

## **Análisis de la concentración en estado estacionario del radical ascorbilo en plántulas de soja determinado por espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica**

(Con 2 Tablas y 3 Figuras)

### ***Concentration analysis in steady-state of ascorbate radical in soybean seedlings determined by electronic paramagnetic resonancy***

(With 2 Tables & 3 Figures)

**Galatro Andrea, Ivan Rousseau, Susana Puntarulo**

**Resumen.** La Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) se ha desarrollado como un campo multifacético que emplea distintas técnicas que tienen en común la base de la absorción resonante de microonda por sustancias paramagnéticas. Ciertos radicales libres como el radical ascorbilo ( $A^\bullet$ ), muestran un espectro lo suficientemente estable de forma tal que pueden ser determinados directamente a temperatura ambiente. Los estudios incluidos en este trabajo demuestran claramente que esta metodología altamente sensible puede ser empleada exitosamente en sistemas biológicos. La exposición de plántulas de soja a radiación UV-B, fue estudiada como desencadenante de estrés oxidativo y se caracterizó el efecto sobre la concentración de radical  $A^\bullet$  en estado estacionario. Se realizó un análisis cinético mediante el planteo de un mecanismo fisicoquímico sencillo, que permitió estimar concentraciones en estado estacionario para el radical  $A^\bullet$ , que concuerdan adecuadamente con los valores obtenidos por EPR.

**Palabras clave:** Radical ascorbilo, EPR, radiación UV-B, estrés oxidativo

**Abreviaturas:**  $A^\bullet$ : radical ascorbilo,  $AH^\bullet$ : ascorbato,  $APx$ : ascorbato peroxidasa,  $AO$ : ascorbato oxidasa,  $DCMU$ : (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea),  $DHA$ : dehidroascorbato,  $DHAR$ : dehidroascorbato reductasa,  $DMSO$ : dimetilsulfóxido,  $EPR$ : espectrometría de resonancia paramagnética electrónica,  $Fd$ : ferredoxina,  $FNR$ : ferredoxina  $NADP^+$  óxido reductasa,  $GSH$ : glutatión reducido,  $HPLC$ : cromatografía líquida de alta performance,  $PS$ : fotosistema,  $R^\bullet$ : radical alquilo,  $RO^\bullet$ : radical alcoxilo,  $ROO^\bullet$ : radical peróxido,  $SOD$ : superóxido dismutasa,  $VDE$ : violaxantina de-epoxidasa.

Fisicoquímica-PRALIB, Departamento de Química Analítica y Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Correspondencia a: Dra. Susana Puntarulo -Fisicoquímica-PRALIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956 (C1113AAD) Buenos Aires, Argentina, Phone: 5411-4964-8244 Ext: 101 / Fax: 5411-4508-3646 Ext: 102 - e-mail: susanap@ffyb.uba.ar

Este trabajo ha sido financiado por subsidios provenientes de la Universidad de Buenos Aires, el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica. SP es miembro de la carrera del CONICET, AG se desempeña como becaria post-doctoral del CONICET e IR es becario de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica.

Recibido: 09.XI.2006; aceptado 29.XII.2006

**Abstract.** Electron Paramagnetic Resonance (EPR) has been developed as a versatile field that uses different techniques sharing the common feature of resonant microwave radiation absorption by paramagnetic substances. Certain free radicals, such as ascorbyl radical ( $A^\bullet$ ), show a stable spectrum, and can be directly detected by EPR at room temperature. Studies included in this work clearly show that this highly sensitive methodology can be successfully applied to biological systems. Exposure of plants to UV-B radiation was studied as a factor of oxidative stress in plants, and the effect on  $A^\bullet$  steady state concentration was analyzed. A kinetic analysis was performed considering a simple physical chemistry mechanism, which allowed the estimation of  $A^\bullet$  steady state concentration that properly parallels experimental values obtained by EPR.

**Key words:** Ascorbate radical, EPR, UV-B radiation, oxidative stress

## INTRODUCCIÓN

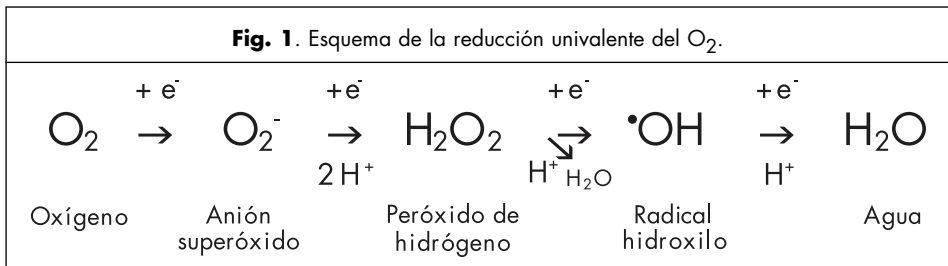
El ascorbato ( $AH^-$ ) es un antioxidante presente en numerosos sistemas biológicos. Es abundante en plantas, siendo su concentración 1-5 mM en las hojas, y alrededor de 25 mM en los cloroplastos (Wheeler y col., 1998; Asada, 1999). Durante su acción como antioxidante, el  $AH^-$  sufre dos oxidaciones consecutivas de un electrón produciendo radical ascorbilo ( $A^\bullet$ ) como intermediario en una primera etapa, y ácido dehidroascórbico (DHA) en la segunda etapa (Hubel y col., 1997) según la reacción 1.



La fácil detección de  $A^\bullet$  por Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) en sistemas biológicos complejos se debe a que tanto el  $AH^-$  como el DHA resultan espectroscópicamente silenciosos (Hubel y col., 1997). Además, el radical  $A^\bullet$  presenta una larga vida media en comparación con otras especies radicales (Buettner y Jurkiewicz, 1993) facilitando su determinación a temperatura ambiente.

La molécula de  $O_2$  es reducida a agua mediante la transferencia de cuatro electrones, en un proceso que se denomina reducción univalente del  $O_2$ , dando lugar a la formación de los intermediarios de la reducción parcial o especies activas del  $O_2$ , el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) (Boveris, 1998) (Fig. 1). En las células vegetales, se han descrito varios sitios capaces de producir especies activas del  $O_2$  en condiciones fisiológicas. Además de las mitocondrias, otras fuentes de producción de especies activas son los cloroplastos y los peroxisomas, las actividades de NADPH y NADH oxidasas localizadas en la membrana plasmática, peroxidasas, amino oxidasas y oxalato oxidasas apoplásticas (Bolwell y Wojtaszek, 1997). La producción y la destrucción de especies activas del  $O_2$  está íntimamente relacionada con el transporte fotosintético de electrones y su regulación. En los cloroplastos, el  $O_2$  es fotorreducido principalmente a nivel del fotosistema I (PSI) para dar lugar a la generación de  $O_2^-$ . El  $O_2^-$  generado dismuta a  $H_2O_2$  y  $O_2$  en una reacción que puede ser catalizada por la enzima CuZn-superóxido dismutasa (SOD) tilacoidal (Asada, 1999). Para evitar la generación  $\bullet OH$  a partir de la reacción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  catalizada por Fe, el  $H_2O_2$  es reducido a  $H_2O$  en una reacción catalizada por la enzima ascorbato peroxidasa (APx), dando lugar a la generación del radical  $A^\bullet$  (Asada, 1999; Ort y Baker, 2002). El radical  $A^\bullet$  también se genera en el lumen como producto de las reacciones responsables de la disminución de la eficiencia del

fotosistema II (PSII) para evitar la fotoinhibición bajo condiciones en las cuales la energía de los fotones está en exceso (Foyer, 1996). Otros procesos de generación de radical A• incluyen la donación de electrones del AH<sup>-</sup> a los fotosistemas, la interacción del AH<sup>-</sup> con especies activas del oxígeno (como por ejemplo O<sub>2</sub><sup>-</sup>, •OH), o con radicales orgánicos como el radical tocoferilo producido en membranas tilacoidales (Asada, 1999; Ort y Baker, 2002). La regeneración de AH<sup>-</sup> a partir del radical A•, involucra a la ferredoxina reducida a nivel tilacoidal (Miyake y Asada, 1994), y la actividad de la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDAR) en el estroma (Asada, 1999). Por otra parte, tanto el radical A• generado en el lumen como aquel que escapa al sistema de atrapamiento tilacoidal, dismuta espontáneamente a DHA y AH<sup>-</sup>. La enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) cataliza la reducción del DHA a AH<sup>-</sup> en una reacción dependiente de glutatión (GSH).



En las décadas de los años ochenta y noventa, como resultado de la actividad humana y en particular debido a la emisión de compuestos conteniendo halógenos, se observó una reducción en la capa de O<sub>3</sub>. Como consecuencia de la disminución del O<sub>3</sub> estratosférico, se han verificado incrementos significativos en el flujo de radiación UV-B (280-315 nm) que alcanza la superficie de la tierra (Madronich y col., 1995). La radiación ultravioleta puede producir daño y alterar procesos regulatorios a través de diversos caminos. En general, los efectos deletéreos en plantas incluyen la producción de radicales libres, daño al ADN, lípidos y proteínas y la inhibición parcial de la fotosíntesis (Caldwell y col., 1998). Uno de los principales sitios de daño por la exposición a radiación UV-B son los cloroplastos, con efecto sobre el transporte de electrones, la fosforilación y la fijación de carbono, con la consecuente declinación de la fotosíntesis (Bornman, 1989).

En el presente trabajo se describe el uso de la técnica de Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR) para el análisis de los niveles de radical A• en distintos sistemas vegetales. Se desarrolla, además, un tratamiento cinético para la estimación de la concentración de radical A• en estado estacionario, comprobándose un buen ajuste con los valores obtenidos en forma experimental.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material biológico.** Se utilizaron semillas de soja (*Glycine max*, var Hood) recientemente cosechadas, con un contenido de humedad del 10-12%, exhibiendo un porcentaje de germinación del 90-95%. Las semillas se colocaron en bandejas de plástico con algodón y papel de filtro embebidos en agua, en oscuridad a 26°C durante 48 h. Al cabo de ese tiempo, las semillas fueron transferidas a recipientes de plástico para cultivo hidropónico o macetas con tierra, según se indique, para completar el desarrollo de las plantas. En los experimentos relacionados con hojas

de plántulas de soja, las plántulas crecieron durante 7 (siete) días en solución nutritiva de Steinberg modificada (Tiffin, 1966) con fotoperíodos de aproximadamente 12:12 h luz:oscuridad a 26°C. La radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm, PAR) fue suministrada con una lámpara Philips 40-W *day-light-fluorescent light* a una fluencia de 38 W m<sup>-2</sup>. En los experimentos relacionados con cloroplastos de hojas de plántulas de soja, las plantas crecieron de 12 a 16 días con fotoperíodos 16:8 h luz:oscuridad en tierra a temperatura 26-28°C en una cámara en la cual recibieron 300 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> PAR.

**Tratamientos.** La radiación ultravioleta fue provista por una lámpara UV, UVM-57 Cromato-Vue lamp. La irradiancia espectral fue determinada con un radiómetro VLX (254-312-365 nm) (Laboratorio Nacional d'Essais, París, Francia). Para realizar los tratamientos con UV-B, la radiación UV-C fue filtrada a través de un filtro de acetato de celulosa, que no permite el paso de radiaciones por debajo de 290 nm. En los tratamientos controles se utilizó un filtro de Mylar Tipo S (0,13 mm) que absorbe las radiaciones por debajo de los 320 nm.

En la evaluación del efecto de la radiación UV-B a nivel de las hojas de soja, la dosis utilizada fue de 30 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (Kozak y col., 1997), la cual corresponde a una dosis de radiación biológicamente efectiva (UV-B<sub>pe</sub>) de 15 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>, calculada en base al espectro de acción general para plantas de Caldwell (1971) normalizado a 300 nm. Las determinaciones se realizaron en las hojas 24 h luego de la exposición. Para analizar el efecto de la radiación UV-B a nivel subcelular (cloroplastos de hojas de soja), plantas de 12 días de crecimiento en tierra fueron expuestas a 4 dosis consecutivas de radiación UV-B de 30 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> ó 60 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> (Galatro y col., 2001), las cuales corresponden a 15 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> ó 30 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> de radiación UV-B<sub>pe</sub>, calculadas en base al espectro de acción general para plantas de Caldwell (1971) normalizado a 300 nm. Las hojas fueron colectadas luego de transcurridas 24 h de la última irradiación y se realizó el aislamiento de los cloroplastos en forma inmediata.

**Aislamiento de cloroplastos.** El aislamiento de cloroplastos se realizó según Galatro y col. (2001). Se determinó la producción de O<sub>2</sub> dependiente de ferricianuro como medida de la integridad de los cloroplastos (Edwards y col., 1979).

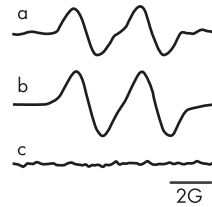
**Determinación del contenido de radical A•.** El contenido de radical A• fue determinado a temperatura ambiente en un Espectrómetro Bruker ECS 106 banda X, con una cavidad ER 4102ST. Los homogeneizados se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO). Se emplearon los siguientes parámetros instrumentales: poder de microondas, 10 mW; frecuencia de microondas, 9,75 GHz; campo centrado en 3487 G; constante de tiempo, 328 ms; tiempo de conversión, 82 ms; amplitud de modulación, 1 G; ancho de barrido, 15 G y frecuencia de modulación, 50 kHz (Buettner y Jurkiewicz, 1993). La cuantificación se realizó utilizando una solución acuosa de TEMPO, de acuerdo a Kotake y col. (1996).

**Determinación del contenido de AH•.** El contenido de AH• se determinó por HPLC de fase reversa, con detección electroquímica (potencial de oxidación 0,6 V) (Kutnink y col., 1987). Se realizaron los homogeneizados de hojas o cloroplastos en ácido metafosfórico al 10% (p/v). Se utilizó una columna Supelcosil LC-18 y la fase móvil consistió en ácido metafosfórico 0,8% (p/v) a un flujo constante de 1,0 ml min<sup>-1</sup>. Como estándar se utilizó una solución de ácido ascórbico preparada en el momento y titulada espectrofotométricamente a 265 nm ( $\epsilon = 14,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

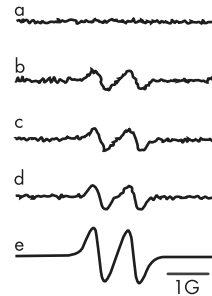
**Análisis estadístico.** Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Statview para Windows, SAS Institute Inc. Version 5.0, aplicando el análisis varianza (ANOVA).

**Fig. 2.** Espectros típicos de EPR correspondientes al radical A• en distintos sistemas biológicos. **A.** Detección de radical A• en hojas de soja. Hojas de soja homogeneizadas en DMSO, a; 500 µM AH• en DMSO, b; DMSO (control en ausencia de tejido), c. **B.** Detección de A• por EPR en cloroplastos aislados de hojas de plántulas de soja expuestas a radiación UV-B *in vivo*. DMSO (control en ausencia de cloroplastos), a; cloroplastos provenientes de plantas controles, b; cloroplastos provenientes de plantas irradiadas con 30 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> UV-B (UV-B<sub>ber</sub>, 15 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>), c; cloroplastos provenientes de plantas irradiadas con 60 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> UV-B (UV-B<sub>ber</sub>, 30 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>), d; espectro simulado por computadora utilizando parámetros espectrales correspondientes al A•: a<sub>H</sub> = 1,88 G y g = 2,0054, e. **C.** Detección de radical A• en hígado de rata. Solución reguladora de fosfato de potasio 40 mM pH=7,4: DMSO (1:1, v/v) (control en ausencia de tejido), a; hígado de rata en solución reguladora de fosfato de potasio 40 mM pH=7,4: DMSO (1:1, v/v), b y espectro simulado por computadora utilizando parámetros espectrales correspondientes al A• (la escala empleada es 10x la escala de los otros espectros), c. **D.** Contenido de radical A• en hojas de *G. magellanica*. Solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM pH=7,4: DMSO (1:1, v/v) (control en ausencia de tejido), a; espectro simulado por computadora utilizando parámetros espectrales correspondientes al radical A•, b; hojas de *G. magellanica* control (0 kJ m<sup>2</sup> d<sup>-1</sup>), c; hojas de *G. magellanica* expuestas a 6,5 kJ m<sup>2</sup> d<sup>-1</sup> UV-B<sub>ber</sub>, d.

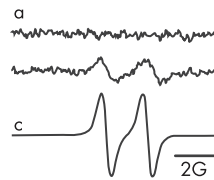
**A.** Detección de A• en hojas de soja



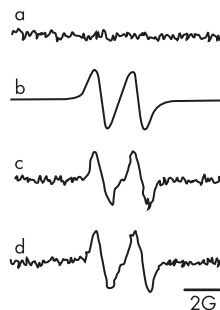
**B.** Detección de A• en cloroplastos de hojas de soja



**C.** Detección de A• en hígado de rata



**D.** Detección de A• en hojas de *G. magellanica*



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Detección del contenido de radical A<sup>•</sup> en hojas.** El radical A<sup>•</sup> pudo ser detectado tanto en hojas como en cloroplastos aislados de hojas de soja (Fig. 2 A y B). Se incluyó la determinación de una muestra animal caracterizada por un menor contenido tisular de AH<sup>-</sup> a los efectos de mostrar un valor comparativo (Fig. 2 C) y de hojas de *G. magellanica*, una planta nativa de Tierra del Fuego (Argentina), expuesta a altos niveles de radiación UV-B en su hábitat natural (Fig. 2 D) (Giordano y col., 2004). En todos los casos se evidenció el doblete característico de la señal de A<sup>•</sup>. Como condición de estrés oxidativo se empleó la exposición a radiación UV-B en los sistemas indicados. Los datos incluidos en la Tabla 1, provenientes de la cuantificación del contenido de radical A<sup>•</sup> en hojas de soja, hojas de *G. magellanica* y cloroplastos de hojas de soja, indican claramente que la respuesta frente a la radiación UV-B depende fuertemente del sistema en estudio que modula sus mecanismos particulares de respuesta frente al estrés oxidativo.

<b>Tabla 1.</b> Contenido de radical A <sup>•</sup> en hojas y cloroplastos			
<b>Radical A<sup>•</sup></b>			
	<b>Control</b>	<b>+ UV-B</b>	<b>Ref.</b>
Hojas de soja <sup>1</sup>	51 ± 4 nmol g <sup>-1</sup> PF	112 ± 12 nmol g <sup>-1</sup> PF*	Kozak y col. (1997)
Hojas de <i>G. magellanica</i> <sup>2</sup>	6,1 ± 0,2 nmol g <sup>-1</sup> PF	6,0 ± 0,1 nmol g <sup>-1</sup> PF	Giordano y col. (2004)
Cloroplastos <sup>3</sup>	1,0 ± 0,1 pmol mg <sup>-1</sup> prot	0,9 ± 0,2 pmol mg <sup>-1</sup> prot	Galatro y col. (2001)
<sup>1</sup> Plántulas de soja expuestas a 30 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> de radiación UV-B (radiación UV-B biológicamente efectiva, UV-B <sub>be</sub> 15 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ). <sup>2</sup> Estudios realizados con plantas de <i>G. magellanica</i> . La dosis de UV-B <sub>be</sub> utilizada fue de 6,5 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> . <sup>3</sup> Cloroplastos de hojas de plántulas de soja de 12 días de crecimiento expuestas a 4 dosis consecutivas de 30 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> de radiación UV-B (UV-B <sub>be</sub> , 15 kJ m <sup>-2</sup> d <sup>-1</sup> ). *Significativamente diferente del valor control, (ANOVA, p < 0,05)			

Por otra parte, los datos incluidos en la Tabla 2 muestran que el contenido de AH<sup>-</sup>, tanto en hojas como en cloroplastos aislados de hojas de soja, no se modifica significativamente frente a la exposición a 30 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> de radiación UV-B (UV-B<sub>be</sub>, 15 kJ m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup>).

<b>Tabla 2.</b> Contenido de AH <sup>-</sup> en hojas y cloroplastos			
<b>Contenido de AH<sup>-</sup></b>			
	<b>Control</b>	<b>+ 30 kJ m<sup>-2</sup> UV-B</b>	<b>Ref.</b>
Hojas de soja	0,7 ± 0,1 μmol g <sup>-1</sup> PF	0,8 ± 0,2 μmol g <sup>-1</sup> PF	Kozak y col. (1997)
Cloroplastos	2,3 ± 0,4 nmol mg <sup>-1</sup> prot	2 ± 1 nmol mg <sup>-1</sup> prot	Galatro y col. (2001)

### Evaluación de la concentración en estado estacionario de radical A•

#### Concentración en estado estacionario para el radical A• en hojas de soja controles y sometidas a condiciones de estrés oxidativo

En la Fig. 3, se esquematizan las reacciones de producción de radical A• y regeneración de AH<sup>-</sup> en las células de la hoja. Un análisis cinético de las vías de producción y consumo de radical A• indicadas en la Fig. 3 permite escribir las siguientes expresiones de velocidad para las reacciones de generación de A• (ec 1)

$$v_{\text{aparición de A}^\bullet} = v_1 + v_2 + v_3 + v_4 + v_5 + v_6 + v_7 + v_8 \quad [1]$$

$$d[A^\bullet]/dt = (d[A^\bullet]/dt)_{O_2} + (d[A^\bullet]/dt)_{H_2O_2} + (d[A^\bullet]/dt)_{O_2^-} + (d[A^\bullet]/dt)_{\bullet OH} + (d[A^\bullet]/dt)_{R^\bullet} + (d[A^\bullet]/dt)_{\text{tocopherol}\bullet} + (d[A^\bullet]/dt)_{PS} + (d[A^\bullet]/dt)_{VDE} \quad [2]$$

El término  $(d[A^\bullet]/dt)_{O_2}$  representa la velocidad de generación de A• debida a la oxidación del AH<sup>-</sup> por O<sub>2</sub> catalizada por la enzima ascorbato oxidasa (Smirnof, 2000). El término  $(d[A^\bullet]/dt)_{H_2O_2}$  representa la velocidad de generación de A• dependiente de la reacción de reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por AH<sup>-</sup> catalizada por la enzima ascorbato peroxidasa (APx) en cloroplastos, citosol y otros compartimentos (peroxisomas y mitocondrias). La generación de A• debida a la oxidación del AH<sup>-</sup> como consecuencia de la donación de electrones a los fotosistemas (Mano y col., 1997; Asada, 1999) se incluye en la expresión  $(d[A^\bullet]/dt)_{PS}$ . El término  $(d[A^\bullet]/dt)_{VDE}$  indica la velocidad de producción de A• dependiente de la oxidación de AH<sup>-</sup> catalizada por la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE), la cual participa en el proceso llamado *quenching* no fotoquímico (QNP) para la disipación del exceso de energía como calor. Esta enzima se encuentra localizada en el lumen de los cloroplastos y requiere la presencia de AH<sup>-</sup> y bajo pH (< 6,5) para catalizar la reacción (Müller-Moulé y col., 2002). En este proceso se oxidan dos moléculas de AH<sup>-</sup> a A• en el lumen de los cloroplastos. Para el AH<sup>-</sup>, el valor de Km para la enzima APx (0,3 mM) resulta menor que el valor de Km para la enzima VDE (3,1 mM) (Neubauer y Yamamoto, 1994). Por lo tanto, la actividad de la enzima APx representa una muy buena competidora para la actividad de la enzima VDE por este sustrato. Si bien ha sido recientemente indicado que la enzima VDE puede tener mayor afinidad para la forma protonada del AH<sup>-</sup> (Km 0,1 mM, Bratt y col., 1995), aún en estas condiciones existe al menos 30 veces más APx que VDE en los tilacoides. Por otra parte, las diferentes localizaciones de estas enzimas favorecen la reacción del AH<sup>-</sup> con la enzima APx debido a que al encontrarse en el estroma puede interactuar con el AH<sup>-</sup> previo a que este pueda alcanzar el lumen y reaccionar con la VDE (Müller-Moulé y col., 2002).

El A• puede ser generado a través de la reacción del AH<sup>-</sup> con radicales libres en reacciones de segundo orden, según la ecuación [3], donde k es la constante aparente de segundo orden de la reacción.

$$v = k [AH^-] [\text{radical}] \quad [3]$$

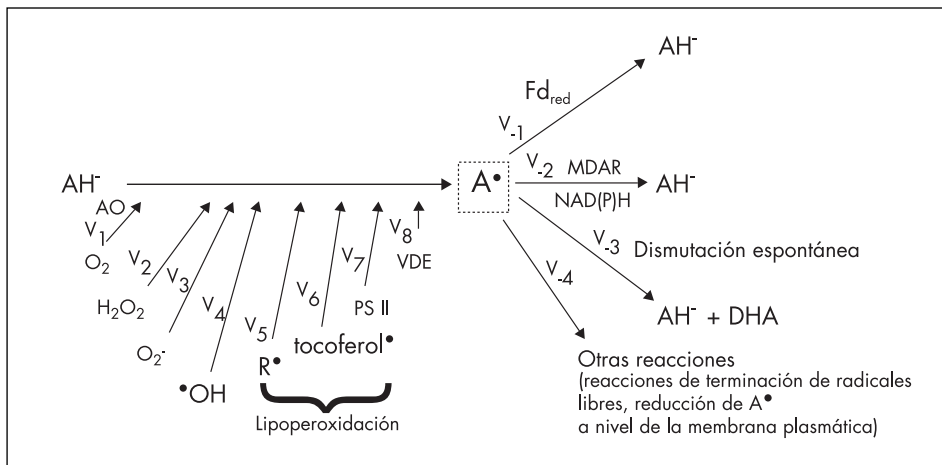
Teniendo en cuenta la inespecificidad de la reacción del •OH con las biomoléculas y considerando que las constantes de reacción de las reacciones no incluidas en la ecuación [4] son inferiores a 10<sup>5</sup>, es posible postular que las principales reacciones que determinan la velocidad de generación de A• son:

$$v_{\text{aparición de A}^\bullet} = d[A^\bullet]/dt = (d[A^\bullet]/dt)_{H_2O_2} + (d[A^\bullet]/dt)_{O_2^-} + (d[A^\bullet]/dt)_{(R^\bullet)} \quad [4]$$

El siguiente aspecto a considerar es la desaparición de A•. Las siguientes expresiones de velocidad engloban a las reacciones de consumo de A• de acuerdo con las vías indicadas en la Fig. 3:

$$v_{\text{desaparición de } A^{\bullet}} = v_{-1} + v_{-2} + v_{-3} + v_{-4} \quad [5]$$

$$v_{\text{desap. } A^{\bullet}} = -d[A^{\bullet}]/dt = (-d[A^{\bullet}]/dt)_{\text{Fd}} + (-d[A^{\bullet}]/dt)_{\text{MDAR}} + (-d[A^{\bullet}]/dt)_{A^{\bullet}} + (-d[A^{\bullet}]/dt)_{\text{otras reacciones}} \quad [6]$$

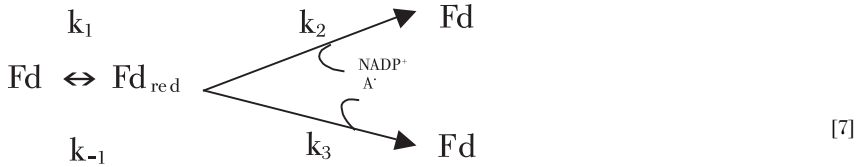


**Fig. 3.** Producción de radical  $A^{\bullet}$  y regeneración de  $AH^{\bullet}$  en las células de la hoja.

$v_1$ , velocidad de generación de  $A^{\bullet}$  debida a la oxidación del  $AH^{\bullet}$  por  $O_2$  catalizada por la enzima ascorbato oxidasa (AO),  $(d[A^{\bullet}]/dt)_{O_2}$ ;  $v_2$ , velocidad de generación de  $A^{\bullet}$  dependiente de la reacción de reducción de  $H_2O_2$  por  $AH^{\bullet}$  catalizada por la enzima ascorbato peroxidasa (APx),  $(d[A^{\bullet}]/dt)_{H_2O_2}$ ;  $v_3$ , velocidad de generación de  $A^{\bullet}$  dependiente de la reacción de  $AH^{\bullet}$  con el  $O_2^{\bullet-}$ ,  $(d[A^{\bullet}]/dt)_{O_2^{\bullet-}}$ ;  $v_4$ , velocidad de generación de  $A^{\bullet}$  dependiente de la reacción de  $AH^{\bullet}$  con el radical  $\bullet OH$   $(d[A^{\bullet}]/dt)_{\bullet OH}$ ;  $v_5$ , velocidad de generación de  $A^{\bullet}$  dependiente de la reacción de  $AH^{\bullet}$  con radicales lipídicos ( $R^{\bullet}$ ),  $(d[A^{\bullet}]/dt)_{R^{\bullet}}$ ;  $v_6$ , velocidad de generación de  $A^{\bullet}$  dependiente de la reacción de  $AH^{\bullet}$  con el radical tocoferilo (tocoferol $\bullet$ ),  $(d[A^{\bullet}]/dt)_{\text{tocoferol}\bullet}$ ;  $v_7$ , velocidad de generación de  $A^{\bullet}$  debida a la oxidación del  $AH^{\bullet}$  como consecuencia de la donación de electrones a los fotosistemas (PS),  $(d[A^{\bullet}]/dt)_{PS}$ ;  $v_8$ , velocidad de producción de  $A^{\bullet}$  dependiente de la oxidación de  $AH^{\bullet}$  catalizada por la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE),  $(d[A^{\bullet}]/dt)_{VDE}$ ;  $v_{-1}$ , velocidad de fotorreducción de  $A^{\bullet}$  por la ferredoxina reducida ( $Fd_{\text{red}}$ ),  $(-d[A^{\bullet}]/dt)_{\text{Fd}}$ ;  $v_{-2}$ , velocidad reducción de  $A^{\bullet}$  a  $AH^{\bullet}$  catalizada por la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDAR),  $(-d[A^{\bullet}]/dt)_{\text{MDAR}}$ ;  $v_{-3}$ , velocidad de regeneración de  $AH^{\bullet}$  a través de la reacción de dismutación de  $A^{\bullet}$  a  $AH^{\bullet}$  y DHA (dehidroascorbato),  $(-d[A^{\bullet}]/dt)_{A^{\bullet}}$ ;  $v_{-4}$ , velocidad de desaparición de radical  $A^{\bullet}$  por otras reacciones de menor importancia  $(-d[A^{\bullet}]/dt)_{\text{otras reacciones}}$ . Modificado de Heber y col. (1996).

En tejidos fotosintéticos la fotorreducción por la ferredoxina (Fd) a nivel de los cloroplastos cumple un papel muy importante en la regeneración del  $AH^{\bullet}$ . La  $K_m$  aparente para la fotorreducción de  $A^{\bullet}$  por la Fd es proporcional a la concentración de  $NADP^+$ . Consideraremos el siguiente esquema de reacción (Miyake y Asada, 1994):





donde Fd y Fd<sub>red</sub> representan las formas oxidadas y reducidas de la ferredoxina, respectivamente. La constante k<sub>1</sub> es la constante de velocidad de primer orden para la reducción de la Fd, la cual depende de la intensidad de luz; k<sub>-1</sub> es la constante de velocidad de segundo orden para la reacción entre la Fd<sub>red</sub> y los transportadores de electrones, a través del flujo alrededor del PSI; k<sub>2</sub> es la constante de velocidad de oxidación de la Fd<sub>red</sub> por NADP<sup>+</sup> mediada por la enzima Fd-NADP<sup>+</sup> óxido reductasa (FNR) y k<sub>3</sub> es la constante de velocidad para la oxidación de Fd<sub>red</sub> por A<sup>•</sup> en las membranas tilacoides. Se determinó un valor igual a 34 para la relación k<sub>3</sub>/k<sub>2</sub>, lo cual señala la importancia de la fotorreducción de A<sup>•</sup> frente a la reducción de NADP<sup>+</sup> en el PSI (Miyake y Asada, 1994). La velocidad de fotorreducción de A<sup>•</sup> está dada entonces por la siguiente ecuación :

$$v_{\text{fotorreducción de A}^\bullet} = (-d[\text{A}^\bullet]/dt)_{\text{Fd}} = k_3 [\text{Fd}_{\text{red}}][\text{A}^\bullet] \quad [8]$$

donde k<sub>3</sub> = 1,6 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> (Miyake y Asada, 1994).

El A<sup>•</sup> puede ser reducido a AH<sup>-</sup> por NADPH, a través de una reacción catalizada por la enzima MDAR, la cual se encuentra localizada en el estroma de los cloroplastos, en citosol y otros compartimentos (peroxisomas y mitocondrias). En los cloroplastos, asumiendo que la enzima está uniformemente distribuida en el estroma, la constante de pseudoprimer orden para la reacción se encuentra en el orden de 4 x 10<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> (Asada, 1999).

El consumo de A<sup>•</sup> ocurre también a través de la reacción de dismutación, por la cual dos moléculas de A<sup>•</sup> reaccionan espontáneamente para generar AH<sup>-</sup> y DHA. Es posible plantear entonces, la ecuación 9:

$$(-d[\text{A}^\bullet]/dt)_{\text{A}^\bullet} = k [\text{A}^\bullet]^2 \quad [9]$$

donde k = 2-3 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> a PH= 7 (Asada y Takahashi, 1987; Buettner y Jurkiewicz, 1993).

La desaparición de radical A<sup>•</sup> por otras reacciones de menor importancia se resumen en la expresión (-d[A<sup>•</sup>]/dt)<sub>otras reacciones</sub> las cuales pueden incluir reacciones de terminación de radicales libres o la reducción de A<sup>•</sup> que ocurre a nivel de la membrana plasmática probablemente mediada por el sistema cit b (Horemans y col., 1994; Smirnof, 2000).

Es decir que [A<sup>•</sup>] es un valor dinámico, determinado por la relación entre las velocidades de generación y decaimiento de esta especie. Así los niveles de A<sup>•</sup> en las hojas observados por EPR, reflejan el balance entre la velocidad de oxidación univalente del AH<sup>-</sup> y la combinación de las velocidades de reducción por la ferredoxina, la enzima MDAR y la dismutación espontánea del A<sup>•</sup> a AH<sup>-</sup> y DHA. Incrementos en la concentración de A<sup>•</sup> en estado estacionario, sin cambio en las velocidades de regeneración, representan condiciones de estrés oxidativo. Del mismo modo, cuando los sistemas de regeneración de AH<sup>-</sup> declinan, la producción constante de A<sup>•</sup> puede ocasionar un aumento en la concentración en estado estacionario del A<sup>•</sup>. Teniendo en cuenta el análisis cinético efectuado anteriormente, el uso de la determinación del contenido de A<sup>•</sup> como índice de estrés oxidativo en tejidos fotosintéticos requiere de un estricto conocimiento y control de las condiciones experimentales. Esto es así ya que el contenido de A<sup>•</sup> en estado

estacionario en tejidos fotosintéticos va a depender de factores como la luz y la concentración de  $\text{AH}^-$ , los cuales varían dependiendo de las condiciones de crecimiento de las plantas. Por otra parte, el uso directo del dato de la concentración en estado estacionario de  $\text{A}^\bullet$  como índice de estrés oxidativo, es razonable en aquellas situaciones en las cuales el contenido total de  $\text{AH}^-$  no se modifica. En otras situaciones en las cuales el contenido de  $\text{AH}^-$  se ve afectado por el tratamiento en estudio, es necesario considerar los efectos sobre la relación  $\text{A}^\bullet/\text{AH}^-$ .

Ha sido descrito que en hojas no sujetas a estrés ambiental, los niveles de  $\text{A}^\bullet$  detectados por EPR son muy bajos, debido a las reacciones de regeneración descritas anteriormente (Heber y col., 1996; Asada, 1999). Las señales de  $\text{A}^\bullet$  obtenidas utilizando secciones de hojas intactas en condiciones de iluminación, pueden atribuirse a la generación de  $\text{A}^\bullet$  en los cloroplastos, mientras que en oscuridad el sitio principal de generación es el citoplasma o la vacuola, y la regeneración de  $\text{AH}^-$  ocurre lentamente a través de la reducción de DHA (reacción catalizada por la enzima DHAR utilizando GSH como dador de electrones) el cual es producido en la reacción de dismutación del  $\text{A}^\bullet$  (Heber y col., 1996).

La determinación de  $\text{A}^\bullet$  no se realizó en hojas intactas sino en homogeneizados de hojas de soja en presencia de DMSO y sin iluminación. En estas condiciones, los homogeneizados de hojas de soja controles exhibieron en el espectro de EPR, un doblete característico con los parámetros espectrales correspondientes al radical  $\text{A}^\bullet$  ( $a_{\text{H}} = 1,88 \text{ G}$ ,  $g = 2,0054$ ). La actividad de la enzima APx determinada en homogeneizados de hojas de soja en condiciones fisiológicas fue  $0,72 \mu\text{mol AH}^- \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ prot}$ . Considerando un 70% de contenido de agua en la hoja, una concentración de proteínas promedio de  $15 \text{ mg g}^{-1} \text{ PF}$  y la no compartimentalización de la molécula, la velocidad de producción de  $\text{A}^\bullet$  dependiente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $(d[\text{A}^\bullet]/dt)_{\text{H}_2\text{O}_2}$ ) resulta igual a  $2,55 \times 10^{-4} \text{ M s}^{-1}$ . Considerando despreciable la reacción directa del  $\text{AH}^-$  con especies activas como  $\text{O}_2^-$  y radicales lipídicos ( $\text{R}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ,  $\text{ROO}^\bullet$ ) debido a su baja concentración, según la ecuación [4] y la reacción de dismutación del  $\text{A}^\bullet$  como el principal mecanismo de regeneración de  $\text{AH}^-$  (ecuación [9]), se puede calcular un valor para la concentración de radical  $\text{A}^\bullet$  en estado estacionario ( $[\text{A}^\bullet]_{\text{est est}}$ ) según la expresión [10] igual a  $36 \mu\text{M}$ .

$$(d[\text{A}^\bullet]/dt)_{\text{H}_2\text{O}_2} = -(d[\text{A}^\bullet]/dt)_{\text{A}^\bullet} = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} [\text{A}^\bullet]^2 \quad [10]$$

Esta concentración estimada de  $\text{A}^\bullet$  en estado estacionario resultó comparable al contenido de radical  $\text{A}^\bullet$  determinado por EPR en hojas de soja controles ( $71 \mu\text{M}$ ,  $51 \text{ nmol g}^{-1} \text{ PF}$ ), bajo las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo. Esta observación sugiere que las aproximaciones y suposiciones realizadas, llevan a la descripción de un mecanismo celular de generación y consumo de  $\text{A}^\bullet$  coincidente con los procesos fisiológicos *in vivo*.

La señal de  $\text{A}^\bullet$  se incrementó significativamente (120%) como consecuencia de la exposición de las hojas de soja a  $30 \text{ kJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  de radiación UV-B. En concordancia con estos resultados, Hideg y Vass (1996) describieron que en hojas de *Vicia faba* L. la exposición a una única dosis de radiación UV-B ( $29 \text{ kJ m}^{-2}$ ) produjo un incremento de cuatro veces en la señal de radical  $\text{A}^\bullet$ . Es decir que en las hojas sometidas a estrés por irradiación con UV-B la concentración de  $\text{A}^\bullet$  en estado estacionario resultó incrementada, sugiriendo el establecimiento de una nueva situación en la cual la reacción del  $\text{AH}^-$  con especies activas generadas tales como  $\text{O}_2^-$ ,  $\bullet\text{OH}$ , radicales lipídicos, radical tocoferilo, etc, podrían tener importancia. Sin embargo, mediante las medidas de EPR no se puede distinguir si el aumento en la concentración de radical  $\text{A}^\bullet$  en estado estacionario se debe a una sobreproducción de especies oxidantes o bien a una

disminución en la capacidad de regenerar AH<sup>-</sup> a partir del radical A• (Heber y col., 1996). Así, en hojas de soja, la relación A•/AH<sup>-</sup> resultó significativamente incrementada (92%) como consecuencia de la exposición de las plantas a radiación UV-B en comparación con las hojas controles, reflejando una situación de estrés oxidativo en forma temprana (24 h) debido a la interacción de la radiación UV-B con los tejidos vegetales.

### Concentración en estado estacionario para el radical A• en cloroplastos de hojas de soja controles y sometidas a condiciones de estrés oxidativo

Se determinó el contenido de radical A• en los cloroplastos provenientes de hojas controles y hojas expuestas a radiación UV-B. De acuerdo con las expresiones para la velocidad de generación de radical del A• descritas anteriormente [2], y considerando que la actividad de la enzima APx determinada en cloroplastos controles fue de 0,4 μmol AH<sup>-</sup> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> prot, con un contenido de clorofila de 58 μg mg<sup>-1</sup> prot y un volumen promedio para el cloroplasto de 50 μl mg<sup>-1</sup> clorofila (Polle, 2001), se obtiene una velocidad de reacción para la producción de A• dependiente de la enzima APx en los cloroplastos de 2,3 x 10<sup>-3</sup> M s<sup>-1</sup>. Considerando, como se planteó previamente, despreciables la velocidad de la reacción directa del AH<sup>-</sup> con •OH y radicales lipídicos, otras reacciones como la donación de electrones por el AH<sup>-</sup> a los fotosistemas y la oxidación de AH<sup>-</sup> catalizada por la enzima violaxantina de-epoxidasa, es posible plantear las siguientes ecuaciones para la velocidad de generación de A•:

$$d[A•]/dt = (d[A•]/dt)_{H_2O_2} + (d[A•]/dt)_{O_2} \quad [11]$$

$$d[A•]/dt = 2,3 \times 10^{-3} \text{ M s}^{-1} + 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} [O_2^-] [AH^-] \quad [12]$$

Teniendo en cuenta que la concentración de AH<sup>-</sup> determinada en los cloroplastos controles es 2,3 ± 0,4 nmol mg<sup>-1</sup> prot (0,8 mM) y considerando una concentración de O<sub>2</sub><sup>-</sup> de 0,001 μM (Asada, 1994; Polle, 2001), en condiciones fisiológicas la velocidad de aparición A• dependerá fundamentalmente de la actividad de la enzima APx. La determinación del contenido de A• por EPR, se efectuó en los cloroplastos aislados, en homogeneizados realizados en presencia de DMSO, sin iluminación. En estas condiciones, considerando sólo las reacciones de dismutación y la actividad de la enzima MDAR como principales responsables del consumo de A• y regeneración de AH<sup>-</sup>, es posible calcular un valor para la concentración de A• en estado estacionario ([A•]<sub>est est</sub>) en los cloroplastos igual a 5,7 x 10<sup>-6</sup> M, según las ecuaciones [13] y [14].

$$d[A•]/dt = -d[A•]/dt = (d[A•]/dt)_{H_2O_2} = (-d[A•]/dt)_{A•} + (-d[A•]/dt)_{MDAR} \quad [13]$$

$$d[A•]/dt = -d[A•]/dt = 2,3 \times 10^{-3} \text{ M s}^{-1} = 2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} [A•]^2 + 4 \times 10^2 \text{ s}^{-1} [A•] \quad [14]$$

Desde el punto de vista experimental, la integración de las señales de EPR correspondientes al radical A• en los cloroplastos controles permitió determinar una concentración de A• equivalente a 1 pmol mg<sup>-1</sup> prot. Considerando un contenido de clorofila de 58 μg mg<sup>-1</sup> prot, un volumen promedio para el cloroplasto de 50 μl mg<sup>-1</sup> clorofila (Polle, 2001) y la no compartimentalización de la molécula, la concentración de A• determinada experimentalmente resultó ser igual a 0,34 x 10<sup>-6</sup> M, no observándose diferencias significativas entre cloroplastos controles y aquellos provenientes de plantas expuestas a radiación UV-B. La diferencia observada entre el valor experimental y el calculado sugiere que al trabajar con cloroplastos aislados otras reacciones no consideradas en este planteo podrían cobrar relevancia. Sin embargo, el ciclo

SOD-AH-GSH sin incluir la reacción de regeneración de AH<sup>-</sup> dependiente de la Fd, parece ser un escenario adecuado ya que el valor de A<sup>•</sup> determinado experimentalmente en este trabajo es comparable a la concentración de radical A<sup>•</sup> (0,24 x 10<sup>-6</sup> M) estimada teóricamente en los cloroplastos por (Polle, 2001) utilizando un modelo metabólico. El A<sup>•</sup> es difícilmente detectado por EPR en condiciones de iluminación, indicando la inmediata reducción del A<sup>•</sup> (Asada, 1999) y en este sentido, determinaciones de EPR demuestran que la fotorreducción de A<sup>•</sup> dependiente de Fd mantiene los niveles de A<sup>•</sup> por debajo de 10 nM (Miyake y Asada, 1994).

Cloroplastos de plantas expuestas a radiación UV-B no mostraron un incremento en el contenido de A<sup>•</sup>. Esta falta de efecto de la radiación podría deberse al establecimiento de un intercambio activo entre los cloroplastos y el citosol (Luwe y col., 1993), o bien a que los mecanismos de reconversión de A<sup>•</sup> a AH<sup>-</sup> permanecieron eficientes luego de la exposición a radiación UV-B. Una situación similar fue informada por Miyake y Asada (1992), quienes describieron que luego del tratamiento de tilacoides con el herbicida DCMU, la reacción de Hill resultó afectada, aunque el contenido de A<sup>•</sup> no se modificó. Observaciones de Miyake y Asada (1992) y Foyer y Lelandais (1993) sugieren que el reciclado de AH<sup>-</sup> en los cloroplastos es probablemente el camino preferido para mantener el *pool* en altos niveles (10-50 mM) bajo condiciones fisiológicas (Foyer y col., 1983; Foyer, 1993).

La Espectroscopía de Resonancia Magnética Electrónica es el método de elección para el estudio de moléculas paramagnéticas, es decir de moléculas con electrones desapareados. Los estudios incluidos en este trabajo demuestran claramente que esta metodología altamente sensible puede ser empleada exitosamente en sistemas biológicos, ya que se observa un ajuste adecuado entre los valores experimentales y los predichos por el tratamiento cinético. Por otra parte, esta metodología resulta una herramienta adecuada para el análisis del efecto de situaciones de interés biológico, como la exposición de plantas a radiación UV-B. El estudio mecanístico presentado aquí posibilita una aproximación integrada al tema en estudio y abre la puerta a un estudio holístico de los sistemas biológicos que ayudará a entender los complejos mecanismos que rigen las repuestas de los organismos vivos frente a los desafíos que les plantean las condiciones ambientales. Este enfoque novedoso combina adecuadamente actividades vinculadas a la química biológica, la física y la fisicoquímica con el fin de promover el crecimiento del conocimiento de los complejos sistemas vivientes.

## REFERENCIAS

- Asada K, Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. En: Foyer, C.H. y Mullineaux, P.M. (eds), pp. 77-104. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton, USA. (1994).
- Asada K, The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50 (1999) 601.
- Asada K, M Takahashi, Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. En: Kyle, D.J., Osmond, C.B. y Arntzen, C.J. (eds), pp. 227-287. Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam (1987).
- Bolwell GP, P Wojtaszek, Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense-a broad perspective. Physiological and Molecular Plant Pathology 51 (1997) 347.
- Borrmann JF, Target sites of UV-B radiation in photosynthesis of higher plants. Photochemistry and Photobiology 4 (1989) 145.
- Boveris A, Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. Medicina 58 (1998) 350.
- Bratt CE, P-Q Arvidsson, M Carlsson, H-E Akerlund, Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and

- ascorbate concentration. *Photosynthesis Research* 45 (1995) 169.
- Buettner GR, BA Jurkiewicz, Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radical Biology and Medicine* 14 (1993) 49.
- Caldwell MM, Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. En: Giese, A.C. (ed), (1971) 131-177. *Photophysiology*, Academic Press, New York.
- Caldwell MM, LO Björn, JF Bornman, SD Flint, G Kulandaivelu, AH Teramura, M Tevini, Effects of increased solar ultraviolet radiation on terrestrial ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 46 (1998) 40.
- Edwards GE, R McC Lilley, S Craig, MD Hatch, Isolation of intact and functional chloroplasts from mesophyll and bundle sheath protoplasts of C4 plant *Panicum miliaceum*. *Plant Physiology* 63 (1979) 821.
- Foyer CH, Ascorbic Acid. En: Alscher, R.G. y Hess, J.L. (eds), (1993) 31-58. *Antioxidants in higher plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Foyer CH, Oxygen processing in photosynthesis. En: Burdon, R.H. y Hendry, G.A.F. (eds), (1996) 427-433. *Free radicals processes in plants*. 657th Meeting held at the University of Aberdeen, 18-21 December, 1995.
- Foyer CH, J Rowell, DA Walker, Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157 (1983) 239.
- Foyer CH, M Lelandais, The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. En: Yamamoto, H.Y. (ed), (1993) 88-101. *Photosynthetic responses to the environment*. American Society Plant Physiologists, Rokville, MD.
- Galatro A, M Simontacchi, S Puntarulo, Free radical generation and antioxidant content in chloroplasts from soybean leaves exposed to ultraviolet-B. *Physiologia Plantarum* 113 (2001) 564 .
- Giordano CV, A Galatro, S Puntarulo, CL Ballaré, The inhibitory effect of UV-B radiation (280-315 nm) on *Gunnera magellanica* growth correlate with increased DNA damage but not with oxidative damage to lipids. *Plant Cell and Environment* 27 (2004) 1415.
- Heber U, C Miyake, J Mano, C Ohno, K Asada, Monodehydroascorbate radical detected by electron paramagnetic resonance spectrometry is a sensitive probe of oxidative stress in intact leaves. *Plant and Cell Physiology* 37 (1996) 1066.
- Hideg E, I Vass, UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Science* 115 (1996) 251.
- Horemans N, H Asard, RJ Caubergs, The role of ascorbate free radical as an electron acceptor to cytochrome b-mediated trans-plasma membrane electron transport in higher plants. *Plant Physiology* 104 (1994) 1455.
- Hubel CA, VE Kagan, ER Kosin, M McLaughlin, JM Roberts, Increased ascorbate radical formation and ascorbate depletion in plasma from women with preeclampsia: implications for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 23 (1997) 597.
- Kotake Y, T Tanigawa, M Tanigawa, I Ueno, DR Allen, C Lai, Continuous monitoring of cellular nitric oxide generation by spin trapping with an iron-dithiocarbamate complex. *Biochimica et Biophysica Acta* 1289 (1996) 362.
- Kozak RG, G Malanga, A Caro, S Puntarulo, Ascorbate free radical content in photosynthetic organisms after exposure to ultraviolet-B. *Recent Research Development in Plant Physiology* 1 (1997) 233.
- Kutnink MA, WC Hawkes, EE Schaus, ST Omaye, An internal standard method for the unattended high-performance liquid chromatographic analysis of ascorbic acid in blood components. *Analytical Biochemistry* 166 (1987) 424.
- Luwe MWF, U Takahama, U Heber, Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology* 101 (1993) 969.
- Madronich S, RL McKenzie, MM Caldwell, LO Björn, Changes in ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Ambio* 24 (1995) 143.
- Mano J, T Ushimaru, K Asada, Ascorbate in thylakoid lumen as an endogenous electron donor to photosystem II: protection of thylakoids from photoinhibition and regeneration of ascorbate in stroma by dehydroascorbate reductase. *Photosynthesis Research* 53 (1997) 197.
- Miyake C, K Asada, Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant and Cell Physiology* 33 (1992) 541.
- Miyake C, K Asada, Ferredoxin-dependent photoreduction of the monodehydroascorbate radical in spinach thylakoids. *Plant and Cell Physiology* 35 (1994) 539.
- Müller-Moulé P, PL Conklin, KK Niyogi, Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiology* 128 (2002) 970.
- Neubauer C, HY Yamamoto, Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit the ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynthesis Research* 39 (1994) 139.

- Ort DR, NR Baker, A photoprotective role for O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* 5 (2002) 193.
- Polle A, Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* 126 (2001) 445.
- Smirnoff N, Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-facetted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3 (2000) 229.
- Tiffin LO, Iron translocation I. Plant culture, exudate sampling, iron uptake analysis. *Plant Physiology* 41 (1966) 510
- Wheeler GL, MA Jones, N Smirnoff, The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393 (1998) 365.