UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO EM
PLANTAS: ESTUDO COM SUPOSTOS PRECURSORES**

ANDERSON DEMÉTRIO BARATA SOARES

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

**Orientador:
Prof. Dr. Franco Maria Lajolo**

**São Paulo
2001**

ANDERSON DEMÉTRIO BARATA SOARES

**BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO EM PLANTAS:
ESTUDO COM SUPOSTOS PRECURSORES**

Comissão Julgadora

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Prof. Tit. Dr. Franco Maria Lajolo/Presidente

Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Prof. Dr. Carlos Henrique Mesquita

Profa. Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi

Prof. Dr. João Roberto de Oliveira Nascimento

São Paulo, 21 de agosto de 2001.

O CREDO DA CIÊNCIA

Meu caro amigo. Recebi tuas felicitações — muito obrigado.
Atingi o “vértice da pirâmide” — dizes.
Enchi de mil conhecimentos o espírito — é verdade.
Cinge-me a fronte o laurel de doutor — sou acadêmico.
Entretanto — não me iludo...
Quase todo o humano saber — é crer...
Nossa ciência — é fé.
Creio no testemunho dos historiadores — porque não presenciei o que referem.
Creio na palavra dos químicos e físicos — porque admito que não se tenham enganado nem me queiram enganar.
Creio na autoridade dos matemáticos e astrônomos — porque não sei medir uma só das distâncias e trajetórias siderais.
Tenho de crer em quase todas as teses e hipóteses da ciência — porque ultrapassam os horizontes da minha capacidade de compreensão.
Creio até nas coisas mais quotidianas — na matéria e na força que me circundam...
Creio em moléculas e átomos, em elétrons e prótons — que nunca vi...
Creio nas emanções do rádio e nas partículas do hélio — enigmas ultramicroscópicos.
Creio no magnetismo e na eletricidade — esses mistérios de cada dia.
Creio na gravitação dos corpos sidéreos — cuja natureza ignoro.
Creio no princípio vital da planta e do animal — que ninguém sabe definir.
Creio na própria alma — esse mistério dentro do Eu.
Não te admires, meu amigo, de que eu, formado em ciências naturais, creia piamente em tudo isto...
Admira-te antes de que haja quem afirme só admitir o que compreende — depois de tantos atos de fé quotidiana.
O que me espanta é que homens que vivem de atos de crença descreiam de Deus — “por motivos científicos”.
Homem! tu, que não compreendes o artefato — pretendes compreender o Artífice?
Que Deus seria esse que em tua inteligência coubesse?
Um mar que coubesse numa concha de molusco — ainda seria mar?
Um universo encerrado num dedal — que nome mereceria?
O Infinito circunscrito pelo finito — seria Infinito?
Convence-te, ó homem, desta verdade: só há duas categorias de seres que estão dispensados de crer: — os da meia-noite — e os do meio-dia...
As trevas noturnas do irracional — e a luz meridiana da Divindade...
O insciente — e o onisciente...
Aquele, por incapacidade absoluta — este, por absoluta perfeição...
O que oscila entre a treva total do insciente e a luz integral do onisciente — deve crer...
Deve crer, porque a fé se move nesse mundo crepuscular, equidistante do vácuo e da plenitude, da meia-noite e do meio-dia...

(Huberto Rohden, De Alma para Alma)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por permitir que eu terminasse esse trabalho quase pioneiro em sua essência....pois tive que “rebolar” para me adaptar ao novo ambiente de trabalho. A meu pais, meus familiares e todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram com palavras e gestos.

Agradeço de forma muito especial ao Prof. Franco Lajolo, que soube me orientar sem que me faltasse absolutamente nada materialmente, e deixando que desenvolvesse minhas idéias apenas corrigindo alguns rumos errados... Muito especial como o Prof. Dr. Carlos Henrique Mesquita, que foi meu “co-orientador” na finalização desse trabalho...obrigadíssimo!

À professora Dra. Beatriz Rosana Cordenunsi, que em muitos momentos me auxiliou nas discussões de alguns resultados e que também num esforço muito grande conseguiu alguns dos reagentes que foram fundamentais para o término desse trabalho. Ao Professor Dr. João Roberto de Oliveira Nascimento, que, quando cheguei era um aluno, e quando saí já era professor pesquisador da melhor universidade do país, pelas suas oportunas intervenções e sugestões na correção final da tese.

Ao meu amigo estrangeiro e quase brasileiro, Dr. Guillermo Daniel Manrique, pelo sensacional companheirismo nas discussões de resultados, de moradia, de muitos cafezinhos, de muitas corridas pelo campus e que soube me dizer palavras de conforto quando necessário. Um obrigado as professoras Elizabete e, em especial, Inês, que muito me ajudou no início desse trabalho. Aos meus colegas Tânia, Ana Paula, Malu, Stella, Marisa, Jacqueline, Eduardo, Adair, Renata, Rosecler e Priscila, pessoas que também souberam dar sua parcela importante de contribuição nesse trabalho. Um obrigado especial à minha amiga Lúcia...

E, como não poderia deixar de citar, meu amigo inseparável de almoço e muitas conversas, Alberto. Pela sua camaradagem em todas as etapas desse trabalho e, que, mesmo eu estando longe do laboratório, deu continuidade à pesquisa em meu lugar de maneira altamente profissional. A minha segunda mãe, vovó Márcia, que não tenho palavras para definir sua amizade.

Finalmente, a todos que passaram pela minha vida nesses longos quatro anos de estadia em São Paulo. Pessoas que já estavam nela...e que já não fazem parte dela...que me fizeram feliz...que me fizeram infeliz por vezes...

E, por último mas não menos importante, ao programa PICDT da CAPES, pela bolsa concedida e a todos os funcionários da UEMG, em especial, ao Professor Dr. Antônio Carlos Teixeira Freire. Obrigado à todos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 . QUÍMICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO	4
2.2 . BIOSÍNTESE EM ANIMAIS	5
2.3. FUNÇÕES DO AA EM PLANTAS.....	7
2.3.1. ANTIOXIDANTE.....	7
2.3.2. COFATOR DE ENZIMAS.....	8
2.3.3. TRANSPORTE DE ELÉTRONS	9
2.3.4. SÍNTESE DE OXALATO E TARTARATO	9
2.4. BIOSÍNTESE DO AA EM PLANTAS	10
3. OBJETIVO	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1. MATERIAL	19
4.2. MÉTODOS.....	19
4.2.1. REAGENTES UTILIZADOS	19
4.2.2. INFILTRAÇÃO DOS PRECURSORES FRIOS.....	20
4.2.3. INFILTRAÇÃO DE PRECURSORES MARCADOS COM ^{14}C	20
4.2.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AA PELO MÉTODO DO MOLIBDATO DE AMÔNIO	21
4.2.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AA PELO MÉTODO DA ASCORBATO OXIDASE	21
4.2.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AA TOTAL, AA E ADA POR HPLC.....	22

4.2.7. MÉTODO DE EXTRAÇÃO E COLETA DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS MARCADOS COM ^{14}C	22
4.2.8. COLETA DE FRAÇÕES DOS PRECURSORES MARCADOS COM ^{14}C E LEITURA NO CINTILADOR LÍQUIDO (LSC)	23
4.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1. TEOR DE AA EM VEGETAIS PELO MÉTODO DO MOLIBDATO DE AMÔNIO E DA ASCORBATO OXIDASE	24
5.2. TEORES DE AA TOTAL, AA E ADA EM VEGETAIS POR HPLC.....	26
5.3. CONVERSÃO DE D-[U- ^{14}C] MANOSE, D-[U- ^{14}C]GLICOSE-1-P E L-[1- ^{14}C] GALACTOSE EM AA	41
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
8. RESUMO	62
9. ABSTRACT	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Enzimas dependentes do AA para atividade máxima.....	13
Tabela 2: Porcentagem de conversão de D-[U- ¹⁴ C] Manose e L-[1- ¹⁴ C] Galactose em AA em morangos no estágio verde de amadurecimento após 24 e 48 h.....	44
Tabela 3: Porcentagem de conversão de D-[U- ¹⁴ C] manose e L-[1- ¹⁴ C] galactose em AA em brócolis após 24 h.....	45
Tabela 4: Porcentagem de conversão de L-[1- ¹⁴ C] galactose em AA em mamão no estágio maduro ¹ de amadurecimento após diferentes tempos de incubação.....	46
Tabela 5: Porcentagem de conversão de D-[U- ¹⁴ C] manose, L-[1- ¹⁴ C] galactose e D-[U- ¹⁴ C] glicose-1-P em AA em mamão no estágio verde ¹ de amadurecimento após 24 h.....	47
Tabela 6: Porcentagem de conversão de D-[U- ¹⁴ C] manose, L-[1- ¹⁴ C] galactose e D-[U- ¹⁴ C] glicose-1-P em AA em goiaba de polpa vermelha no estágio verde ¹ de amadurecimento após 24 h.....	47
Tabela 7: Porcentagem de conversão de D-[U- ¹⁴ C] manose, L-[1- ¹⁴ C] galactose e D-[U- ¹⁴ C] glicose-1-P em açúcares em goiabas de polpa vermelha no estágio verde ¹ de amadurecimento após 24 h.....	48
Tabela 8: Porcentagem de conversão de D-[U- ¹⁴ C] manose, L-[1- ¹⁴ C] galactose e D-[U- ¹⁴ C] glicose-1-P em açúcares em mamão no estágio verde ¹ de amadurecimento após 24 h.....	49
Tabela 9: Porcentagem de conversão de D-[U- ¹⁴ C] manose, L-[1- ¹⁴ C] galactose em açúcares em brócolis após 24 h.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas isoméricas do AA.....	11
Figura 2: Biossíntese do AA em animais.....	13
Figura 3: Esquemas propostos de biossíntese do AA à partir da D-glicose e da D-galactose com inversão da cadeia carbônica.....	18
Figura 4: Esquema de biossíntese do AA incluindo osonas como precursores.....	20
Figura 5. Esquema de biossíntese do AA incluindo a GDP-D-manose e a L-galactose como precursores.....	22
Figura 6: Conteúdo de AA total em morangos pelo método do molibdato de amônio. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; D-GAL; D-galactono-1,4-lactona; L-GUL, L-gulono-1,4-lactona; D-GUL, D-gulono-1,4-lactona; D-GALAC, D-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta.....	31
Figura 7. Conteúdo de AA em morangos pelo método da ascorbato oxidase. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; D-GAL; D-galactono-1,4-lactona; L-GUL, L-gulono-1,4-lactona; D-GUL, D-gulono-1,4-lactona; D-GALAC, D-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta.....	32
Figura 8: Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de pimentão verde após 24h. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; D-GALAC, D-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta.....	33

Figura 9: Conteúdo de AA total, AA e ADA em folhas de goiabeira (goiabas com polpa vermelha) após 24h. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; ; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta.....34

Figura 10: Conteúdo de AA total, AA e ADA em folhas de goiabeira (goiabas com polpa branca) após 24h. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta.....35

Figura 11: Conteúdo de AA total, AA e ADA em brócolis após 24h. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta.....36

Figura 12: Conteúdo de AA total, AA e ADA em mamão no estágio verde de amadurecimento após 24h. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta. O estágio verde foi definido com base na cor verde da casca sem manchas amarelas e polpa branca.....37

Figura 13: Conteúdo de AA total, AA e ADA em mamão no estágio maduro de amadurecimento após 24h. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta. O estágio maduro foi definido com base na cor amarela da casca e da polpa.....38

Figura 14. Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de goiaba de polpa branca estágio verde de amadurecimento após 24h à temperatura ambiente. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a

coleta (n = 3). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor verde da casca.....39

Figura 15. Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de goiaba de polpa branca estágio verde de amadurecimento após 24h à temperatura de 6 °C. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta (n = 3). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor verde da casca.....40

Figura 16. Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de goiaba de polpa vermelha estágio verde de amadurecimento após 24h à temperatura ambiente. L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta (n = 3). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor verde da casca.....41

Figura 17: Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio verde de amadurecimento após 24h (Ensaio 1). L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta (n = 4). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor branca do morango sem manchas vermelhas.....42

Figura 18: Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio verde de amadurecimento após 24h (Ensaio 2). L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta (n = 4). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor branca do morango sem manchas vermelhas.....43

Figura 19: Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio médio de amadurecimento após 24h (Ensaio 1). L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta (n = 4). O estágio médio de amadurecimento foi definido com base na cor branca do morango com manchas vermelhas.....44

Figura 20: Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio médio de amadurecimento após 24h (Ensaio 2). L-GAL, L-galactono-1,4-lactona; L-GALAC, L-galactose; D-MAN, D-manose; Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta (n = 4).....45

Figura 21: Controle de eficiência de contagem do cintilador líquido.....46

BIOSSÍNTESE DE ÁCIDO L-ASCÓRBICO EM PLANTAS: ESTUDO COM SUPOSTOS PRECURSORES

1. INTRODUÇÃO

A estrutura do ácido L-ascórbico (AA), nome comum do L-*threo*-hex-2-enono-1,4-lactona, consiste em uma aldono-1,4-lactona com seis carbonos com um grupo cetônico numa configuração enediol tautomérica. Sua importância nutricional se reflete em seu nome mais conhecido, vitamina C, pois seres humanos, certos insetos, peixes, aves e alguns outros mamíferos, são incapazes de sintetizá-la. Sua função principal nos animais reside no fato de ser necessário para a síntese de colágeno, que dá sustentação a pele, e também é um importante antioxidante. Ele é encontrado em todos os tipos de plantas superiores e em algumas classes de algas. Embora, sua biossíntese em animais já tenha sido elucidada, muitos aspectos de sua biossíntese e metabolismo em plantas ainda são obscuros e merecem ser melhor estudados (Loewus, 1999).

O AA encontra-se distribuído em diferentes partes da célula vegetal, tais como o citosol, cloroplasto, apoplasto e na mitocôndria onde é sintetizado com o auxílio da enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase que converte a L-galactono-1,4-lactona em AA. Esta lactona é apontada como o precursor imediato do AA na maioria dos mecanismos propostos para sua biossíntese (Siendones *et al.*, 1999). Entre as muitas funções que são atribuídas ao AA em vegetais, pode-se destacar: sistemas de fotossíntese e fotoproteção, transporte de elétrons entre membranas, seqüestramento de radicais livres, expansão celular, crescimento da parede celular, resistência ao estresse causado pelo meio ambiente e síntese do etileno, giberelinas, antocianinas e hidroxiprolina (Smirnoff e Wheeler, 2000).

A elucidação do mecanismo de biossíntese em plantas é um campo de pesquisa aberto. Trabalhos prévios confirmaram a conversão de uma hexose em AA

em plantas. (Ray, 1934; Loewus, 1963). A biossíntese em animais também ocorre à partir de uma hexose, e o mecanismo foi descoberto ainda na década de 50, quando foi demonstrado que em animais ocorria a conversão de D-glicuronato em L-gulono-1,4-lactona, a qual era imediatamente oxidada à ascorbato com inversão da cadeia carbônica da D-glicose, que era o precursor primário (Burns, 1967).

Loewus *et al.* (1956) mostraram que a D-glicose é convertida em AA sem inversão da cadeia de carbono, mantém o grupo hidroximetila no C6 do AA, envolve uma epimerização no C5, e requer a oxidação do C1 e do C2 (ou do C3). Um dos esquemas propostos, envolve a conversão da D-glicose em D-glicosona e L-sorbose a qual seria o precursor imediato do ácido L-ascórbico (Loewus, 1988; Loewus *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1990). Entretanto, o fato da L-galactono-1,4-lactona ser efetivamente oxidada a AA em plantas frustrou esse esquema proposto (Isherwood *et al.*, 1954; Jackson *et al.*, 1961; Baig *et al.*, 1970), pois um mecanismo análogo aquele proposto para a biossíntese em animais, envolve a conversão de derivados do ácido D-galacturônico em AA, via inversão da cadeia carbônica da D-glicose e formação de L-galactono-1,4-lactona (Isherwood e Mapson, 1962; Mapson e Isherwood, 1956).

Existem fortes evidências de que a L-galactono-1,4-lactona está presente naturalmente em extratos de plantas que, quando submetidos à ação da enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase, resulta um aumento na síntese de AA (Ostergaard *et al.*, 1997).

Um novo esquema de biossíntese proposto por Wheeler *et al.* (1998), acomoda todos os requerimentos necessários para a conversão de glicose em AA sem inversão da cadeia carbônica, e propõe a D-manose e a L-galactose como precursores intermediários do AA cujo precursor primário seria a D-glicose-6-P. Entretanto, algumas enzimas envolvidas nesse complexo de reações ainda não foram completamente identificadas.

Os mecanismos e enzimas envolvidas na oxidação do AA e redução dos produtos monodesidroascorbato e ácido desidroascórbico (ADA) são melhor compreendidos do que a biossíntese do AA. As enzimas ascorbato oxidase (AO) e ascorbato peroxidase (AP) catalisam a oxidação do ácido ascórbico a monodesidroascorbato, o qual se converte em ADA e AA se não sofrer redução imediata. Por sua vez, o ADA é instável em pH superior a 7,0 e é convertido irreversivelmente em ácido dicetogulônico, que não possui mais atividade vitamínica (Loewus, 1988). Em condições normais, o AA é mantido no estado reduzido (90%) pela ação das enzimas monodesidroascorbato redutase-NAD(P) dependente [MDAR-NAD(P)] e desidroascorbato redutase-glutationa dependente (ADAR-GSH). Estas enzimas, em conjunto com a glutatona redutase, constituem o ciclo AA-glutationa, responsável pelo sistema de defesa das plantas (Pallanca e Smirnoff, 1999).

Evidências genéticas do mecanismo de biossíntese do AA em plantas tem sido estudadas em plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Conklin *et al.*, 1999) que são deficientes em AA. Essa deficiência seria causada pela redução de 35% na quantidade da enzima manose-1-P guaniltransferase, em relação às plantas não mutantes. Essa enzima converte a D-manose-1-P em GDP-D-manose, segundo o esquema de biossíntese do AA proposto por Wheeler *et al.* (1998), e participa também na biossíntese de carboidratos da parede celular e na glicosilação de proteínas em eucariotos (Smirnoff e Wheeler, 2000).

O objetivo deste trabalho foi estudar a via de biossíntese do AA em plantas através da infiltração de supostos precursores em diversos tecidos vegetais, utilizando-se de compostos marcados e não-marcados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 . QUÍMICA DO ÁCIDO ASCÓRBICO

O nome comum ácido ascórbico, atribuído por Szent-Györgyi e Haworth em 1933, é a designação de um par enantiomérico de isômeros diastereoméricos da *threo*-hex-2-enono-1,4-lactona. O outro par enantiomérico, chamado *erythro*-hex-2-enono-1,4-lactona, também é conhecido como ácido araboascórbico, ácido isoascórbico ou ácido eritórbico (como mostrado na figura). Na literatura das décadas de 1930 e 1940, ácidos D- e L-xiloascórbico eram usados como sinônimos dos ácidos D- e L-ascórbico, enquanto que ácidos D- e L-araboascórbico eram sinônimos dos ácidos D- e L-isoascórbico (Loewus, 1980).

Na forma cristalina ou em solução tampão com pH 2, a principal forma tautomérica, como determinada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, têm uma estrutura monocíclica (Figura 1) comumente atribuída ao AA na literatura. Sua acidez está associada com o próton do carbono 3 devido ao sistema conjugado $O1=C1-C2=C3-O3$ no anel. A oxidação do AA ocorre em duas fases: primeiro é formado o ácido monodesidroascórbico e então o ácido desidroascórbico, sendo que ambos tem estrutura bicíclica devido a formação de um anel furanosídico que envolve a cadeia lateral (Loewus, 1988).

Figura 1: Estruturas isoméricas do AA (Moser e Bendich, 1991).

Segundo Loewus (1988), o termo ácido desidroascórbico é enganoso pois sugere a existência de uma função acídica onde, de fato, ela não existe. O ADA é altamente instável em solução aquosa e, provavelmente, a primeira etapa de sua degradação é sua conversão em ácido 2,3 dicetogulônico e, em seguida, ácido treônico que ocupa um papel intermediário na síntese de ácido tartárico ou oxálico em plantas (Helsper e Loewus, 1982; 1985).

O AA é mantido no estado reduzido pela ação das enzimas monodesidroascorbato redutase (EC 1.6.5.4) e desidroascorbato redutase glutathione-dependente (EC 1.8.5.1). Somente uma quantidade limitada do ácido ascórbico é metabolizada e convertida em ácido desidroascórbico (ADA) e ácido 2,3-diceto-L-gulônico, o qual pode ser descarboxilado em CO₂ e produtos do ciclo pentose-fosfato (Loewus, 1988).

A síntese química do AA ocorre à partir da D-glicose a qual é convertida em D-sorbitol e, em seguida, L-sorbose. As reações de degradação do AA em solução aquosa dependem de vários fatores como o pH (apresenta melhor estabilidade entre 4 e 6), temperatura, e também da presença de oxigênio ou metais como o cobre (Moser e Bendich, 1991).

2.2 . BIOSÍNTESE EM ANIMAIS

Em animais o AA é sintetizado no fígado ou nos rins pela conversão da D-glicose em AA, com a presença da enzima L-gulonono-1,4-lactona oxidase (E. C. 1.1.3.8). Esta enzima é localizada nos microsossomos e foi isolada e caracterizada à partir de extratos de células de ratos, cabras e galinhas (Ostergaard *et al.*, 1997), e não está presente em alguns animais inclusive o homem (Moser e Bendich, 1991). O esquema de sua síntese em animais é mostrado na Figura 2.

Figura 2: Biossíntese do AA em animais (Moser & Bendich, 1991).

2.3. FUNÇÕES DO AA EM PLANTAS

O efeito protetor do AA contra as espécies ativas de oxigênio (EAO) depende de sua distribuição sub-celular, que está relacionada com o local de síntese do AA, com sua translocação intra-celular e com o local onde o AA pode ser regenerado a partir do ADA (Rautenkranz *et al.*, 1994). Provavelmente, a síntese do AA ocorre no citosol (Loewus, 1980) e é então translocado para o cloroplasto, vacúolo e para o apoplasto. A regeneração do AA à partir do ADA ocorre no citosol pela ação de enzimas específicas, e de modo não enzimático no cloroplasto tendo a glutathione como agente redutor, e a glutathione redutase para a regeneração da glutathione (Foyer e Halliwell, 1976).

O AA é o principal componente do sistema de defesa das plantas contra os radicais livres, o H_2O_2 , e o estresse oxidativo. As funções bioquímicas do AA podem ser divididas em quatro tipos segundo Smirnoff (1996).

2.3.1. ANTIOXIDANTE

O AA protege as células das plantas dos danos causados pelas EAO: superóxido, oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio, que podem ser criados durante o metabolismo aeróbio, e também pela exposição a alguns poluentes, herbicidas e ao ozônio. As EAO podem ser diretamente eliminadas pelo AA, ou podem causar a produção de peróxido de hidrogênio, o qual é eliminado pelo AA na presença da ascorbato peroxidase segundo o esquema abaixo (Moser e Bendich, 1991):

Segundo Smirnoff e Wheeler (2000), as EAO geradas pelo metabolismo aeróbio podem rapidamente oxidar proteínas, ácidos graxos insaturados e o DNA, resultando em disfunções nas células. Duas moléculas de monodesidroascorbato podem resultar em uma molécula de desidroascorbato e uma de ascorbato. Para conservar o pool de ascorbato intacto, um sistema enzimático envolvendo a glutathione reduz o monodesidroascorbato e o desidroascorbato a AA.

Também foi proposto uma ação antioxidante do AA na redução do α -tocoferol, o qual é oxidado como resultado de sua ação protetora dos lípidos da membrana celular de uma possível peroxidação (Suarna e Southwell-Keelly, 1991).

2.3.2. COFATOR DE ENZIMAS

O AA está envolvido no metabolismo de diversos aminoácidos que levam à síntese da hidroxiprolina, hidroxilisina, noradrenalina, serotonina, ácido homogentísico e a carnitina. Hidroxiprolina e hidroxilisina são constituintes do colágeno que é a principal proteína do tecido conectivo fibroso em animais (Davies *et al.*, 1991), e está envolvido na síntese de extensinas em plantas (Smirnoff, 1996).

Está bem estabelecido que se faz necessária a presença do oxigênio na biossíntese do AA conforme mostrado por estudos enzimáticos realizados por Isherwood e Mapson (1962) nos quais a exclusão do oxigênio reduziu a biossíntese do AA nos sistemas utilizados.

O AA também é requerido pela enzima formadora de etileno na síntese do etileno (Smith *et al.*, 1992), e é necessário para a atividade ótima de várias enzimas envolvidas em reações de hidroxilação, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Enzimas dependentes do AA para atividade máxima

Enzima	Função
prolina hidroxilase (EC 1.14.11.2)	<i>trans</i> -4-hidroxilação da prolina na biossíntese do pró-colágeno
pró-colágeno-prolina 2-oxoglutarato 3-desoxigenase (EC 1.14.11.7)	<i>trans</i> -3-hidroxilação da prolina na biossíntese do pró-colágeno
lisina hidroxilase (EC 1.14.11.4)	5-hidroxilação da lisina na biossíntese do pró-colágeno
gama-butirotetaina, 2-oxoglutarato 4-desoxigenase (EC 1.14.11.1)	Hidroxilação de um precursor da carnitina
trimetil-lisina-2-oxoglutarato desoxigenase (EC 1.14.11.8)	Hidroxilação de um precursor da carnitina
dopamina β -mono-oxigenase (EC 1.14.17.1)	β -hidroxilação da dopamina na biossíntese da norepinefrina

MOSER & BENDICH (1991)

2.3.3. TRANSPORTE DE ELÉTRONS

A habilidade do AA em doar elétrons é importante no ciclo respiratório das plantas durante a fotossíntese. Ele é acumulado em tecidos fotossintéticos protegendo o cloroplasto contra os danos causados pelas EAO. O ácido monodesidroascórbico pode atuar como um aceptor de elétrons na parede celular estimulando, assim, o crescimento da planta (Smirnoff, 1996).

2.3.4. SÍNTESE DE OXALATO E TARTARATO

Embora pouco se saiba a respeito das funções e do metabolismo do AA em plantas, pode-se afirmar com certeza que ele é um precursor dos ácidos oxálico e tartárico. As plantas que acumulam ácido oxálico quebram a molécula de AA entre os carbonos C-2 e C-3 para formar o ácido oxálico e o ácido treônico, o qual sofre

descarboxilação resultando em um ácido com 3 carbonos, que é reciclado no metabolismo hexose-fosfato. De outro modo, o ácido treônico pode ser oxidado a ácido tartárico (Loewus, 1999).

Estudos realizados com a planta *Pistia stratiotes*, mostraram que o AA e a L-galactose são precursores do ácido oxálico e de cristais de oxalato de cálcio, sendo que o AA é precursor do ácido oxálico mais eficiente do que o glicolato (Keates *et al.*, 2000). A conversão dos carbonos 1 e 2 do AA em ácido oxálico ocorre nos idioblastos cristalinos (Kostman *et al.*, 2001), os quais são vacúolos especializados em sequestrar o cálcio presente em excesso no ambiente celular e armazenar na forma de oxalato de cálcio (Libert e Franceschi, 1987).

2.4. BIOSÍNTESE DO AA EM PLANTAS

Todos os trabalhos à respeito da biossíntese do AA em plantas partem do princípio geral de que é uma hexose, fosforilada ou não, a origem primária do AA. As evidências que comprovam esta tese estão nos vários trabalhos desenvolvidos por Frank A. Loewus e colaboradores durante décadas (Loewus, 1999). Seus trabalhos mostraram que a conversão de D-glicose em AA se procede sem inversão da cadeia carbônica da glicose, isto é, o C-1 da glicose resulta no C-1 do AA.

Em animais, a confirmação de que a conversão de D-glicose em AA *via* inversão da cadeia carbônica da glicose, deu-se com os trabalhos de Horowitz *et al.*, (1952), Horowitz e King (1953) e Loewus *et al.*, (1960). Nestes trabalhos, o AA sintetizado à partir da glicose marcada no C-1 ou no C-6, apresentava esse carbono marcado no C-6 ou no C-1, respectivamente. O esquema proposto à partir desses estudos é mostrado na Figura 3 superior.

Estudos realizados com L-Gulono-1,4-lactona marcada (Loewus, 1963; Baig *et al.*, 1970) mostraram que essa lactona é convertida diretamente em AA sem

quebra ou inversão da cadeia carbônica. Uma alternativa seria a existência de uma epimerase que pudesse catalisar a interconversão de L-Gulono-1,4-lactona em L-Galactono-1,4-lactona.

Figura 3: Esquemas propostos de biossíntese do AA à partir da D-glicose e da D-galactose com inversão da cadeia carbônica (Loewus, 1999).

Neste esquema, a D-glicose é oxidada no C-6 a ácido D-glicurônico, o qual sofre redução no C-1 a ácido L-gulônico. Após a lactonização e oxidação do ácido L-gulônico resulta o AA com inversão da cadeia carbônica da glicose. O esquema inferior da Figura 3, foi proposto por Isherwood *et al.*, (1954), sendo que nesse estudo, não foram utilizados compostos marcados. Trabalhos posteriores onde D-[1-¹⁴C] glicose foi administrada a outras espécies de plantas incluindo agrião, salsa e gerânio, confirmaram estas observações (Loewus e Jang, 1957; Williams e Loewus, 1978; Helsper *et al.*, 1981).

Estudos foram realizados com a finalidade de se checar a conversão de glicose em AA e, posteriormente, em ácidos tartárico e oxálico. Ribéreau-Gayon (1968) infiltrou D-[1-¹⁴C] glicose em uvas verdes e encontrou a maior parte do ¹⁴C nos grupos carboxila do ácido tartárico. Em gerânio, Loewus *et al.*, (1975)

descobriram que as folhas infiltradas com D-[1-¹⁴C] glicose tinham nove vezes mais ¹⁴C no ácido oxálico do que as folhas infiltradas com D-[6-¹⁴C] glicose. O AA marcado originado da D-[6-¹⁴C] glicose tinha 82% de seu ¹⁴C no carbono 6.

Finkle *et al.*, (1960) e Loewus e Kelly (1961) estudaram a conversão de D-glicurono-6,3-lactona e ácido D-galacturônico a AA em morangos no estágio verde de amadurecimento. Esses trabalhos demonstraram que ambas substâncias são convertidas em AA com inversão da cadeia carbônica, isto é, o carbono 6 de cada ácido urônico converteu-se no carbono 1 do AA, respectivamente.

A conversão imediata da L-galactono-1,4-lactona em AA, observada em plantas por Isherwood *et al.* (1954) foi confirmada em diversos estudos (Jackson *et al.*, 1961; Leung e Loewus, 1985), e a enzima que conduz essa conversão, L-galactono-1,4-lactona:ferricitocromo c oxidoreductase (EC 1.3.2.3) foi purificada à partir de folhas de espinafre, raízes de batata doce e couve-flor (Ostergaardt *et al.*, 1997).

Baig *et al.* (1970), mantiveram folhas de salsa em solução 0.5% m/v de L-galactono-1,4-lactona por 190 horas e houve um aumento na síntese de AA 7 vezes maior que o grupo controle mantido em água. Em experimentos com morangos quase maduros ou folhas de feijão obtidas de sementes germinadas por 7 dias, 80% da L-[2-¹⁴C] galactono-1,4-lactona foi recuperada como L-[2-¹⁴C] AA.

A conversão da D-glicose em L-galactono-1,4-lactona tem sido amplamente estudada e alguns mecanismos tem sido propostos. Shigeoka *et al.* (1980) apresentaram o seguinte esquema:

D-glicose → UDP-D-glicose → UDP-D-glicuronato → UDP-D-galacturonato → L-galactono-1,4-lactona → ácido L-ascórbico

Este esquema foi baseado em trabalhos realizados com a alga *Euglena gracilis*, onde ocorre inversão da cadeia carbônica da glicose. Outras classes de algas tem sido estudadas quanto à biossíntese de AA, das quais *Ochromonas danica* Pringheim (Helsper *et al*, 1982) e *Cyclotella cryptica* Reimann (Grün e Loewus, 1984) apresentaram inversão da cadeia carbônica da glicose e converteram L-galactono-1,4-lactona exógena em AA. Porém, uma classe de alga, *Chlorella pyrenoidosa* Chick, converteu a glicose em AA sem inversão da cadeia carbônica (Renstron *et al*, 1982) como ocorre com plantas superiores.

Embora o processo envolvido na conversão da D-glicose a AA não seja ainda completamente entendido, os estudos com compostos marcados indicam alguns requerimentos básicos nessa conversão, isto é, oxidação do C-1, oxidação interna do C-2 ou C-3, epimerização ou processo equivalente do C-5 e lactonização entre o C-1 e o C-4, e a manutenção do grupo hidroximetila do C-6 da glicose (Grün *et al*, 1982). Um esquema que tenta conciliar esses requerimentos básicos foi proposto por Loewus *et al*, (1987) e a ordem na qual ocorrem essas reações pode ser diferente da apresentada na Figura 4.

Figura 4: Esquema de biossíntese do AA incluindo ononas como precursores Loewus, 1999).

Loewus *et al*, (1987) infiltraram D-[6-¹⁴C] glicose e D-[6-¹⁴C] glicosona em folhas de feijão obtidas de sementes germinadas em 21 dias e, em 24 horas, 0,4% do total de compostos marcados apareceu como AA marcado, indicando que a glicosona é utilizada na biossíntese do AA, embora uma epimerase que converta a

glicosona em sorbosona não tenha sido ainda isolada. Nesses estudos a glicosona demonstrou ser um precursor do AA mais eficiente que a glicose, apresentando pouca redistribuição do ^{14}C durante a conversão.

Uma enzima, sorbosona desidrogenase-NADP, que converte a sorbosona em AA, porém com muito pouca afinidade, foi detectada em experimentos com folhas de feijão (Loewus *et al.*, 1990). A D-glicosona e a L-sorbosona também mostraram ser supostos precursores do AA em folhas de feijão e espinafre, embora estas osonas não tenham ainda sido encontradas em plantas superiores (Saito *et al.*, 1990). Assim, permanece a questão se as osonas fazem parte de um mecanismo secundário de biossíntese do AA, ou então, são substâncias análogas dos precursores da L-galactono-1,4-lactona.

Pallanca e Smirnoff (1999) estudaram a conversão de D-glucosona e L-sorbosona em AA, em ervilhas (*Pisum sativum* L.) e não encontraram aumento na quantidade de AA mesmo em concentrações consideradas altas. Nesse sistema a D-glucosona foi duas vezes mais eficiente do que a D-glicose na conversão a AA, o que está de acordo com o trabalho de Saito *et al.* (1990).

A toxicidade da D-glicosona em concentração milimolar, tem sido demonstrada em diversos organismos e é atribuída a sua interferência com o metabolismo dos carboidratos e danos oxidativos na presença de íons metálicos (Nakayama *et al.*, 1992).

Trabalhos recentes demonstraram que a D-glicosona e a L-sorbosona exógenas não aumentam o conteúdo de AA em plantas (Pallanca e Smirnoff, 1999; Conklin *et al.*, 1997; Davey *et al.*, 1999), embora uma L-sorbosona desidrogenase tenha sido detectada por Loewus *et al.*, (1990). A enzima que converte a D-glicose em D-glicosona é uma piranose-2-oxidase. Essa enzima não foi detectada em ensaios com ervilhas, e experimentos isotópicos não indicaram que as osonas são intermediárias na conversão de D-glicose em AA (Pallanca e Smirnoff, 1999).

Smirnov (1996) revisando as funções e o metabolismo do AA em plantas, já destacava que “nenhuma atenção estava sendo dada aos derivados fosforilados dos açúcares e lactonas como intermediários da biossíntese do AA”. Então em 1998 G. L. Wheeler, M. A. Jones e N. Smirnov, propuseram um novo esquema de biossíntese do AA em plantas que mantém todos os requerimentos descritos acima (Figura 5), e sugerem ainda que a enzima L-sorbose desidrogenase é, na verdade, a L-galactose desidrogenase que converte a L-galactose em L-galactono-1,4-lactona. Neste esquema, o AA é sintetizado à partir da D-glicose-6-P, tendo como intermediário a GDP-manose e outros compostos, que também são utilizados pelas plantas para a síntese de polissacarídeos da parede celular e glicoproteínas que contém D-manose, L-fucose e L-galactose (Wheeler *et al.*, 1998).

Figura 5. Esquema de biossíntese do AA incluindo a GDP-D-manose e a L-galactose como precursores (Loewus, 1999).

A evidência bioquímica de que a GDP-manose tem um papel fundamental na biossíntese do AA em plantas, foi apresentada por Conklin *et al.* (1997) que, combinando as técnicas bioquímica, molecular e genética, demonstraram que uma variedade mutante de *Arabidopsis thaliana* chamada *vtc1*, sintetiza o AA em menor proporção que a variedade comum. A *vtc1* contém apenas 35% de atividade da enzima GDP-manose pirofosforilase (EC 2.7.7.13; manose-1-fosfato guaniltransferase), a qual produz GDP-manose para a biossíntese de AA, resultando assim, em uma taxa menor de conversão de manose marcada em AA (Conklin *et al.*, 1999).

Algumas enzimas envolvidas no mecanismo de biossíntese do AA chamado Smirnof-Wheeler são pouco conhecidas. A fosfomanose isomerase (E.C. 5.3.1.8) está envolvida na conversão da D-frutose-6-P em D-manose-6-P, e muitas plantas não apresentam esta enzima, ou apresentam muito baixa atividade (Smirnof *et al.*, 2001). A fosfomanose mutase (E.C. 5.4.2.8), que é responsável pela conversão da D-manose-6-P em D-manose-1-P, também é pouco conhecida e requer um açúcar bifosfatado para sua ativação (Oesterhelt *et al.*, 1997).

A enzima GDP-Dmanose pirofosforilase (E.C. 2.7.7.13), que converte a D-manose-1-P em GDP-manose, foi parcialmente caracterizada à partir de vários tipos de plantas e o gene que codifica essa enzima foi detectado em *A. Thaliana*. Esse gene apresenta seqüência homóloga com os genes provenientes de mamíferos, leveduras e bactérias (Conklin *et al.*, 1999). Pouco se sabe a respeito da enzima GDP-manose-3,5-epimerase que catalisa o equilíbrio entre a GDP-manose e a GDP-galactose segundo o esquema de Smirnof-Wheeler, e ela foi estudada com mais detalhes apenas na alga *Chlorella pyrenoidosa* (Barber, 1971).

As enzimas que catalisam a conversão de GDP-L-galactose em L-galactose ainda não são conhecidas e sabe-se apenas que culturas de células de *A. Thaliana* incubadas com GDP-manose resultam na formação de GDP-L-galactose, L-galactose-1-P e L-galactose (Wheeler *et al.*, 1998). Entretanto, a enzima que catalisa a conversão de L-galactose em L-galactono-1,4-lactona, chamada L-galactose

desidrogenase, foi purificada à partir de ervilhas e *A. Thaliana* (Wheeler *et al.*, 1998), e tem pouca similaridade com os genes outras eucariotas (Smirnov *et al.*, 2001).

A síntese do AA à partir da L-galactono-1,4-lactona é catalisada pela enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase, a qual foi purificada à partir de vários tipos de plantas. Estudos recentes localizaram esta enzima na membrana interna da mitocôndria e o citocromo *c* como acceptor fisiológico de elétron para sua oxidação em AA (Smirnov *et al.*, 2001). Entretanto, a conversão de L-gulono-1,4-lactona foi demonstrada em morango e feijão (Baig *et al.*, 1970) e também pela L-galactono-1,4-lactona desidrogenase purificada da batata. (Ôba *et al.*, 1994, 1995).

ARRIGONI *et al.* (1994), mostraram que o teor de AA sintetizado em embriões de milho mantidos em soluções de L-galactono-1,4-lactona em diferentes concentrações, aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração utilizada no experimento.

A identificação do mecanismo de biossíntese do AA em plantas facilita a manipulação genética de espécies vegetais a fim de aumentar seu teor. Entretanto, Pallanca e Smirnov (2000) afirmaram que se faz necessário também conhecer os fatores que regulam o pool de AA à partir de sua síntese e também de seu “turnover” resultante de seu metabolismo e/ou oxidação seguida de degradação não enzimática.

3. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar a via de biossíntese do AA em plantas através da infiltração de supostos precursores em diversos tecidos vegetais, utilizando-se de compostos marcados e não-marcados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

As amostras de pimentão verde, goiabas de polpa branca e vermelha, mamão papaia e o brócolis foram adquiridos no comércio local, enquanto que os morangos da variedade Dover foram provenientes de plantações do município de Atibaia, SP. As amostras de folhas de goiabeira foram provenientes do campus da USP, SP.

Os critérios de seleção dos estádios de amadurecimento das amostras de goiabas e mamões foram baseados subjetivamente na coloração da casca e firmeza da polpa (Paull *et al.*, 1999). Os critérios utilizados para as amostras de morango foram baseados nas observações de Loewus (1963).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. REAGENTES UTILIZADOS

As substâncias adquiridas da SIGMA Chemical Co. e utilizadas nos estudos foram a Ascorbato Oxidase (E.C. 1.10.3.3), L-galactose (L-GALAC), D-galactose (D-GALAC), D-manose (D-MAN), D-frutose, D-galactose, D-sacarose, D-glicose, L-galactono-1,4-lactona (L-GAL), D-galactono-1,4-lactona (D-GAL), L-gulono-1,4-lactona (L-GUL), D-gulono-1,4-lactona (D-GUL), D-glicurono-lactona (D-GLUC) e ácido metafosfórico. O ácido L-ascórbico foi adquirido da Merck. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

O líquido de cintilação ASC[®] NACS104, a D-[U-¹⁴C] manose (7,40 MBq/mL) e a D-[1-¹⁴C] galactose (7,40 Mbq/mL) foram adquiridos da Amersham Pharmacia. A L-[1-¹⁴C] galactose (3,7 GBq/mL) foi adquirida da American Radiolabeled Chemicals e a D-[U-¹⁴C] glucose-1-P dipotassium salt (0,74 MBq/mL) adquirida da New England Nuclear, Boston, USA.

4.2.2. INFILTRAÇÃO DOS PRECURSORES FRIOS

As amostras de morango, folhas de goiabeira e o brócolis foram submersos pelo pecíolo em soluções 0,5% m/v dos precursores conforme Baig *et al.*, (1970), enquanto que as amostras de pimentão verde, mamão papaya e goiabas de polpa branca e polpa vermelha, após o fatiamento foram imediatamente submersas nas soluções e em água deionizada. Após um período de 24 horas à temperatura ambiente e com luz artificial fluorescente constante de 40 W mantida a uma distância de aproximadamente 40 cm, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização das análises de AA total, AA e ADA. Todas as amostras foram pulverizadas com o auxílio de nitrogênio líquido antes da sua utilização. Em todos os ensaios um grupo controle foi submetido à extração e análise do AA imediatamente após o corte ou coleta das amostras.

4.2.3. INFILTRAÇÃO DE PRECURSORES MARCADOS COM ^{14}C

O método de infiltração foi adaptado de Loewus (1963). As amostras de morango utilizados nos experimentos com precursores marcados estavam no estágio verde de amadurecimento. Dezesseis morangos foram, separadamente, imersos pelo pecíolo em 1 mL de água deionizada contendo 74 kBq de D-[U- ^{14}C] manose até a completa infiltração da substância. Em seguida, 8 amostras foram mantidas em água deionizada à temperatura ambiente e luz artificial de 40 W a uma distância de aproximadamente 40 cm, por um período de 24 horas e outros 8 por um período metabólico de 48 horas nas mesmas condições. Esse mesmo experimento foi repetido, porém utilizando-se a L-[1- ^{14}C] galactose.

As amostras de brócolis foram tratadas da mesma forma que o morango, porém com 37 kBq de D-[U- ^{14}C] manose e 37 kBq de L-[1- ^{14}C] galactose, por um período metabólico de 24 horas.

Das amostras de mamão e de goiaba com polpa vermelha, ambos no estágio verde de amadurecimento e de mamão no estágio maduro, foram extraídos batóques redondos onde foi feita a infiltração de 3,7 kBq de D-[U-¹⁴C] manose, 3,7 kBq de D-[1-¹⁴C] galactose, 3,7 kBq de D-[1-¹⁴C] glicose-1-P, e 3,7 kBq de L-[1-¹⁴C] galactose, em condições especificadas nas tabelas de resultados.

4.2.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AA PELO MÉTODO DO MOLIBDATO DE AMÔNIO

Baseia-se na formação de um complexo azul através da redução do molibdato de amônio pelo AA na presença de íons sulfato e fosfato. A absorvância do complexo azul foi medida a 760 nm. O AA foi extraído após homogeneização de uma massa conhecida da amostra com solução de ácido oxálico 0,05M/EDTA 2mM. Em seguida, a amostra foi filtrada e centrifugada a 8000g. À uma alíquota de 500 µL foram adicionados 50 µL de solução HPO₃/HAc/Água, 100 µL de H₂SO₄ 0,5% v/v, 200 µL de molibdato de amônio 0,5% m/v e 1,65 mL de água deionizada, respectivamente. Um branco foi preparado com os reagentes acima mais 500 µL de solução extratora. Após 15 minutos as amostras foram lidas em espectrofotômetro, e uma curva de calibração foi preparada com AA puro (Bajaj e Kaur, 1981).

4.2.5. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AA PELO MÉTODO DA ASCORBATO OXIDASE

O procedimento de extração do AA é como descrito no item 4.2.4. À uma alíquota de 100 µL do extrato filtrado e centrifugado foi adicionado 1,0 mL de tampão fosfato 200 mM, pH 5,6, e mantido a 30 °C por 10 minutos. Após esse tempo, 1 UI da enzima ascorbato oxidase, E.C. 1.10.3.3 (Sigma Chemical Co.) foi adicionado à mistura e novamente mantida a 30 °C por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 µL de HCl 0,2 M e feita a leitura em espectrofotômetro a 245 nm.

Um branco, para cada alíquota, foi preparado pela adição do HCl antes da enzima. Um curva de calibração foi preparada com AA puro (Bergmeyer *et al.*, 1983).

4.2.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AA TOTAL, AA E ADA POR HPLC

Os teores de AA total, AA e ADA foram determinados utilizando-se uma técnica adaptada de Picón *et al.* (1993), Rizzolo *et al.* (1984) e Diop *et al.* (1988). O AA total foi extraído homogeneizando-se cerca de 1,0 g de amostra em 5 ml de solução de ácido metafosfórico a 0,3% m/v. As amostras foram então centrifugadas a 27000g por 30 minutos, e o sobrenadante após filtragem (0,45 µm -MILLIPORE), foi injetado em HPLC acoplado com detector de arranjo de diodos (DAD) a 262 nm. 10,0 µL de cada amostra foi injetado no equipamento com as seguintes condições cromatográficas para todos os ensaios: Fase móvel: tampão acetato 0,2 M (pH 4,2), coluna: µBondapak C18 (3,9 x 300 mm, 10 µm), temperatura da coluna: 30 °C, fluxo: 1,5 mL/min.

Em todos os ensaios o AA foi identificado pela comparação de seu tempo de retenção com aquele de uma curva padrão preparada a partir de uma solução estoque de 1mg/mL. O ácido desidroascórbico (ADA) foi determinado pela diferença entre o AA total (obtido pela redução do ADA a AA com DDT 10 mM) e o AA.

4.2.7. MÉTODO DE EXTRAÇÃO E COLETA DOS AÇÚCARES SOLÚVEIS MARCADOS COM ¹⁴C

A uma massa conhecida de cada amostra foi adicionado 1,0 mL de etanol 80% v/v e a mistura foi agitada em um Thermomixer Eppendorf por 20 min a 80 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 1000g e o sobrenadante foi recolhido em balões volumétricos de 5,0 mL. Este procedimento foi repetido mais duas vezes com o resíduo sólido que permaneceu no eppendorf e o volume do balão volumétrico foi completado com etanol 80% v/v. Uma alíquota de 1,0 mL foi submetida à evaporação do etanol em Speed Vac SC210A Savant, e o resíduo sólido foi dissolvido em água deionizada. Após nova centrifugação, uma alíquota de

500 µL de amostra foi misturada com 500 µL de água deionizada e 2 x 25 µL foram injetados no cromatógrafo Dionex DX 500 equipado com detector amperométrico de pulsos e uma coluna CarboPac PA1 de 2 x 250 mm com pré-coluna correspondente da Dionex. A separação procedeu-se a 25 °C utilizando-se NaOH 18 mM como fase móvel a um fluxo de 1,0 mL/min.

4.2.8. COLETA DE FRAÇÕES DOS PRECURSORES MARCADOS COM ¹⁴C E LEITURA NO CINTILADOR LÍQUIDO (LSC)

Após a extração do AA total, como descrito acima, 100 µL de amostra foram injetados no cromatógrafo com detector UV. A fração correspondente ao AA foi coletada e adicionada a 4,0 mL de solução cintiladora para a contagem no cintilador líquido. Os açúcares foram coletados à partir de 2 injeções de 25 µL de cada amostra no cromatógrafo com detector amperométrico após a adição de uma massa conhecida dos padrões de manose e galactose para facilitar a visualização e coleta dos picos correspondentes a esses açúcares. As frações correspondentes a cada açúcar foram coletadas e analisadas no cintilador líquido (Keates *et al*, 2000).

4.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios foram considerados como uma distribuição normal e realizada a análise de variância, em delineamento inteiramente casualizado, para verificar a presença de efeitos significativos, após o qual foi aplicado o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TEOR DE AA EM VEGETAIS PELO MÉTODO DO MOLIBDATO DE AMÔNIO E DA ASCORBATO OXIDASE

As Figuras 6 e 7 mostram o teor de AA em morangos no estágio inicial de amadurecimento, submersos pelo pecíolo em soluções 0,5% m/v dos precursores por 24 h, a temperatura ambiente, e analisados por duas metodologias espectrofotométricas distintas.

Figura 6. Conteúdo de AA total em morangos pelo método do molibdato de amônio. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); D-GAL (D-galactono-1,4-lactona); L-GUL (L-gulono-1,4-lactona); D-GUL (D-gulono-1,4-lactona); D-GALAC (D-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão ($n = 3$). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados das Figuras 6 e 7 mostram que a L-galactono-1,4-lactona (L-GAL) é um precursor em potencial do AA em morangos, como já foi descrito em diversos trabalhos (Mapson *et al.*, 1954; Mapson e Breslow, 1958; Loewus, 1963; 1980; Baig *et al.*, 1970; Leung e Loewus, 1985). A L-gulono-1,4-lactona é sabida ser precursora imediata do AA em animais que possuem a enzima L-gulono-1,4-lactona oxidase no fígado ou nos rins.

Figura 7. Conteúdo de AA em morangos pelo método da ascorbato oxidase. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); D-GAL (D-galactono-1,4-lactona); L-GUL (L-gulono-1,4-lactona); D-GUL (D-gulono-1,4-lactona); D-GALAC (D-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 3). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Entretanto, a L-gulono-1,4-lactona parece ser precursora do AA em plantas pois os resultados indicam que ela mantém o teor de AA quando comparado com o controle e a amostra mantida em água. A D-gulono-1,4-lactona e a D-galactose foram os menos eficientes na manutenção do teor de AA, considerando que quando utilizados como precursores em mudas de agrião e morangos não mostraram ser precursores do AA em plantas (Isherwood *et al.*, 1956; Loewus e Kelly, 1961). Ao contrário, a D-gulono-1,4-lactona parece inibir a síntese do AA e ativar um sistema de degradação do AA pois os valores mostrados nas figuras são muito menores do que aqueles encontrados para as amostras mantidas em água e o controle.

A metodologia de determinação do AA usando o molibdato de amônio mostra somente o AA total pois não é possível, utilizando-se este método, determinar somente o AA no estado reduzido, pois a reação de formação do complexo azul através da redução do molibdato de amônio ocorre também com o ADA. Assim, podemos notar pequenas diferenças quando comparamos as Figuras 6 e 7. Deste modo, os valores encontrados para o AA total na Figura 6 são um pouco maiores

quando comparamos alguns dos precursores utilizados como a L-galactono-1,4-lactona, a L-gulono-1,4-lactona, a D-gulono-1,4-lactona e a D-manose. As amostras mantidas em D-galactono-1,4-lactona, D-galactose, água e o controle apresentaram valores maiores na Figura 7, talvez por erro experimental, pois o método de determinação do AA utilizando-se a ascorbato oxidase é altamente específico para o AA no estado reduzido.

A D-manose, proposta como um dos precursores do AA, não mostrou ser tão eficiente na conversão a AA quando comparada com a L-galactono-1,4-lactona, talvez por ser precursora também de polissacarídeos da parede celular e glicoproteínas ou então por causa da concentração utilizada em todos os experimentos, 0,5% m/v, pois uma quantidade em excesso pode exceder a capacidade das enzimas fosfomanose mutase e fosfomanose isomerase de converter esse excesso em manose-6-P ou frutose-6-P respectivamente (Smirnov, 2000).

5.2. TEORES DE AA TOTAL, AA E ADA EM VEGETAIS POR HPLC

As Figuras 8 a 13 mostram os teores de AA total, AA e ADA em diferentes frutos e vegetais submetidos aos principais precursores propostos nos esquemas de biossíntese do AA. Os ensaios foram realizados com diferentes frutos e vegetais ricos em vitamina C. Alguns vegetais como o brócolis e o pimentão verde são modelos bastante práticos para estudar o mecanismo de biossíntese do AA, pois a infiltração é bastante facilitada devido ao tipo de tecido.

Um dos mecanismos propostos na Figura 3 apresenta a D-galactose como precursor primário do AA em plantas, porém com inversão da cadeia carbônica. Porém estudos realizados com morangos (LOEWUS *et al.*, 1956) infiltrados com D-[1-¹⁴C] galactose, mostraram que não ocorre inversão da cadeia carbônica, com o carbono 1 da galactose aparecendo, de maneira quase uniforme, no carbono 1 e no carbono 6 do AA. Loewus (1963) afirmou que não ocorre quebra da cadeia carbônica da glicose durante a biossíntese do AA e que o ácido D-glicurônico,

exógeno ou endógeno (formado à partir do *myo*-inositol no tecido celular da planta), não é utilizado para a síntese do AA.

Figura 8. Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de pimentão verde após 24h. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); D-GALAC (D-galactose); D-MAN (D-manose); Água, amostras mantidas em água destilada; Controle, amostras analisadas imediatamente após a coleta. Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 2). Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

No ensaio da Figura 8, usamos a enzima L-ascorbato oxidase, a fim de se confirmar que o AA obtido das amostras submetidas a D-galactose e a D-galactono-1,4-lactona, era realmente a forma L e não o isômero D. Uma alíquota do extrato foi tratada com a enzima L-ascorbato oxidase e injetada novamente no HPLC. O resultado foi o desaparecimento do pico do AA, indicando que não se tratava do isômero D, já que a enzima é altamente específica para a forma L.

Os resultados encontrados nos ensaios com folhas de goiabeira foram bastante interessantes, já que somente foi encontrado AA na amostra controle, isto é, imediatamente após a colheita das amostras. Durante o experimento, todo o AA foi convertido para ADA (Figuras 9 e 10), e os precursores L-galactono-1,4-lactona e L-galactose mantiveram o teor inicial de AA total das folhas, quando comparados com as amostras mantidas em soluções de D-manose e em água.

Figura 9. Conteúdo de AA total, AA e ADA em folhas de goiabeira (goiabas com polpa vermelha) após 24h. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 3). As variações representam um desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Não houve diferença significativa entre os conteúdos de AA total, AA e ADA das amostras de folhas de goiabeira, seja de goiabas de polpa vermelha (Figura 9), seja de goiabas de polpa branca (Figura 10). Entretanto, em ensaios realizados com goiabas de polpa branca encontramos um teor de AA maior do que aquele encontrado para as goiabas de polpa vermelha (dados não mostrados). As amostras mantidas nas soluções de D-manose e água apresentaram valores bem menores de AA total e ADA do que as amostras mantidas em L-galactose e L-galactono-1,4-lactona. Esses dados mostram que houve uma degradação maior do ADA naquelas amostras, enquanto que nas amostras mantidas em L-GALAC e L-GAL, ocorreu uma maior síntese do AA que era imediatamente oxidado a ADA, mantendo assim os teores de AA total e ADA nos níveis da amostra controle.

Horemans *et al.* (1998), mostraram que existe um mecanismo de troca AA/ADA na membrana plasmática e um carreador preferencial para o ADA, que

facilita sua translocação entre o citosol das vesículas da membrana e o apoplasto onde seria reduzido a AA. Experimentos fisiológicos conduzidos com folhas de espinafre (*Spinacea*) sugerem um mecanismo de troca AA/ADA entre o citoplasma e o apoplasto no qual se localiza o AA que protege as células contra o stress oxidativo (Smirnov, 1996).

Estes resultados mostram que a transporte do AA no estado reduzido não ocorre na membrana plasmática, sendo este transporte realizado na forma de ADA.

Figura 10. Conteúdo de AA total, AA e ADA em folhas de goiabeira (goiabas com polpa branca) após 24h. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); ; L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 2). As variações representam um desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Segundo Mozafar e Oertli (1993) o transporte de AA ou de ADA ocorre, provavelmente no xilema, pois quando AA foi infiltrado em raízes de soja ocorreu um aumento no teor de AA das folhas, e, quando utilizaram AA marcado, ele apareceu nas folhas. O passo final para a biossíntese do AA está na membrana interna da mitocôndria (Siendones *et al.*, 1999), e os resultados das Figuras 9 e 10 mostraram

que um mecanismo carreador de AA para os outros compartimentos subcelulares, converte o AA em ADA a fim de facilitar o transporte.

Figura 11. Conteúdo de AA total, AA e ADA em brócolis após 24h. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 2). Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os ensaios com brócolis mostraram que houve um aumento significativo dos teores de AA total, AA e ADA (Figura 11) nas amostras mantidas nos precursores L-GAL e L-GALAC, com relação ao controle, não havendo entretanto diferença significativa entre esses precursores. As amostras mantidas em D-MAN e água apresentaram valores de AA total, AA e ADA próximos daqueles encontrados para as amostras controle. No mecanismo de biossíntese do AA proposto por Wheeler *et al.* (1998), a L-galactose é proveniente da GDP-manose. Quando D-[U-¹⁴C] manose foi infiltrada em folhas de *Arabidopsis thaliana*, ela foi convertida em [U-¹⁴C] AA.

Trabalhos realizados em batata, com inibição antisense da enzima GDP-manose pirofosforilase responsável pela conversão de manose-1-P em GDP-

manose, mostrou uma redução no teor de AA, indicando assim que esta enzima parece controlar o mecanismo de biossíntese do AA via GDP-manose (Smirnoff, 2000).

Smirnoff (1996) relata que o K_m para o ADA está de acordo com os níveis de concentração no apoplasto, e o carreador deve ter um mecanismo de preenchimento do apoplasto com AA nos mesmos níveis de remoção do ADA. Um carreador para o AA ou o ADA, ainda não foi identificado na membrana do tilacóide e muito há ainda para aprender sobre o transporte de AA e ADA em plantas (Smirnoff e Wheeler, 2000).

Figura 12. Conteúdo de AA total, AA e ADA em mamão no estágio verde de amadurecimento após 24h. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); D-GAL (D-galactono-1,4-lactona); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão ($n = 3$). Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O estudo realizado com mamões papaia mostrou que ocorre um aumento no teor de AA total, AA e ADA durante o amadurecimento (Figuras 12 e 13). Nas amostras de mamão no estágio verde de amadurecimento, determinado pela cor verde da casca sem manchas amarelas e com polpa branca, a L-galactono-1,4-

lactona estimulou o aumento nos teores de AA total, AA e ADA, enquanto que as amostras mantidas em D-galactose, D-manose e água apresentaram valores próximos aqueles encontrados para a amostra controle com relação ao AA total e AA. O AA proveniente das amostras mantidas em D-GAL foi testado com a enzima L-ascorbato oxidase a fim de se comprovar que o AA determinado era o isômero L. Houve um aumento significativo do teor de ADA nas amostras mantidas em D-galactose e D-manose com relação a amostra controle.

Figura 13. Conteúdo de AA total, AA e ADA em mamão no estágio maduro de amadurecimento após 24h. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GUL (L-gulono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-GLUC (D-glicurono-1,4-lactona); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 2). O estágio maduro foi definido com base na cor amarela da casca e da polpa. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Na Figura 13 somente a L-GAL estimulou um aumento significativo na biossíntese do AA total e AA quando infiltrada em batoques de mamão no estágio maduro. A L-GUL, a L-GALAC e a D-GLUC não estimularam significativamente um aumento nos teores do AA total, do AA e do ADA, sendo que este último apresentou uma degradação em todos os precursores infiltrados, a exceção da D-GLUC que apresentou um pequeno aumento no teor de ADA quando comparado com a amostra controle. Embora não tenha ficado demonstrado estatisticamente um

aumento nos teores do AA total e do AA utilizando-se a D-GLUC, ocorreu um discreto aumento como pode ser visto na Figura 13.

Davey *et al.* (1999), apresentaram uma possível explicação para o aumento no teor de AA total nas amostras de mamão maduro mantidas em solução 0,5% m/v de D-glicurono-1,4-lactona. Eles propuseram, em seu trabalho com cultura de células de *Arabidopsis*, que a D-glicurono-1,4-lactona seria diretamente reduzida a L-gulono-1,4-lactona, ou então primeiro delactonizada a ácido D-glicurônico, reduzida a ácido L-gulônico que se autolactoniza em L-Gulono-1,4-lactona.

Figura 14. Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de goiaba de polpa branca estágio verde de amadurecimento após 24h à temperatura ambiente. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 3). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor verde da casca. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Uma vez que os precursores L-galactono-1,4-lactona e L-galactose apresentados no esquema de biossíntese do AA proposto por Wheeler *et al.* (1998) estimularam o aumento no teor desse ácido nos modelos vegetais até então mostrados, uma maior atenção foi dada a eles e também à D-manose que integra o

esquema citado, embora esse açúcar não tenha apresentado até o momento um estímulo na biossíntese do AA pelos motivos já discutidos anteriormente.

À partir dos trabalhos de Somers *et al.* (1948), realizamos uma ensaio com amostras de goiaba de polpa branca a fim de se investigar a influência da temperatura na biossíntese do AA nesse tecido vegetal. Somers *et al.* (1948) concluíram que a influência da temperatura está diretamente relacionada com a presença de luz, pois nos experimentos que conduziram em amostras mantidas no escuro ocorreu uma diminuição do teor de AA em todas as temperaturas utilizadas no experimento por eles conduzido. Assim, na Figura 14, a temperatura ambiente, não houve diferença significativa no teor de AA total entre as amostras mantidas nas soluções dos precursores L-galactono-1,4-lactona e L-galactose e a amostra controle ocorrendo um aumento significativo no teor de ADA. As amostras mantidas na solução de D-manose e em água apresentaram uma redução nos teores de AA total e AA, em relação àquelas do controle.

Os resultados da Figura 15, ensaio realizado a temperatura de 6 °C, mostram que os valores encontrados para o AA total e AA das amostras mantidas nas soluções de L-GAL e L-GALAC foram menores do que aqueles encontrados na Figura 14, isto é, no ensaio realizado a temperatura ambiente o estímulo na biossíntese do AA foi maior que na temperatura de 6 °C, onde o estímulo foi menor para todos os precursores utilizados no experimento. Assim, na presença de luz e com o aumento da temperatura houve um aumento na biossíntese do AA e também do ADA como pode ser visto na Figura 15, onde todos os precursores estudados, inclusive a amostra mantida em água, apresentaram valores de ADA maiores que a amostra controle.

Smirnoff (2000) apresentou um esquema no qual propõe que a GDP-manose pode ser um derivado direto da GDP-glicose, sem os intermediários propostos por Wheeler *et al.* (1998). Entretanto, pondera que este não parece ser o mecanismo principal de síntese da GDP-manose, pois estudos com plantas que apresentaram um nível baixo de ascorbato, eram deficientes na atividade da enzima GDP-Manose

pirofosforilase. Baixa atividade dessa enzima diminui também os níveis de D-manose e L-galactose nos polissacarídeos da parede celular (Smirnoff, 2000).

Figura 15. Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de goiaba de polpa branca estágio verde de amadurecimento após 24h à temperatura de 6 °C. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 3). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor verde da casca. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados dos ensaios realizados com goiabas de polpa vermelha estão apresentados na Figura 16. Podemos verificar que a L-GAL e a L-GALAC estimularam um aumento na biossíntese do AA total, do AA e do ADA quando comparamos esses valores com aqueles apresentados para a amostra controle. O aumento do ADA foi marcante para todos os precursores utilizados, inclusive para a amostra mantida em água. Podemos verificar que a D-MAN não aumentou significativamente os teores de AA total e AA, embora tenha aumentado o teor de ADA em relação ao controle. Deste modo, as amostras de goiabas de polpa vermelha mostraram ser mais adequadas para esse tipo de estudo de precursores quando comparamos com os resultados alcançados quando utilizamos as goiabas de polpa branca (Figuras 14 e 15). Entretanto, não temos ainda uma explicação plausível para esse fato, e também para o fato da amostra controle de goiaba de

polpa branca apresentar valores maiores de AA total, AA e ADA do que a amostra controle de goiabas de polpa vermelha.

Figura 16. Conteúdo de AA total, AA e ADA em fatias de goiaba de polpa vermelha estágio verde de amadurecimento após 24h à temperatura ambiente. L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 3). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor verde da casca. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Isherwood *et al.* (1956) propuseram uma série de esquemas de biossíntese do AA em plantas trabalhando com mudas de agrião, partindo do pressuposto que o açúcar inicial da biossíntese do AA seria a D-glicose ou a D-galactose. Das diversas lactonas empregadas em seu trabalho, somente a L-galactono-1,4-lactona, a L-gulono-1,4-lactona, a D-glicurono-1,4-lactona e o metil éster do ácido D-galacturônico foram convertidas em AA. Porém, a L-galactono-1,4-lactona aumentou o teor de AA nas mudas de agrião muito mais do que as outras lactonas citadas acima.

Embora a D-galactose tenha sido inicialmente proposta como o passo inicial de biossíntese do AA por Isherwood *et al.* (1956), esta premissa não foi testada e esses pesquisadores não utilizaram compostos marcados para a realização de seu

trabalho, o que foi feito por Loewus *et al.* (1956), que demonstraram não ser viável a conversão da D-galactose em AA sem inversão da cadeia carbônica do açúcar.

Figura 17. Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio verde de amadurecimento após 24h (Ensaio 1). L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão ($n = 4$). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor branca do morango sem manchas vermelhas. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

As Figuras 17 e 18 mostram os resultados das infiltrações realizadas com morangos no estágio verde de amadurecimento, isto é, na cor branca sem manchas vermelhas. Os precursores L-galactono-1,4-lactona e a L-galactose aumentaram os teores de AA total, do AA e do ADA, enquanto que não houve um estímulo da biossíntese de AA quando o precursor utilizado foi a D-manose, que apresentou os mesmos níveis de AA total, AA e ADA que as amostras mantidas em água e o controle. O trabalho com morangos mostrou ser um sistema excelente para o estudo da biossíntese do AA em plantas. Porém, esse trabalho somente pode ser realizado em uma determinada época do ano, ou seja, quando da colheita dos morangos, pois esses são colhidos e imediatamente tem o pecíolo submerso nas soluções dos precursores a ser estudados. Os ensaios 1 e 2 das Figuras 17 a 20 foram realizados em dois lotes de morangos colhidos em épocas diferentes.

Loewus e Kelly (1961) mostraram a conversão do metil éster do ácido D-[1-¹⁴C] galacturônico em AA [6-¹⁴C] utilizando o morango no estágio médio de amadurecimento em seus experimentos, evidenciando assim, a inversão da cadeia carbônica onde o C-6 da carboxila do ácido urônico resulta no C-1 do AA. O trabalho acima citado demonstrou ainda, que existem outras vias de síntese do AA em plantas, além daquela envolvendo a L-galactono-1,4-lactona, a L-galactose e a D-manose, e que o metil éster do ácido galacturônico é reduzido no C-1 resultando metil L-galactonato ou L-galactono-1,4-lactona.

Figura 18. Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio verde de amadurecimento após 24h (Ensaio 2). L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 4). O estágio verde de amadurecimento foi definido com base na cor branca do morango sem manchas vermelhas. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Em todos os ensaios realizados neste trabalho, a L-galactose mostrou ser um excelente precursor do AA como já demonstrado por Wheeler e Smirnoff (1998). Trabalhos anteriores (Roberts, 1971) mostraram que as plantas sintetizam L-galactose e que ele é um componente minoritário dos polissacarídeos da parede celular. Porém, ele não é detectado pelos métodos convencionais de análise por causa da grande quantidade do isômero D-galactose. Segundo Roberts e Harrer

(1973), até 25% da galactose presente nos polissacarídeos da parede celular da raiz de milho está na forma de L-galactose, embora Baydoun e Fry (1988) estimem que o conteúdo de galactose da parede celular de células de espinafre seja 70:1 na relação D:L de galactose.

Figura 19. Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio médio de amadurecimento após 24h (Ensaio 1). L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 4). O estágio médio de amadurecimento foi definido com base na cor branca do morango com manchas vermelhas. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na Figura 19 podemos notar que a D-MAN estimulou a biossíntese de AA total e AA, embora o teste estatístico não tenha demonstrado diferença significativa entre os valores encontrados para as amostras mantidas em D-MAN, água e o controle. Não houve diferença significativa entre todos os precursores usados quanto ao estímulo na biossíntese do ADA.

Pode-se verificar que houve uma pequena queda no teor de AA total das amostras no estágio verde para o estágio médio, isto é, morangos verdes com manchas vermelhas (Figuras 19 e 20), o que pode ser devido à atuação da enzima

ascorbato oxidase, ou então o resultado do metabolismo do AA em ácido tartárico ou oxálico (Loewus, 1999). A L-GAL e a L-GALAC mostraram ser eficientes na conversão direta a AA aumentando o teor desse ácido durante o período de incubação.

Embora o esquema de biossíntese do AA Smirnoff-Wheeler seja confirmado por vários estudos, outras possibilidades de síntese do AA a partir de diferentes fontes não devem ser descartadas. Estes processos incluem outros supostos precursores como a D-glucurono-1,4-lactona, o ácido D-galacturônico, o éster metílico desse ácido e a L-gulono-1,4-lactona que foram propostos por Isherwood *et al.* (1956) e, mais recentemente, estudados por Davey *et al.* (1999).

Figura 20. Conteúdo de AA total, AA e ADA em morangos no estágio médio de amadurecimento após 24h (Ensaio 2). L-GAL (L-galactono-1,4-lactona); L-GALAC (L-galactose); D-MAN (D-manose); Água (amostras mantidas em água destilada) e Controle (amostras analisadas imediatamente após a coleta). As variações representam um desvio padrão (n = 4). O estágio médio de amadurecimento foi definido com base na cor branca do morango com manchas vermelhas. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Barber (1971, 1979) estudando culturas de alga *Chlorella pyrenoidosa*, concluiu que a síntese de L-galactose em plantas ocorre pela epimerização da GDP-

manose em GDP-galactose e, por último em L-galactose-1-P. Entretanto, o mecanismo de desfosforilação da L-galactose-1-P em L-galactose ainda permanece obscuro (Smirnoff e Wheeler, 2000).

Trabalhos com *Saccharomyces cerevisiae* demonstraram que esse microrganismo é capaz de sintetizar o AA utilizando a enzima D-arabinono-1,4-lactona oxidase para oxidar a L-galactono-1,4-lactona a AA (Spickett *et al.*, 2000).

Dos vários tipos de compostos testados por Isherwood *et al.* (1956), somente a D-glicurono-1,4-lactona, o éster metílico do ácido D-galacturônico e a L-galactono-1,4-lactona aumentaram o teor do AA em mudas de agrião (*Lepidum sativum* L.). Esses resultados fizeram com que esses pesquisadores propusessem um esquema de biossíntese do AA semelhante ao observado em animais (Smirnoff *et al.*, 2001).

Davey *et al.* (1999) trabalhando com suspensão de culturas de células de *Arabidopsis* (L.) Heynh., mostraram que a L-GUL e a D-GLUC promoveram um aumento no teor de AA, indicando que possivelmente existe uma oxidase específica para a L-GUL e um mecanismo alternativo para a biossíntese de AA que é independente da L-GAL.

5.3. CONVERSÃO DE D-[U-¹⁴C] MANOSE, D-[U-¹⁴C]GLICOSE-1-P E L-[1-¹⁴C] GALACTOSE EM AA

A eficiência de detecção do sistema de medida da radiatividade foi testada utilizando-se D-[U-¹⁴C] manose, D-[U-¹⁴C]glicose-1-P e L-[1-¹⁴C] galactose puros respectivamente mostrados na Figura 21. Os resultados mostraram eficiência de quase 100% na leitura das amostras. O método utilizado para a coleta, detecção e quantificação dos compostos marcados, foi adaptado da metodologia utilizada por Keates *et al.* (2000).

Figura 21: Controle de eficiência de contagem do cintilador líquido. O contorno nos pontos experimentais representa 1 desvio padrão calculado pela $\sqrt{X(\text{dpm})}$.

A porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] Manose e L-[1-¹⁴C] Galactose em AA em morangos variou conforme a substância infiltrada (Tabela 2). Entretanto, não houve diferença significativa quanto ao tempo de metabolismo, sendo que a L-[1-¹⁴C] Galactose foi muito mais eficiente na conversão a AA.

Tabela 2: Porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] Manose e L-[1-¹⁴C] Galactose em AA em morangos no estágio verde de amadurecimento⁽¹⁾ após 24 e 48 h

Precursor	Conversão em AA (%) ⁽²⁾	
	24h	48h
D-[U- ¹⁴ C] Manose	11,2 ± 2,3 ^a	12,0 ± 2,5 ^a
L-[1- ¹⁴ C] Galactose	40,9 ± 5,4 ^b	46,1 ± 6,4 ^b

⁽¹⁾ O estágio verde de amadurecimento foi determinado pela cor branca do fruto, sem manchas vermelhas.

⁽²⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=8). Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de Wheeler *et al.*, (1998), onde foram incorporados respectivamente 10% de D-[U-¹⁴C] manose e 1,0% de D-[U-¹⁴C] glicose em folhas de *Arabidopsis thaliana*. Estudos realizados com culturas axênicas de *Pistia stratiotes* L. (Keates *et al.*, 2000), mostraram a conversão de L-[1-¹⁴C] galactose em AA e a conversão desse em ácido oxálico. Assim, os resultados encontrados com os morangos (Tabela 2) confirmam esses trabalhos prévios.

Morangos infiltrados com [1-¹⁴C]glicurono-1,4-lactona, [6-¹⁴C]glicurono-1,4-lactona, ou [1-¹⁴C]galacturono-1,4-lactona resultaram na síntese do AA marcado com inversão completa da cadeia carbônica (Loewus, 1963). Não houve evidência da presença do ciclo triose/pentose/hexose, tal como encontrado quando glicose

marcada foi usada para demonstrar a não inversão da cadeia carbônica durante a biossíntese do AA em plantas (Loewus *et al.*, 1956).

Tabela 3: Porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] manose e L-[1-¹⁴C] galactose em AA em brócolis após 24 h

Precursor	Conversão (%) ⁽¹⁾
D-[U- ¹⁴ C] Manose	11,0 ± 1,6
L-[1- ¹⁴ C] Galactose	67,5 ± 10,5

⁽¹⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=5)

Os ensaios realizados com o brócolis (Tabela 3) mostraram resultados que também estão de acordo com os trabalhos anteriores, sendo que, a galactose foi convertida em AA numa porcentagem consideravelmente maior do que aquela alcançada com os morangos. Com relação à manose, os resultados não diferiram dos ensaios com os morangos.

O esquema de biossíntese do AA Smirnoff-Wheeler destacou a enzima L-galactono-1,4-lactona desidrogenase como o passo final para a síntese de AA. Entretanto, esta enzima pode estar envolvida na conversão de D-galacturono-1,4-lactona e seu éster metílico em AA (Loewus e Kelly, 1961), e também na conversão de D-glicurono-1,4-lactona em plantas (Davey *et al.*, 1999).

Sendo um fruto muito utilizado para estudos bioquímicos sobre o amadurecimento pós-colheita, e também por estar disponível o ano todo, o mamão papaya foi utilizado nos estudos de conversão dos precursores marcados em AA (Tabelas 4 e 5).

Os diferentes tempos de incubação tiveram influência na porcentagem de conversão da galactose em AA nos ensaios com batóques de mamão no estágio maduro (Tabela 4), sendo que a taxa de conversão situou-se entre aquelas encontradas nos ensaios com os morangos e com o brócolis. Podemos notar que ocorreu um aumento acentuado de conversão de 1,5 para 2 horas e então uma estabilização e tendência a queda na porcentagem de conversão, indicando que existe um pico de conversão e então os valores tendem a diminuir. Essa diminuição talvez ocorra porque a partir desse momento a degradação do AA supere a capacidade de sua biossíntese.

Tabela 4: Porcentagem de conversão de L-[1-¹⁴C] galactose em AA em mamão no estágio maduro de amadurecimento⁽¹⁾ após diferentes tempos de incubação.

Tempo de incubação (horas)	Conversão ⁽²⁾ (%)
0,083	12,4 ± 1,9 ^a
0,25	16,8 ± 9,2 ^a
0,5	12,1 ± 3,6 ^a
0,75	11,2 ± 3,9 ^a
1	17,8 ± 2,8 ^a
1,5	15,5 ± 5,8 ^a
2	31,6 ± 9,8 ^b
4	27,7 ± 2,5 ^b
6	29,1 ± 5,4 ^b
8	26,1 ± 9,0 ^b
10	26,0 ± 7,0 ^b
24	25,4 ± 4,6 ^b

⁽¹⁾ O estágio maduro foi determinado pela cor amarela da casca e amarelo-escuro da polpa do fruto.

⁽²⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A Tabela 4 mostra que, quando utilizamos o mamão maduro para realizar os ensaios de infiltração de L-galactose marcada, a porcentagem de conversão em AA diminui quando comparado com os ensaios realizados com o mamão no estágio verde de amadurecimento (Tabela 5). As Figuras 12 e 13 mostram que ocorre um aumento na biossíntese de AA durante o amadurecimento do mamão papaya.

Tabela 5: Porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] manose, L-[1-¹⁴C] galactose e D-[U-¹⁴C] glicose-1-P⁽¹⁾ em AA em mamão no estágio verde⁽²⁾ de amadurecimento após 24 h

Precursor	Conversão ⁽³⁾ (%)
D-[U- ¹⁴ C] manose	9,00 ± 1,9 ^a
L-[1- ¹⁴ C] galactose	58,0 ± 0,6 ^b
D-[U- ¹⁴ C] glicose-1-P	7,1 ± 0,6 ^a

⁽¹⁾ P = fosfato

⁽²⁾ O estágio verde de amadurecimento foi determinado pela cor verde da casca sem manchas amarelas e polpa branca.

⁽³⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

Tabela 6: Porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] manose, L-[1-¹⁴C] galactose e D-[U-¹⁴C] glicose-1-P⁽¹⁾ em AA em goiaba de polpa vermelha no estágio verde⁽²⁾ de amadurecimento após 24 h

Precursor	Conversão (%) ⁽³⁾
D-[U- ¹⁴ C] manose	3,0 ± 0,8 ^a
L-[1- ¹⁴ C] galactose	39,3 ± 2,8 ^b
D-[U- ¹⁴ C] glicose-1-P	3,7 ± 0,3 ^a

⁽¹⁾ P = fosfato

⁽²⁾ O estágio verde de amadurecimento foi determinado pela cor verde da casca sem manchas amarelas.

⁽³⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

A conversão de D-glicose-1-P marcada em AA ficou demonstrada nas Tabelas 5 e 6, demonstrando que o precursor do AA em plantas pode ser uma hexose fosforilada, seja a D-glicose-1-P ou a D-glicose-6-P como proposto no esquema Smirnoff-Wheeler de biossíntese do AA.

Os valores encontrados nas Tabelas 5 e 6 estão de acordo com os trabalhos prévios de Loewus *et al.* (1963), no que diz respeito a infiltração da glicose marcada, porém com uma porcentagem um pouco maior de conversão da glicose em AA, talvez porque tenha sido utilizada a D-[U-¹⁴C] glicose-1-P ao invés da D-[U-¹⁴C] glicose e da D-[1-¹⁴C] glicose utilizada nos trabalhos anteriores. Os valores encontrados para a conversão de manose e galactose marcadas em AA, estão de acordo com os trabalhos de Wheeler *et al.* (1998) e de Keates *et al.* (2000), embora os valores sejam um pouco diferentes por causa do tipo de tecido vegetal utilizado na infiltração. Este fato pode ser devido ao alto teor de AA no brócolis quando comparado com a goiaba de polpa vermelha e o mamão, ambos no estágio verde de amadurecimento.

A quantidade de D-glicose, D-frutose e sacarose foi determinada por HPLC utilizando detector amperométrico. O teor de D-glicose, D-frutose e sacarose em mamão variou de 1463 a 2046 mg/100g, 837 a 1604 mg/100g e 36 a 878 mg/100g respectivamente. Em goiaba o teor de D-glicose variou de 731 a 1047 mg/100g, o de D-frutose de 1475 a 2171 mg/100g, e o de sacarose de 383 a 606 mg/100g. E, no brócolis, esses teores foram respectivamente de 794 a 883 mg/100g para a D-glicose, 541 a 560 mg/100g para a frutose e de 56 a 229 mg/100g para a sacarose.

A análise de alguns açúcares extraídos das amostras de goiaba de polpa vermelha de mamão e de brócolis, separados e coletados por HPLC com detecção eletroquímica e submetidos a cintilografia líquida, mostra que houve conversão dos compostos marcados em açúcares que integram o mecanismo de biossíntese do AA proposto por Wheeler e Smirnoff (1998), como demonstrado nas Tabelas 7, 8 e 9, sendo que, no caso do brócolis a conversão nos açúcares foi bem menor do que nos frutos.

Tabela 7: Porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] manose, L-[1-¹⁴C] galactose e D-[U-¹⁴C] glicose-1-P⁽¹⁾ em açúcares em goiabas de polpa vermelha no estágio verde de amadurecimento⁽²⁾ após 24 h

Composto Interconvertido	Precursor infiltrado ⁽³⁾		
	D-[U- ¹⁴ C] manose	L-[1- ¹⁴ C] galactose	D-[U- ¹⁴ C] glicose- 1-P
L-Galactose	15,3 ± 5,5 ^a	25,5 ± 8,9 ^a	14,8 ± 5,9 ^b
D-glicose	20,3 ± 4,4 ^a	21,6 ± 1,4 ^a	24,9 ± 0,9 ^c
D-manose	17,4 ± 8,7 ^a	19,9 ± 5,5 ^a	21,5 ± 3,3 ^{b,c}
D-frutose	15,4 ± 5,5 ^a	25,4 ± 3,9 ^a	24,1 ± 5,0 ^{b,c}
sacarose	15,5 ± 5,6 ^a	18,5 ± 3,0 ^a	27,4 ± 2,4 ^c
AA	3,7 ± 0,3 ^b	39,3 ± 2,8 ^b	3,7 ± 0,3 ^a

⁽¹⁾ P = fosfato

⁽²⁾ O estágio verde de amadurecimento foi determinado pela cor verde da casca sem manchas amarelas.

⁽³⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Em todos os ensaios de determinação de açúcares adicionamos uma quantidade conhecida de L-galactose fria e D-manose fria a fim de aumentar o pico cromatográfico a fim de facilitar a coleta. Isto é, como a quantidade de galactose, seja a forma D ou L, e de D-manose foi muito pequena em todos os frutos e vegetais utilizados nos ensaios, uma quantidade adicional desses açúcares foi necessária antes da injeção no cromatógrafo. Este procedimento não foi necessário no caso dos açúcares frutose, sacarose e glicose, uma vez que esses açúcares estão presentes em quantidades elevadas nos frutos e vegetais utilizados nos ensaios de infiltração.

Tabela 8: Porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] manose, L-[1-¹⁴C] galactose e D-[U-¹⁴C] glicose-1-P⁽¹⁾ em açúcares em mamão no estágio verde⁽²⁾ de amadurecimento após 24 h

Composto Interconvertido	Precursor infiltrado ⁽³⁾		
	D-[U- ¹⁴ C] manose	L-[1- ¹⁴ C] galactose	D-[U- ¹⁴ C] glicose- 1-P
L-galactose	9,9 ± 0,9 ^b	10,7 ± 3,7 ^{a,b}	10,4 ± 4,9 ^{a,b}
D-glicose	15,4 ± 1,7 ^c	17,9 ± 4,5 ^b	24,6 ± 1,5 ^c
D-manose	9,9 ± 0,8 ^b	11,5 ± 3,4 ^{a,b}	10,1 ± 3,8 ^{a,b}
D-frutose	5,6 ± 1,2 ^a	7,0 ± 3,6 ^a	16,4 ± 9,5 ^{c,b}
sacarose	15,0 ± 1,9 ^c	n.d.	n.d.
AA	9,00 ± 1,9 ^{a,b}	58,0 ± 0,6 ^c	7,1 ± 0,6 ^a

n.d.: não detectado.

⁽¹⁾ P = fosfato.

⁽²⁾ O estágio verde de amadurecimento foi determinado pela cor verde da casca sem manchas amarelas e polpa branca.

⁽³⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Em suma, outros mecanismos de biossíntese do AA em plantas existem, porém, não parecem ser a via principal de síntese, porque não aumentaram consideravelmente o teor de AA nos frutos e vegetais utilizados neste estudo, como por exemplo, a L-gulonono-1,4-lactona em amostras de morangos. A interconversão de açúcares marcados mostra que alguns precursores podem ser provenientes de polissacarídeos da parede celular, como no caso da L-galactose (Smirnoff e Wheeler, 2000).

A Tabela 9 mostra os resultados da infiltração de D-[U-¹⁴C] manose e L-[1-¹⁴C] galactose em brócolis. Sendo um vegetal rico em AA, podemos supor que os baixos níveis de interconversão de açúcares seja devido a um maior estímulo na biossíntese do AA.

Tabela 9: Porcentagem de conversão de D-[U-¹⁴C] manose, L-[1-¹⁴C] galactose em açúcares em brócolis após 24 h

Composto interconvertido	Precursor infiltrado⁽¹⁾	
	D-[U- ¹⁴ C] manose	L-[1- ¹⁴ C] galactose
L-galactose	0,68 ± 0,41 ^a	2,91 ± 1,8 ^a
D-glicose	0,95 ± 0,32 ^a	2,19 ± 0,9 ^a
D-manose	1,18 ± 0,2 ^a	1,51 ± 1,0 ^a
D-frutose	1,43 ± 0,2 ^a	2,34 ± 1,1 ^a
sacarose	1,49 ± 0,84 ^a	2,04 ± 0,7 ^a
AA	11,00 ± 1,6 ^b	67,5 ± 10,5 ^b

⁽¹⁾ Os valores representam a média ± desvio padrão (n=5). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O pool que mantém o AA no estado reduzido pode resultar de um balanço entre a síntese, à partir dos açúcares, e sua degradação em ácido oxálico, treônico e tartárico (Loewus, 1988). Na Tabela 9, a porcentagem de conversão da L-galactose marcada em AA foi maior que nos outros sistemas vegetais estudados neste trabalho, talvez, por se tratar de um vegetal com teor de AA total maior que os demais.

Em folhas de várias espécies, há uma forte correlação entre a luz e o conteúdo de AA (Smirnoff, 1996). Neste trabalho, pudemos verificar que, ao menos nas folhas de goiabeira, o teor de AA é consideravelmente menor que o teor de ADA. Talvez, o pool que mantém o AA no estado reduzido seja inibido nesse tecido vegetal, uma vez que o transporte intercelular do AA ocorre via ADA (Foyer e Halliwell, 1976).

O AA ocorre em todos os compartimentos subcelulares, porém em diferentes concentrações (Smirnoff e Wheeler, 2000). Os cloroplastos, em particular, podem apresentar concentrações de AA variando entre 20 a 50 mM, enquanto que quantidades enormes da ordem de 0,3 M foram encontradas em algumas espécies de montanhas elevadas (Smirnoff *et al.*, 2001).

O sistema síntese/degradação/síntese (turnover) do AA foi medido utilizando-se o AA marcado em folhas de *A. thaliana* e mudas de agrião, e ficou estabelecido um turnover de 2,5%/h para a *A. thaliana* e 13%/h para o agrião (Smirnoff *et al.*, 2001). Uma enzima AA oxidase foi detectada em meristemas de células de milho, e evidências indicam que essa enzima é regulada pela auxina, isto é, um nível maior de auxina resulta em maior atividade da enzima (Smirnoff e Wheeler, 2000).

6. CONCLUSÕES

1. A L-galactono-1,4-lactona e a L-galactose mostraram ser precursores do AA em todos os frutos e verduras estudados.
2. O uso dos compostos marcados com ^{14}C combinado com a análise por HPLC/LSC, demonstrou que a D-manose e a L-galactose são precursores do AA em plantas.
3. A L-gulono-1,4-lactona é sabida ser precursora imediata do AA em animais. Neste trabalho ficou demonstrado a tendência da mesma ser também precursora do AA nos frutos estudados. Apesar de não satisfazer os critérios de diferenciação estatística, o aumento da concentração de AA induzido pela L-gulono-1,4-lactona foi evidenciado pelas técnicas: (1) espectrométrica, (2) enzimática e (3) cromatográfica (HPLC). Essas três técnicas resultaram valores aumentados de AA comparativamente ao da amostra controle.
4. A D-gulono-1,4-lactona teve um comportamento inibitório na biossíntese do AA, aumentando sua degradação.
5. Em mamões os níveis de AA total, AA e ADA, foram maiores no estágio maduro comparativamente as amostras no estágio verde do amadurecimento.
6. Ocorreu a conversão dos compostos D-[U- ^{14}C] manose, L-[1- ^{14}C] galactose e D-[U- ^{14}C] glicose-1-fosfato em outros açúcares quando infiltrados em amostras de mamão, brócolis e goiaba de polpa vermelha.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAIG, M. M.; KELLY, S.; LOEWUS, F. L-Ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-gulono-1,4-lactone and L-galactono-1,4-lactone. **Plant Physiology**. v.46, p.277-280, 1970.

BAJAJ K. L.; KAUR, G. Spectrophotometric determination of L-ascorbic acid in vegetables and fruits. **Analyst**. v.106, p.117-120, 1981.

BARBER, G. A. The synthesis of L-galactose by plant enzyme systems. **Archives of biochemistry and biophysics**. v.147, p.619-623, 1971.

BARBER, G. A. Observations on the mechanism of the reversible epimerization of GDP-D-mannose to GDP-L-galactose by an enzyme from *Chlorella pyrenoidosa*. **The Journal of Biological Chemistry**. v.254, p.7600-7603, 1979.

BAYDOUN, E. A. H.; FRY, S. C. [$2\text{-}^3\text{H}$]Mannose incorporation in cultured plant cells: investigation of L-galactose residues of the primary wall. **Journal of Plant Physiology**. v.132, p.484-490, 1988.

BERGMEYER, H. U. GRASSL, M.; WALTER, H. E. **Methods of enzymatic analysis**. Verlag Chemie, Deerfield Beach, FL, 3. ed., v.2, p.157-158, 1983.

CONKLIN, P. L.; PALLANCA, J. E.; LAST, R. L.; SMIRNOFF, N. L-Ascorbic acid metabolism in the ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant *vtc1*. **Plant Physiology**. v.115, p.1277-1285, 1997.

CONKLIN, P.L.; NORRIS, S.R.; WHEELER, G.L.; WILLIAMS, E.H.; SMIRNOFF, N.; LAST, R. Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid

(vitamin C) biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**. v.96, p.4198-4203, 1999.

DAVEY, M. W.; GILOT, C.; PERSIAU, G.; OSTERGAARD, J.; HAN, Y.; BAUW, G. C.; VAN-MONTAGU, M. C. Ascorbate biosynthesis in *Arabidopsis* cell suspension culture. **Plant Physiology**. v.121, p.535-543, 1999.

DAVIES, M. B.; AUSTIN, J.; PARTRIDGE, D. A. Vitamin C: Its chemistry and biochemistry. Royal Society of Chemistry, 1991, p.256.

DE GARA, L.; PACIOLLA, C.; TOMASI, F.; LISO R.; ARRIGONI, O. *<In vivo>* Inhibition of galactono- γ -lactone conversion to ascorbate by licorine. **Journal of Plant Physiology**. v.144, p.649-653, 1994.

DIOP, P. A.; FRANCK, D.; GRIMM, P.; HASSELMAN, C. High performance liquid chromatographic determination of vitamin C in fresh fruits from West Africa. **Journal of Food Composition Analysis**. v.1, p.265-269, 1988.

FINKLE, B. J.; KELLY, S.; LOEWUS, F. A. Metabolism of D-[1- 14 C]- and -[6- 14 C]glucurono-lactone by the ripening strawberry. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.38, p.332-339, 1960.

FOYER, C. H.; HALLIWELL, B. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. **Planta**. v.133, p.21-35, 1976.

GRUN, M.; LOEWUS, F. A. L-Ascorbic acid biosynthesis in the euryhaline diatom *Cyclotella cryptica*. **Planta**. v.160, p.6-11, 1984.

- GRUN, M.; RENSTROM, B.; LOEWUS, F. A. Loss of hydrogen from carbon 5 of D-glucose during of D-[5-³H,6-¹⁴C] glucose to L-ascorbic acid in *Pelargonium crispum* (L.) L'Her. **Plant Physiology**. v.70, p.1233-1235, 1982.
- HELSPER, J. P. F. G.; SAITO, K.; LOEWUS, F. A. L-ascorbic acid biosynthesis in *Ochromonas danica*. **Plant Physiology**. v. 69, p.465-468, 1982.
- HELSPER, J. P.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis and metabolism of L-ascorbic acid in Virginia creeper (*Parthenocissus quinquefolia* L.). **Planta**. v.152, p.171-176, 1985.
- HELSPER, J. P.; LOEWUS, F. A. Metabolism of L-threonic acid in *Rumex x acutus* L. and *Pelargonium crispum* (L.) L'Her. **Plant Physiology**. v.69, p.1365-1368, 1982.
- HOREMANS, N.; ASARD, H.; FOYER, C. H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. **Trends in Plant Science**. v. 5, p.263-267, 1998.
- HOROWITZ, H. H.; DOERSCHUK, A. P.; KING, C. G. The origin of L-ascorbic acid in the albino rat. **The Journal of Biological Chemistry**. v.199, p.193-198, 1952.
- HOROWITZ, H. H.; KING, C. G. The conversion of glucose 6-¹⁴C to ascorbic acid in the albino rat. **The Journal of Biological Chemistry**. v.200, p.125-128, 1953.
- ISHERWOOD, F. A.; CHEN, Y. T.; MAPSON, L. W. Synthesis of L-ascorbic acid in plants and animals. **Biochemical Journal**. v.56, p.1-15, 1954.
- ISHERWOOD, F. A.; MAPSON, L. W. Ascorbic acid metabolism in plants. II. Metabolism. **Annual Review in Plant Physiology**. V.13, p.329-350, 1962.
- JACKSON, G. A. D.; WOOD R. B.; PROSSER, M. V. Conversion of L-galactono-γ-lactone into L-ascorbic acid by plants. **Nature**. v.191, p.282-283, 1961.

- KEATES, S. E.; TARLYN, N. M.; LOEWUS, R. A.; FRANCESCHI, V. R. L-Ascorbic acid and L-galactose are sources for oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. **Phytochemistry**. v.53, p.433-440, 2000.
- KOSTMAN, T. A.; TARLYN, N. M.; LOEWUS, F. A.; FRANCESCHI, V. R. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. **Plant Physiology**. v.125, p.634-640, 2000.
- LEUNG, C. T.; LOEWUS, F. A. Ascorbic acid in pollen: conversion of L-galactono-1,4-lactone to L-ascorbic acid in *Lilium longiflorum*. **Plant Science**. v.39, p.45-48, 19985.
- LIBERT, B.; FRANCESCHI, V. R. Oxalate in plant crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.35, p.926-938, 1987.
- LOEWUS F. A.; KELLY S. The metabolism of D-galacturonic acid and its methyl ester in the detached ripening strawberry. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.95, p.483-493, 1961.
- LOEWUS, F. A. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. **Phytochemistry**. v.52, p.193-210, 1999.
- LOEWUS, F. A. Tracer studies of ascorbic acid formation in plants. **Phytochemistry**. v.2, p.109-128, 1963.
- LOEWUS, F. A.; GRUN, M.; LOEWUS, M. W. Biosynthesis and metabolism of L-ascorbic acid in plants. **Critical Reviews in Plant Science**. v.5, p.101-119, 1987.

- LOEWUS, F. A.; JANG, R. Further studies on the formation of L-ascorbic acid in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.23, p.205-206, 1957.
- LOEWUS, F. A.; JANG, R.; SEEGMILLER, C.G. The conversion of ^{14}C -labeled sugars to L-ascorbic acid in ripening strawberries. **The Journal of Biological Chemistry**. v.222, p.649-664, 1956.
- LOEWUS, F. A.; KELLY, S.; HIATT, H. H. Ascorbic acid synthesis from D-glucose-2- ^{14}C in the liver of intact rat. **The Journal of Biological Chemistry**. v.235, p.937-939, 1960.
- LOEWUS, F. A.; WAGNER, G.; YANG, J. C. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of the New York Academy of Science**. v.258, p.7-23, 1975.
- LOEWUS, F.A. Ascorbic acid and its metabolic products. In: Preiss J. Ed. **The biochemistry of plants**. v.14, p.85, Boca Raton, Academic Press, 1988.
- LOEWUS, F.A. L-Ascorbic acid: metabolism, biosynthesis, function. In: Preiss J. Ed. **The biochemistry of plants**. v.3, p.77, New York, Academic Press, 1980.
- LOEWUS, M.W.; BEDGAR, J.D.; SAITO, K.; LOEWUS, F.A. Conversion of L-sorbose to L-ascorbic acid by a NADP-dependent dehydrogenase in bean and spinach leaf. **Plant Physiology**. v.94, p.1492-1495, 1990.
- MAPSON, L. W.; BRESLOW, E. Biological synthesis of L-ascorbic acid: L-galactono- γ -lactone dehydrogenase. **Biochemical Journal**. v.68, p.395-406, 1958.
- MAPSON, L. W.; ISHERWOOD, F. A. Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of derivatives of D-galacturonic acid to L-ascorbate in plant extracts. **Biochemical Journal**. v.64, p.13-22, 1956.

- MAPSON, L. W.; ISHERWOOD, F. A.; CHEN, Y. T. Biological synthesis of L-ascorbic acid: the conversion of L-galactono- γ -lactone into L-ascorbic acid by plant mitochondria. **Biochemical Journal**. v.56, p.21-28, 1954.
- MOSER, U.; BENDICH, A. Vitamin C. In: L. J. Machlin, **Handbook of vitamins**. 2.ed., p.195, New York: Marcel Dekker, Inc., 1991.
- NAKAYAMA, T.; TERAZAWA, K.; KAWAKISHI, S. Cytotoxicity of glucosone in the presence of cupric ion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.40, p.830-833, 1992.
- NOCTOR, G. FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.49, p.249-279, 1998.
- ÔBA, K.; FUKUI, M. IMAI Y.; IRIYAMA, S.; NOGAMI K. L-galactono- γ -lactone dehydrogenase: partial characterization, induction of activity and role in the synthesis of ascorbic acid in wounded white potato tuber tissue. **Plant Cell Physiology**. v.35, p.473-478, 1994.
- ÔBA, K.; ISHIKAWA, S.; NISHIKAWA, M.; MIZUNO, H.; YAMAMOTO, T. Purification and properties of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. **Journal of Biochemistry**. v.117, p.120-124, 1995.
- OESTERHELT, C.; SCHNARRENBARGER, C. GROSS W. The reaction mechanism of phosphomannomutase in plants. **FEBS Letters**. V.401, p.35-37, 1997.
- OSTERGAARD, J.; PERSIAU, G; DAVEY, M. W.; BAUW, G.; MONTAGU, M. V. Isolation of a cDNA coding for L-galactono- γ -lactone dehydrogenase, an enzyme

- involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p.30009-30016, 1997.
- PALLANCA, J. E.; SMIRNOFF, N. Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbose and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. **Plant Physiology**. v.120, p.453-461, 1999.
- PALLANCA, J. E.; SMIRNOFF, N. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. **Journal of Experimental Botany**. v.51, p.669-674, 2000.
- PICÓN, A.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M.; CUQUERELLA, J.; DEL RÍO, M. A.; NAVARRO, P. Effects of precooling, packaging film, modified atmosphere and ethylene absorber on the quality of refrigerated Chandler and Douglas strawberries. **Food Chemistry**. v.48, p.189-193, 1993.
- RAUTENKRANZ, A. A. F.; LI, L.; MACHLER, F. MARTINOIA, E.; OERTLI, J. J. Transport of ascorbic and dehydroascorbic acid across protoplast and vacuole membranes isolated from Barley (*Hordeum vulgare* L. cv Gerbel). **Plant Physiology**. v.106, p.187-193, 1994.
- RAY, S. N. On the nature of the precursor of the vitamin C in the vegetable kingdom. I. Vitamin C in the growing pea seedling. **Biochemical Journal**. V.28, p.996-1003, 1934.
- RENTSTROM, B.; GRUN, M.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in *Chlorella pyrenoidosa*. **Plant Science Letters**. v.28, p.299-305, 1982.
- RIBÉREAU-GAYON, G. A study of the mechanism of synthesis and conversion of malic acid, tartaric acid and citric acid in *Vitis vinifera* L. **Phytochemistry**. v.7, p.1471-1482, 1968.

RIZZOLO, A.; FORNI, E.; POLESELLO, A. HPLC assay of ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables. **Food Chemistry**. v.31, p.77-79, 1984.

ROBERTS, R. M. The metabolism of D-mannose-¹⁴C to polysaccharide in corn roots. Specific labeling of L-galactose, D-mannose, and L-fucose. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.145, p.685-692, 1971.

ROBERTS, R. M.; HARRER, E. Determination of L-galactose in polysaccharide material. **Phytochemistry**. v.12, p.2679-12682, 1973.

SAITO, K.; NICK, J.A.; LOEWUS, F.A. D-glucosone and L-sorbose: putative intermediates of L-ascorbic acid in detached bean and spinach leaves. **Plant Physiology**. v.94, p.1496-1500, 1990.

SIENDONES, E.; GONZÁLEZ-REYES, J. A.; SANTOS-OCAÑA, C; NAVAS, P.; CÓRDOBA, F. B. Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean. L-galactono-γ-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. **Plant Physiology**. v.120, p.907-912, 1999.

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

SMIRNOFF, N. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. **Annals of Botany**. v.78, p.661-669, 1996.

SMIRNOFF, N.; CONKLIN, P. L.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v.52, p.437-467, 2001.

SMIRNOFF, N.; WHEELER, G.L Ascorbic acid in plants: Biosynthesis and function. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v.19, p.267-290, 2000.

- SMITH, J. J.; VERVERIDIS, P.; JOHN, P. Characterization of the ethylene-forming enzyme partially purified from melon. **Phytochemistry**. v.31, p.1485-1494, 1991.
- SOMERS, G. F.; KELLY, W. C.; HAMNER, K. C. Changes in ascorbic acid content of turnip-leaf discs as influenced by light, temperature, and carbon dioxide concentration. **Archives of Biochemistry**. v.18, p.59-67, 1948.
- SPICKETT, C. M.; SMIRNOFF, N.; PITT, A. R. The biosynthesis of erythroascorbate in *Saccharomyces cerevisiae* and its role as an antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**. v.28, p.183-192, 2000.
- SUARNA, C.; SOUTHWELL-KEELLY, P. T. Antioxidant activity of oxidation products of α -tocopherol and of its model compound 2,2,5,7,8-pentamethyl-6-chromanol. **Lipids**. v.26, p.187-190, 1991.
- WHEELER, G.L.; JONES, M.A.; SMIRNOFF, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. **Nature**. v.393, p.365-369, 1998.
- WILLIAMS, M.; LOEWUS, F. A. Biosynthesis of (+)-tartaric acid from L-[4- ^{14}C]ascorbic acid in grape and geranium. **Plant Physiology**. v.61, p.672-674, 1978.

8. RESUMO

Poucos trabalhos foram publicados envolvendo a biossíntese do AA em plantas desde sua descoberta em 1928. O mecanismo de biossíntese era um mistério até 1998 quando Wheeler, Jones e Smirnov demonstraram que a L-galactose é um precursor chave desta importante vitamina. Utilizando-se açúcares marcados e frios pudemos confirmar o mecanismo Smirnov-Wheeler de biossíntese do AA. Neste trabalho nós apresentamos os resultados alcançados usando alguns supostos precursores e alguns frutos como o morango, a goiaba e o mamão papaya, e alguns legumes como o brócolis, alguns deles ricos em AA. As técnicas de HPLC e espectrofotometria UV/VIS foram utilizadas na determinação do AA. Os vegetais foram mantidos em soluções dos precursores frios por 24 horas e então analisados quanto ao teor de AA. Os resultados do uso de compostos marcados foi analisado utilizando-se a cintilografia líquida (LSC). Os açúcares extraídos do brócolis, do mamão papaya e da goiaba que foram infiltrados com D-[U-¹⁴C] manose, L-[1-¹⁴C] galactose e D-[U-¹⁴C] glucose-1-P mostraram diferentes padrões de distribuição entre os açúcares envolvidos no mecanismo Smirnov-Wheeler de biossíntese do AA. Em folhas de goiabeira encontramos altos teores de ácido desidroascórbico e pequena quantidade de AA, diferentemente do conteúdo de AA nos frutos. Nossos resultados confirmaram que a L-galactono-1,4-lactona é um precursor bastante eficiente do AA em frutos e proveram algumas evidências do envolvimento da D-manose no mecanismo de biossíntese do AA em plantas.

9. ABSTRACT

Since the first isolation of the Ascorbic Acid (AA) in 1928, a few papers have been published leading with the determination the AA biosynthetic pathway in plants. This pathway was a mystery until recently when in 1998 Wheeler, Jones and Smirnoff demonstrated that L-galactose is a key precursor of this important vitamin. Using radiolabeled and non-radiolabeled sugars we were capable of giving support to the Smirnoff-Wheeler pathway of AA biosynthesis. In this work we present the results reached using some putative precursors and some fruits and vegetables as strawberry, guava, papaya and broccoli some of them very rich in AA. The techniques used for the AA analysis included UV/VIS spectrophotometry and HPLC methods. The fruits and vegetables were maintained in the solution of the non-radiolabeled precursors for 24 hours and then analyzed for the AA content. The results of the use of radiolabeled precursors were analyzed using liquid scintillation (LSC). The sugars extracted from broccoli, papaya and guava, that were supplied with D-[U- ^{14}C] mannose, L-[1- ^{14}C] galactose and D-[U- ^{14}C] glucose-1-P dipotassium salt were analyzed using HPLC amperometric method and LSC showed different pattern of distribution between the sugars involved in the Smirnoff-Wheeler AA biosynthesis pathway. In guava leaves we found a high content of dehydroascorbic acid and low amount of AA, unlikely of the content of AA in the fruit. Our results confirmed that L-galactono-1,4-lactone is a very effective precursor of AA in fruits and provided some evidence of the involvement of D-mannose in AA biosynthesis in plants.