kD) indicam o peso molecular dos marcadores de proteína usados como referência. Mitocôndrias de tomates verdes foram utilizadas como controle positivo.

5 DISCUSSÃO

5.1 Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo

O sistema de análise em fluxo proposto é caracterizado por um equipamento simples, com componentes de baixo custo (~US\$ 4000) e de fácil operação. Esse equipamento é indicado para laboratórios emergentes interessados em monitorar a taxa respiratória de produtos vegetais, assim como avaliar amostras da atmosfera do interior de embalagens, podendo gerar importantes dados para estudos de fisiologia pós-colheita ou bioquímica.

A faixa analítica de trabalho (~3 ordens de magnitude) é muito mais alta que a da maioria dos métodos comumente usados para medir dióxido de carbono. O maior requisito para se trabalhar em diferentes faixas analíticas é produzir novas curvas de calibração.

Uma taxa respiratória mínima de $0,52 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pode ser detectada nas condições experimentais usadas. No entanto, este limite pode ser abaixado utilizando-se reatores de volume menor. Além de permitir a detecção de menores taxas respiratórias, a diminuição do volume do frasco também pode contribuir para o aumento da velocidade analítica. Quanto mais próximo o volume do reator do volume dos frutos encerrados em seu interior, maior rapidez analítica é conseguida, cuidando sempre para que experimentos preliminares relativos ao tempo de saturação, como os descritos no item 4.1.4, sejam realizados.

A principal desvantagem do método proposto é que a condutividade é dependente da temperatura, o que torna necessário uma estabilização térmica das celas de condutividade e difusão (Pasquini & Faria, 1987) ou, como foi feito nos presentes

experimentos, freqüentes calibrações. Alguns íons inorgânicos tais como sulfeto, cianeto e acetato, assim como alguns gases ácidos, tais como SO_2 e NO_2 , podem causar interferência no método. Felizmente, tais reagentes não são normalmente encontrados nas condições propostas (Jardim et al., 1990).

A necessidade de um operador bem treinado pode também representar um fator desvantajoso do método aqui proposto. No entanto, dependendo da disponibilidade de recursos do laboratório interessado em avaliar taxas respiratórias de vegetais, o baixo custo do equipamento compensa o investimento de tempo para o aprendizado da técnica de detecção de dióxido de carbono por condutometria.

Nosso interesse em medir a taxa respiratória de frutas e hortaliças intactas surgiu quando a proteína desacopladora de vegetais (PUMP), que pode estar envolvida em eventos fisiológicos tais como ascensão climática durante o armazenamento de frutos, foi isolada, reconstituída em lipossomos e clonada (Vercesi et al., 1995, Maia et al., 1998). Nesse sentido, Almeida et al. (1999a) mediram as atividades respiratórias em mitocôndrias isoladas de frutos de tomate durante o amadurecimento e sugeriram que a PUMP e a AOX, também envolvida na dissipação de energia em mitocôndrias de planta (Lambers, 1982), poderiam desempenhar diferentes papéis durante o processo de amadurecimento. Esses autores observaram em geral uma queda na respiração durante o amadurecimento pós-colheita da mesma maneira que foi observado neste trabalho para os frutos comerciais verde-maduros (do quinto dia em diante), de cor vermelha incipiente e vermelha visível (Figura 15). Essa diminuição progressiva foi paralela ao decréscimo no conteúdo de PUMP e AOX observado no amadurecimento de tomates depois de colhidos (Almeida et al., 1999a).

Os resultados do presente estudo mostram que foi possível testar a eficácia e confiabilidade do método proposto através do monitoramento da taxa respiratória que ocorre durante o amadurecimento de frutos do tomateiro. As observações do comportamento respiratório concordaram com as observações disponíveis na literatura (Pharr & Kattan, 1971; Andrews, 1995; Artés et al., 1998; Maharaj et al., 1999) usando métodos convencionais e mais dispendiosos de detecção de CO_2 , por exemplo, IRGA e GC.

Apesar dos artigos acima citados mostrarem alguns resultados diferentes dos aqui apresentados, em termos da magnitude da evolução de CO₂, a maioria deles devido a diferenças nas condições experimentais (temperatura de armazenamento, ponto de colheita e variedade dos frutos), o método por nós descrito é perfeitamente adequado para ser usado na avaliação de taxas respiratórias de produtos vegetais.

5.2 Indução de proteína desacopladora em tubérculos de batata armazenados sob refrigeração

É bem conhecido que durante períodos de aclimação ao frio novas proteínas se formam para ajudar a planta a se adaptar ao ambiente alterado (Guy, 1990; Kolesnichenko et al., 2000a,b). Nesse sentido, recentemente foi observado que a expressão da PUMP foi estimulada em tubérculos de batata armazenados a 4°C quando comparados com tubérculos armazenados a 28°C (Nantes et al., 1999). Um vez que o possível papel fisiológico da PUMP foi estudado somente com base em resultados obtidos com mitocôndrias isoladas, o objetivo do presente trabalho foi analisar se a expressão da PUMP promovida pela exposição à baixa temperatura é associada a aumento na atividade respiratória dos tubérculos de batata intactos armazenados sob refrigeração. Isto foi verificado medindo-se as taxas de evolução de CO₂ nos tubérculos intactos armazenados a 5±1°C ou 25±2°C durante um período de até 10 dias (Figura 17A). A diminuição na taxa de evolução de CO₂ em tubérculos de batata armazenados a 25±2°C refletiu um decréscimo na atividade metabólica que segue este período pós-colheita. Em contraste, o aumento na taxa de evolução de CO₂ nos tubérculos de batata refrigerados parece ser resultante de alterações metabólicas induzidas pela baixa temperatura. Uma vez que a temperatura dos tubérculos foi elevada a 20°C para a produção de CO₂ dos tubérculos ser avaliada, os tubérculos refrigerados mostraram maior taxa respiratória depois que foram termostatizados nesta temperatura mais próxima da temperatura fisiológica (20°C).

Com objetivo de verificar se a atividade da PUMP poderia estar envolvida nesse aumento de atividade respiratória, nós analisamos o teor e atividade desta enzima em mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata armazenados a 5±1°C e 25±2°C.

Para se proceder a avaliação da atividade da proteína desacopladora, realizamos dois tipos de experimento, onde mitocôndrias isoladas eram incubadas em meios de reação simulando condições fisiológicas onde a atividade da PUMP pudesse ser avaliada em seu máximo.

O primeiro experimento avaliou atividade da PUMP em relação ao potencial de membrana ($\Delta\Psi$) formado (Figura 18). Como a proteína desacopladora age dissipando o potencial de membrana e o frio aumenta a atividade dessa proteína (Nantes et al., 1999), fornecemos inibidores da PUMP para mitocôndrias isoladas de batatas mantidas a $5\pm 1^\circ\text{C}$ e $25\pm 2^\circ\text{C}$. Na Figura 18 podemos observar que a adição de ATP exerceu efeito maior na linha *b*, referente ao potencial de membrana formado pelas mitocôndrias de batatas armazenadas na câmara fria. Se a PUMP exerceu atividade desacopladora nessas mitocôndrias, ATP, seu inibidor alostérico, exerceu atividade reacopladora, ou seja, inibiu a atividade da PUMP, permitindo que potencial de membrana, antes dissipado, pudesse ser construído. Por essa razão, a fluorescência da safranina diminui após adição de ATP, indicando aumento no potencial de membrana. Da mesma forma, adição de BSA, que age quelando os ácidos graxos, também causou aumento do potencial de membrana formado pelas mitocôndrias, sendo esse efeito maior nas mitocôndrias de batatas refrigeradas. Com a diminuição da disponibilidade de ácidos graxos, a atividade da proteína diminui, resultando em diminuição do desacoplamento. Consequentemente, o potencial de membrana deixa de ser dissipado pela PUMP e um aumento neste potencial pode ser observado. Efeitos maiores de ATP e BSA revelam maior atividade da proteína desacopladora nas batatas submetidas a condições de temperaturas frias. Este fato sugere fortemente que a PUMP é induzida por baixas temperaturas e pode estar exercendo um papel na geração de calor nas batatas armazenadas sob refrigeração.

Em um segundo tipo de experimento, ilustrado pela Figura 19, o consumo de oxigênio por mitocôndrias de batatas refrigeradas ou mantidas à temperatura ambiente foi monitorado em um eletrodo tipo Clark. A essas mitocôndrias isoladas adicionamos LA, substrato da PUMP, e BSA e ATP, seus inibidores. A velocidade de consumo de oxigênio após adição do ativador ou substrato (LA) ou dos inibidores (ATP e BSA) é um outro indicador, além da formação de potencial de membrana, da atividade da PUMP.

Como todas as reações acontecem na presença de BHAM, inibidor da oxidase alternativa, o consumo de oxigênio após adição de seu ativador (LA) menos o consumo de oxigênio após adição de seus inibidores (ATP e BSA), indicam a velocidade da respiração sustentada pela PUMP. Em relação a esta respiração, observamos que o efeito desacoplador do LA foi mais alto em batatas refrigeradas, sendo a velocidade de consumo de oxigênio mais elevada após a adição de LA nas suas respectivas mitocôndrias. As adições subsequentes de 0,5% BSA e 5 mM ATP inibiram a atividade da PUMP e levaram a uma taxa respiratória sustentada apenas por vazamento de prótons (Figura 19, inclinação 3). Neste caso, houve diferença entre a respiração das mitocôndrias de batatas armazenadas nas duas temperaturas. Sob as condições da inclinação 2, o vazamento de prótons é insignificante porque a queda no potencial induzida por LA chega a valores de $\Delta\Psi$ próximos aos valores de respiração do estado 3, induzida por ADP (Almeida et al., 1999a).

Uma vez detectada a atividade da PUMP induzida por baixa temperatura, tanto em termos de formação de $\Delta\Psi$, quanto de oxigênio consumido pelas mitocôndrias isoladas, a imunodeteção nos auxiliou a comprovar que o aumento na atividade desta proteína estava relacionado com o aumento na expressão da mesma. Foram verificadas bandas mais intensas nas mitocôndrias de batatas resfriadas. O maior aumento na expressão da PUMP ocorreu aos 3 dias de armazenamento. É interessante notar que, em tubérculos de batata intactos, a maior taxa respiratória ocorreu um dia após este aumento na expressão da PUMP.

Uma vez que o aumento da expressão da PUMP e sua atividade não se correlacionaram exatamente com as taxas de produção de CO_2 pelos tubérculos intactos durante os dez dias de observação, a capacidade da oxidase alternativa foi medida durante este período.

As taxas de consumo de O_2 apresentadas na Figura 22A, Figura 22B e Figura 22C foram medidas em experimentos tais quais o experimento descrito na Figura 21 (batatas armazenadas por 4 dias). A respiração resistente a cianeto (capacidade da AOX) foi medida após a adição de 2 mM KCN a mitocôndrias isoladas respirando em meio com succinato (mais rotenona) no estado 4 (mais oligomicina) na presença de ativadores

da AOX piruvato e DTT (Figura 21). Esta capacidade foi corrigida para taxas baixas residuais ($1\text{-}2\text{ nmol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$ proteína) de consumo de O_2 depois da adição de 2 mM BHAM. A Figura 22 mostra (A) taxa respiratória total (Figura 21, inclinação 1), (B) capacidade da AOX (Figura 21, inclinação 2 menos inclinação 3), e (C) respiração sensível a cianeto (Figura 21, inclinação 1 menos inclinação 2). A taxa respiratória total foi mais elevada em mitocôndrias isoladas de batatas mantidas sob refrigeração do que nas batatas mantidas à temperatura ambiente durante a maioria do período de armazenamento (Figura 22A). Esse resultado se relaciona aproximadamente com os resultados obtidos com os tubérculos inteiros (Figura 17A). A respiração total diminuiu de 93,7 para 64,6 $\text{nmol O}_2\text{ min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$ proteína durante os primeiros três dias de armazenamento refrigerado. No quarto dia aumentou para 118,5 $\text{nmol O}_2\text{ min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$ proteína e diminuiu lentamente até o final do armazenamento. As maiores taxas de consumo de oxigênio foram atingidas aos quatro dias de armazenamento assim como foi observado para as taxas respiratórias de tubérculos intactos mantidos sob refrigeração. A respiração resistente a cianeto das mitocôndrias isoladas de tubérculos mantidos a $5\pm 1^\circ\text{C}$ foi maior durante todo o período de observação e atingiu valores cerca de 10 vezes maiores do que a de mitocôndrias isoladas de batatas armazenadas à temperatura ambiente (Figura 22B).

A respiração sensível a cianeto em batatas mantidas sob refrigeração foi similar à respiração de mitocôndrias de batatas mantidas à temperatura ambiente (Figura 22C). Este dado está em concordância com as taxas similares de respiração estimulada por FCCP mostrada na Figura 19 e sugere que esta rota respiratória não é a responsável pelas mudanças na taxa respiratória que ocorreu durante o armazenamento refrigerado.

Apesar de termos observado aumento na capacidade da AOX, nós não detectamos esta enzima usando a técnica de *immunoblotting*, mesmo em batatas armazenadas a $5\pm 1^\circ\text{C}$ (Figura 23). A presença de banda no controle positivo (mitocôndrias de tomate verde) comprovou que esta técnica foi empregada com sucesso. No entanto, não detectamos bandas referentes à AOX nas amostras de mitocôndrias de batatas. Esse fato nos impediu de avaliarmos se a expressão da AOX estaria também induzida pelo frio. Holtzapffel et al. (1998), trabalhando com mitocôndrias isoladas de

diversas partes do tomateiro, inclusive de frutos de diferentes maturidades, também não detectaram imunologicamente esta proteína em alguns tecidos onde ela apresentava atividade. Em raízes, folhas e frutos verdes do tomateiro esses autores não detectaram nenhuma banda relativa à AOX. Em frutos vermelhos, no entanto, onde a capacidade da AOX foi superior a $100 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína, uma banda de 35 kD foi detectada. Nos nossos experimentos, a máxima capacidade da AOX detectada foi de somente $42,5 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Outra possível explicação para o fato de não encontrarmos banda quando encontramos atividade enzimática seria que o frio poderia estar causando uma ativação pós-transcricional da proteína ao invés de causar aumento na sua expressão.

Os resultados mostrados para a respiração sensível a cianeto indicam que, provavelmente, a rota dos citocromos não é a responsável pelo aumento da taxa respiratória que ocorreu durante o armazenamento refrigerado. A maior diferença na respiração via citocromos ocorreu no sétimo dia de armazenamento, quando as mitocôndrias de batatas armazenadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ consumiram, pela via sensível a cianeto, 35,6% mais oxigênio que as mitocôndrias de batatas refrigeradas.

6 CONCLUSÕES

6.1 Determinação da taxa respiratória de frutos do tomateiro pela análise em fluxo

O método proposto para a detecção de CO₂ é muito útil para fornecer medidas confiáveis da taxa respiratória de batatas e tomates. A maior vantagem desse método é o baixo custo, uma vez que somente água deionizada é utilizada como reagente. Além disso, os custos para construção de tal sistema são muito mais baixos que os custos requeridos para aquisição de cromatógrafos a gás ou analisadores de gases no infravermelho, normalmente utilizados na detecção de CO₂. O equipamento é de simples construção e o reator pode ser adaptado para avaliar a taxa respiratória de frutos ou hortaliças inteiras, vegetais minimamente processados ou plantas inteiras. Apesar de Pasquini & Faria (1987) mencionarem a dependência da temperatura como principal desvantagem de detetores condutométricos, este problema pode ser contornado com a utilização de condutímetro dotado de compensação de temperatura.

6.2 Indução de proteína desacopladora em tubérculos de batata armazenados sob refrigeração

A refrigeração provoca aumento na expressão e atividade da proteína desacopladora de plantas e esta atividade pode ser verificada tanto *in vitro* como em tubérculos inteiros de batata. A temperatura de 5±1°C estimula a atividade da PUMP em aproximadamente 44%, enquanto a capacidade da AOX aumenta cerca de 10 vezes. As atividades mais altas da PUMP e AOX ocorrem no terceiro e no quarto dia sob refrigeração, respectivamente. A respiração sustentada por ambas as enzimas atinge valores em torno de 40 nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹ proteína. Apesar do estímulo da AOX por

baixa temperatura ser muito mais alto do que aquele observado para a PUMP, a capacidade destas proteínas gerarem calor, julgando-se pelo consumo de oxigênio nos presentes experimentos, parece não ser compatível com um papel termogênico. É possível que o aumento do consumo de oxigênio ocorra por ativação de ambas. Uma vez que o aumento da respiração não está associado a um aumento da temperatura no interior dos tubérculos, esse estímulo pode ser resultante de uma adaptação fisiológica dos tubérculos ao abaixamento da temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅKERMAN, K.E.O.; WIKSTROM, K.E. Safranine as a probe of the mitochondrial membrane potential. **FEBS Letters**, v.68, n.2, p.191-197, 1976.
- ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; KHOMSI, H.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E.; SLUSE, F. Cyanide-resistant, ATP-synthesis-sustained, and uncoupling-protein-sustained respiration during postharvest of tomato fruit. **Plant Physiology**, v.119, p.1323-1329, Apr. 1999a.
- ALMEIDA, F.V.; ALBERICI, R.M.; BRAGA, F.S.; JARDIM, W.F. Contaminação atmosférica num centro cirúrgico por compostos orgânicos voláteis e dióxido de carbono. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v.49, n.3, p.190-195, 1999b.
- ANDREWS, J. The climacteric respiration rise in attached and detached tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.6, p.287-292, 1995.
- ARTÉS, F.; GARCÍA, F.; MARQUINA, J.; CANO, A.; FERNÁNDEZ-TRUJILLO, P. Physiological responses of tomato fruit to cyclic intermittent temperature regimes. **Postharvest Biology and Technology**, v.14, p.283-296, 1998.
- BAHR, J.T.; BONNER JR., W.D. Cyanide-insensitive respiration I. The steady states of skunk cabbage spadix and bean hypocotyl mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v.248, n.10, p.3441-3445, 1973a.

- BAHR, J.T.; BONNER JR., W.D. Cyanide-insensitive respiration II. Control of the alternate pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v.248, n.10, p.3446-3450, 1973b.
- BEAVIS, A.D.; VERCESI, A.E. Anion uniport in plant-mitochondria is mediated by a Mg^{2+} -insensitive inner membrane anion channel. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.5, p.3079-3087, Feb. 1992.
- BOWER, J.H.; JOBLING, J.J.; PATTERSON, B.D.; RYAN, D.J. A method for measuring the respiration rate and respiratory quotient of detached plant tissues. **Postharvest Biology and Technology**, v.13, p.263-270, 1998.
- BRAIDOT, E., PETRUSSA, E., VIANELLO, A., MACRI, F. Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. **FEBS Letters**, v.451, n.3, p.347-350, 1999.
- CHESWORTH, J.M.; STUCHBURY, T.; SCAIFE, J.R. **Agricultural biochemistry**. London: Chapman & Hall, 1998. cap.12, p.161-171: Electron transport and oxidative phosphorylation.
- COSTA, A.D.T.; NANTES, I.L.; JEZEK, P.; LEITE, A.; ARRUDA, P.; VERCESI, A.E. Plant uncoupling mitochondrial protein activity in mitochondria isolated from tomatoes at different stages of ripening. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v.31, p.527-533, 1999.
- DAY, D.A.; WISKICH, J.T. Regulation of alternative oxidase activity in higher-plants. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.27, n.4, p.379-385, Aug. 1995.

- DAY, D.A.; ARRON, G.; LATIES, G. Nature and control of respiratory pathways in plants: the interaction of cyanide-resistant respiration with the cyanide-sensitive pathway. In: SYUMPF, P.K. (Ed.) **The biochemistry of plants**. New York: Academic Press, 1980. v.2, p.197-241.
- DAY, D.A.; MILLAR, A.H.; WISKICH, J.T.; WHELAN, J. Regulation of alternative oxidase activity by pyruvate in soybean mitochondria. **Plant Physiology**, v.106, p.1421-1427, 1994.
- DECKER, M.; TANNER, W. Rapid release of free fatty-acids during cell breakage and their effects on a sugar-proton co-transport system in *Chlorella vulgaris*. **FEBS Letters**, v.60, n.2, p.346-348, 1975.
- DILLEY, D.R.; DEWEY, D.H. Automated system for determining respiratory gas exchange of plant materials. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.94, p.138-141, 1969.
- DIOLEZ, P.; MOREAU, F. Effect of bovine serum albumin on membrane potential in plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.59, n.2, p.177-182, 1983.
- FORCIER, F.; RAGHAVAN, G.S.V.; GARIÉPY, Y. Electronic sensor for the determination of fruit and vegetable respiration. **International Journal of Refrigeration**, v.10, p.353-356, 1987.
- GALLIARD, T. Degradation of acyl lipids: hydrolytic and oxidative enzymes. In: STUMPF, P.K. (Ed.) **The Biochemistry of Plants**. New York: Academic Press Inc., 1980. v.4, p.85-116.

- GARLID, K.D.; JABUREK, M.; JEZEK, P. The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. **FEBS Letters**, v.438, p.10-14, Oct. 1998.
- GARLID, K.D.; OROSZ, D.E.; MODRIANSKÝ, M.; VASSANELLI, S.; JEZEK, P. On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.2615-2620, Feb. 1996.
- GREENBERG, C.S.; CRADDOCK, P.R. Rapid single-step membrane-protein assay. **Clinical Chemistry**, v.28, n.7, p.1725-1726, 1982.
- GROVER, S.D.; LATIES, G.G. Separate loci of inhibition of cyanide resistant respiration by disulfiram and . **Plant Physiology**, v.61, n.4, p.84, 1978.
- GUY, C.L. Cold-acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.41, p.178-223, 1990.
- HEATON, G.M.; WAGENVOORD, R.J.; KEMP, A.; NICHOLLS, D.G. Brown-adipose tissue-mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy-dissipation. **European Journal of Biochemistry**, v.82, n.2, p.515-521, 1978.
- HERMAN, P.; MURTAZA, Z.; LAKOWICZ, J.R. Sensing of carbon dioxide by a decrease in photoinduced electron transfer quenching. **Analytical Biochemistry**, v.272, n.1, p.87-93, 1999.
- HOLTZAPFFEL, R.C.; FINNEGAN, P.M.; MILLAR, A.H.; DUTILH, B.; BADGER, M.R.; DAY, D.A. Purification and properties of mitochondria from tomato. In: MOLLER, I.M.; GARDESTROM, P.; GLIMELIUS, K.; GLASER, E. (Ed.), **Plant mitochondria: from gene to function**. Leiden: Blackhuys Publ., 1998. p.469-473.

- JARDIM, W.F.; PASQUINI, C.; GUIMARÃES, J.R.; FARIA, L.C. Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: monitoring CO₂ production by flow injection analysis. **Water Research**, v.24, n.3, p.351-354, 1990.
- JEZEK P.; ENGSTOVA, H.; ZACKOVA, M.; VERCESI, A.E.; COSTA, A.D.T.; ARRUDA, P.; GARLID, K.D. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1365, n.1-2, p.319-327, June 1998.
- JEZEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Evidence for anion-translocating plant uncoupling mitochondrial protein in potato mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.51, p.32743-32748, Dec. 1996.
- JEZEK, P.; COSTA, A.D.T.; VERCESI, A.E. Reconstituted plant uncoupling mitochondrial protein allows for proton translocation via fatty acid cycling mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.39, p.24272-24278, Sep. 1997.
- KAYS, S.J. **Postharvest physiology of perishable plant products**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. cap.3, p.75-142.
- KNEE, M. Do tomatoes on the plant behave as climacteric fruits? **Physiologia Plantarum**, v.95, p.211-216, 1995.
- KOLESNICHENKO, A.V., ZYKOVA, V.V., GRABELNYCH, O.I., SUMINA, O.N., POBEZHIMOVA, T.P., VOINIKOV, V.K. Screening of mitochondrial proteins in winter rye, winter wheat, elymus and maize with an immunochemical affinity to the stress protein 310 kD and their intramitochondrial localization in the winter wheat. **Journal of Thermal Biology**, v.25, p.245-249, 2000a.

- KOLESNICHENKO, A.V., ZYKOVA, V.V., VOINIKOV, V.K. A comparison of the immunochemical affinity of cytoplasmic, mitochondrial and nuclear proteins of winter rye (*Secale cereale* L.) to a 310 kD stress protein in control plants and during exposure to cold stress. **Journal of Thermal Biology**, v.25, p.203-209, 2000b.
- KOWALTOWSKI, A.J., COSTA, A.D.T., VERCESI, A.E. Activation of the potato uncoupling mitochondrial protein inhibits reactive oxygen species generation by the respiratory chain. **FEBS Letters**, v.425, p.213-216, 1998.
- KRAB, K. Kinetic and regulatory aspects of the function of the alternative oxidase in plant respiration. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.27, n.4, p.387-396, Aug. 1995.
- LALOI, M.; KLEIN, M.; RIESMEIER, J.W.; MÜLLER-RÖBER, B.; FLEURY, C.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. A plant cold-induced uncoupling protein. **Nature**, v.389, n.6647, p.135-136, Sep. 1997.
- LAMBERS, H. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. **Physiologia Plantarum**, v.55, p.478-485, 1982.
- LAMBERS, H. The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher-plants. **Plant Cell Environ.**, v.3, n.5, p.293-302, 1980.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. New York: Worth Publishers, 1993. cap.18, p.542-597: Oxidative phosphorylation and photophosphorylation.
- LIDÉN, A.C.; AKERLUND, H.-E. Induction and activation of the alternative oxidase of potato tuber mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.87, p.134-141, 1993.

- LIMA JÚNIOR, A.R. Via alternativa de transporte de elétrons em mitocôndrias de *Vigna unguiculata* (L.) Walp cv Vita5: modulação pelo pH, pelo piruvato e pelo succinato. Fortaleza, 1999. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Ceará.
- MAHARAJ, R.; ARUL, J.; NADEAU, P. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum*, cv. Capello) by delaying senescence. **Postharvest Biology and Technology**, v.15, n.1, p.13-23, 1999.
- MAIA, I.G.; BENEDETTI, C.E.; LEITE, A.; TURCINELLI, S.R.; VERCESI, A.E.; ARRUDA, P. *AtPUMP*: an *Arabidopsis* gene encoding a plant uncoupling mitochondrial protein. **FEBS Letters**, v.429, n.3, p.403-406, June 1998.
- MCINTOSH, L. Molecular-biology of the alternative oxidase. **Plant Physiology**, v.105, p.781-786, 1994.
- MEIR, S.; RUBIN, L.; ZAUBERMAN, G.; FUCHS, Y. Changes in fluorescent lipid peroxidation products of room-ripened and vine-ripened tomato fruits in relation to other ripening parameters. **Postharvest Biology and Technology**, v.2, n.2, p.125-135, 1992.
- MILLAR, A.H.; WISKICH, J.T.; WHELAN, J.; DAY, D.A. Organic-acid activation of the alternative oxidase of plant-mitochondria. **FEBS Letters**, v.329, p.259-262, 1993.
- MOORE, A.L.; UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Structure-function relationships of the alternative oxidase of plant mitochondria: a model of the active site. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.27, p.367-377, 1995.

- NANTES, I.L.; FAGIAN, M.M.; CATISTI, R.; ARRUDA, P.; MAIA, I.G.; VERCESI, A.E. Low temperature and aging-promoted expression of PUMP in potato tuber mitochondria. **FEBS Letters**, v.457, n.1, p.103-106, 1999.
- NICHOLLS, D.G. Brown adipose tissue mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.549, n.1, p.1-29, 1979.
- NICHOLLS, D.G.; FERGUSON, S.J. **Bioenergetics**. London: Academic Press Inc., 1982.
- NICHOLLS, D.G.; LOCKE, R.M. Thermogenic mechanisms in brown fat. **Physiological Review**, v.64, n.1, p.1-64, 1984.
- OELLER, P.W.; WONG, M.L.; TAYLOR, L.P.; PIKE, D.A.; THEOLOGIS, A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. **Science**, v.254, n.5030, p.437-439, Oct. 1991.
- PARRISH, D.J.; LEOPOLD, A.C. Confounding of alternative respiration by lipooxygenase activity. **Plant Physiology**, v.62, n.3, p.470-472, 1978.
- PARSONS, H.L., YIP, J.Y.H., VANLERBERGE, G.C. Increased respiratory restriction during phosphate-limited growth in transgenic tobacco cells lacking alternative oxidase. **Plant Physiology**, v.121, n.4, p.1309-1320, 1999.
- PASQUINI, C.; FARIA, L.C. Flow-injection determination of ammonia in Kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry. **Analytica Chimica Acta**, v.193, p.19-27, 1987.

- PASTORE, D.; FRATIANNI, A.; DI PEDE, S.; PASSARELLA, S. Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. **FEBS Letters**, v.470, p.88-92, 2000.
- PHARR, D.M.; KATTAN, A.A. Effects of air flow rate, storage temperature, and harvested maturity on respiration and ripening of tomato fruits. **Plant Physiology**, v.48, p.53-55, 1971.
- PIECHULLA, B.; GLICK, R.E.; BAHL, H.; MELIS, A.; GRUISSEM, W. Changes in the photosynthetic capacity and photosynthetic protein pattern during tomato fruit ripening. **Plant Physiology**, v.84, n.3, p.911-917, 1987.
- PIERGIOVANNI, L.; FAVA, P.; CERIANI, S. A simplified procedure to determine the respiration rate of minimally processed vegetables in flexible permeable packaging. **Italian Journal of Food Science**, v.11, p.99-110, 1999.
- POPOV, V.N.; SIMONIAN, R.A.; SKULACHEV, V.P.; STARKOV, A.A. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H_2O_2 production in plant mitochondria. **FEBS Letters**, v.415, n.1, p.87-90, 1997.
- PURVIS, A.C. Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. **Physiologia Plantarum**, v.100, n.1, p.165-170, 1997.
- SALISBURY, F.K.; ROSS, C.L. **Plant physiology**. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. cap.13, p.266-288: Respiration.
- SALTVEIT JR, M.E. Internal carbon dioxide and ethylene levels in ripening tomato fruit attached to or detached from the plant. **Physiologia Plantarum**, v.89, p.204-210, 1993.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide: basics**. 5. ed. Cary, 1990.

SCHONBAUM, G.R.; BONNER JR., W.D.; STOREY, B.T.; BAHR J.T. Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hidroxicamic acids. **Plant Physiology**, v.47, p.124, 1971.

SIEDOW, J.N.; GIRVIN, M.E. Alternative respiratory pathway - its role in seed respiration and its inhibition by propyl gallate. **Plant Physiology**, v.65, n.4, p.669-674, 1980.

SILVA, M.A.P. Características do transporte de cálcio, fosfato e prótons em mitocôndrias de plantas. Campinas, 1991. 185p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J. Aqueous-solution chemistry. analytical chemistry: an introduction. Orlando: Sauders College Publ., p.108, 1990.

SKULACHEV, V.P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Letters**, v, 294, p.158-162, 1991.

SLUSE, F.E.; ALMEIDA, A.M.; JARMUSZKIEWICZ, W.; VERCESI, A.E. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. **FEBS Letters**, v.433, n.3, p.237-240, Aug. 1998.

SLUSE, F.E.; JARMUSZKIEWICZ, W. Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, n.6, p.733-747, Jun 1998.

- SOLOMOS, T.; LATIES, G.G. Induction by ethylene of cyanide-resistant respiration. **Biochim. Bioph. Res. Comm.**, v.70, n.2, p.663-671, 1976.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. Redwood City: The Benjamin/Cummins Publishing Company, 1991. cap.11, p.265-291: Respiration and lipid metabolism.
- UMBACH, A.L.; SIEDOW, J.N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher-plant mitochondria and their relationship to enzyme-activity. **Plant Physiology**, v.103, p.845-854, 1993.
- UMBACH, A.L., WISKICH, J.T., SIEDOW, J.N. Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. **FEBS Letters**, v.348, p.181-184, 1994.
- VAN DEN BERGEN, C.W.M.; WAGNER A.M.; KRAB, K.; MOORE, A.L. The relationship between electron flux and the redox poise of the quinone pool in plant mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v.226, p.1071-1078, 1994.
- VANLERBERGHE, G.C.; MCINTOSH, L. Alternative oxidase: from gene to function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.48, p.703-734, 1997.
- VERCESI, A.E.; MARTINS, I.S.; SILVA, M.A.P.; LEITE, H.M.F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**, v.375, n.6526, p.24, May 1995.
- WAGNER, A.M.; MOORE, A L. Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defense mechanism. **Bioscience Report**, v.17, p.319-333, 1997.

WAREHAM, P.D.; PERSAUD, K.C. On-line analysis of sample atmospheres using membrane inlet mass spectrometry as a method of monitoring vegetable respiration rate. **Analytica Chimica Acta**, v.394, p.43-54, 1999.

WHELAN, J. Hot PUMPing plants? **Nature**, v.376, p.220, 1996.

WILLS, R.; MCGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. **Postharvest: an introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals**. Sydney: University of New South Wales Press, 1998. p.254-256.