

# Bioenergética

Isaias Raw - Walter Colli



# **BIOENERGÉTICA**

por

**ISAIAS RAW e WALTER COLLI**

**Departamento de Bioquímica  
Faculdade de Medicina de  
Universidade de São Paulo  
São Paulo, Brasil**

**Departamento de Assuntos Científicos  
União Pan - Americana  
Secretaria Geral  
Organização dos Estados Americanos  
Washington, D.C. - 1967**

© Copyright 1967 by  
The Pan American Union  
Washington, D.C.

Direitos autorais registrados, 1967  
União Pan-Americana  
Washington, D.C.

*Esta monografia foi preparada para publicação no  
Departamento de Assuntos Científicos da União Pan-Americana*

*Coordenadora da Série: Eva V. Chesneau*

## INTRODUÇÃO

A coleção de monografias científicas faz parte dos programas gerais de informação e publicações do Departamento de Assuntos Científicos e tem por principal objetivo divulgar e apresentar de modo simples os novos temas e métodos que surgem com o rápido desenvolvimento das ciências e da tecnologia.

Atualmente, a coleção consta de quatro séries, em espanhol e em português, sobre física, química, biologia e matemática, mas constitui objeto de consideração a possibilidade de incluir outros ramos da ciência.

Desde o começo, essas monografias foram dedicadas aos professores e estudantes de ciência do nível secundário e do nível universitário básico. Espera-se, entretanto, que sejam elas acolhidas também pelos homens de ciência dedicados a pesquisas especializadas e pelo público em geral que se interesse em adquirir informações ou conhecimentos sobre a matéria.

Nesta oportunidade, a União Pan-Americana expressa seus agradecimentos à Agência de Desenvolvimento Internacional e à National Science Foundation, dos Estados Unidos, pela significativa assistência financeira prestada em apoio a este programa; aos Doutores Isaias Raw e Walter Colli, autores da monografia; e ao Professor Francisco J.S. Lara, do Departamento de Botânica da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Brasil, pela revisão técnica do manuscrito.

Jesse D. Perkinson  
Diretor



## PRÓLOGO

Subseqüentemente à Segunda Guerra Mundial tivemos grande desenvolvimento nas ciências de modo geral. Esse fenômeno foi surpreendente sobretudo nas ciências bioquímicas. Em praticamente duas décadas foram atacados com grande êxito muitos dos problemas apresentados pela respiração celular, fixação de  $\text{CO}_2$ , degradação e síntese de carboidratos, fotossíntese, estrutura, função e metabolismo dos ácidos nucleicos e finalmente estrutura e síntese de proteínas. Enquanto muitos problemas nessas áreas ainda aguardam solução, já estamos entrando numa nova área de pesquisa em que estão sendo estudados os mecanismos moleculares da percepção nervosa e do controle da informação genética.

V

Todo esse desenvolvimento não poderia deixar de influir sobre o ensino da bioquímica. Esta precisa hoje ser ensinada já nos cursos de graduação e não somente em cursos de pós-graduação como há anos atrás. Nesse sentido, o livro dos Drs. Raw e Colli representa uma contribuição positiva ao ensino da bioquímica.

O livro inicia-se com um capítulo geral no qual se observa que o organismo é na realidade máquina físico-química e que a finalidade do metabolismo é supri-la de energia. Encerra-se esse capítulo com uma breve noção sobre enzimas e seu papel no metabolismo.

Seguem-se então dois capítulos que tratam dos processos de libertação da energia química contida nos substratos e da maneira pela qual essa energia é capturada sob a forma de adenosinatri-fosfato (ATP). Estuda-se a seguir a maneira por que a energia do ATP pode ser utilizada na contração muscular, no transporte de íons, na bioluminescência e finalmente numa série de processos biossintéticos, entre os quais a biossíntese de proteínas. Nessa parte, são expostos os conceitos modernos sobre a realização da mensagem genética em termos de estrutura de proteínas.

O capítulo final trata da fotossíntese, que é sem dúvida um processo biológico da mais alta importância e fonte de praticamente toda a energia utilizada pelos organismos do planeta.

O livro dos Drs. Raw e Colli é especialmente apropriado para o professor secundário. Além disso, como o tratamento dispensado aos diversos temas é bastante simples, pode também ser lido e compreendido por pessoas que não tenham grandes conhecimentos de química. É um livro que dá uma excelente idéia da fase atual do desenvolvimento da bioquímica.

Francisco J.S. Lara

São Paulo, S. P., Brasil, outubro de 1967

# ÍNDICE

Página

Introdução ..... iii

Prólogo ..... v

## CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

As Formas de Energia e os Sêres Vivos ..... 1

Queimando os Alimentos ..... 3

Do Organismo à Célula ..... 5

Da Célula às Moléculas ..... 7

Como Agem as Enzimas ..... 7

Como São Formadas as Enzimas ..... 11

Os Grupos Ativos das Enzimas ..... 12

## CAPÍTULO 2. OXIDAÇÃO E FOSFORILAÇÃO

As Oxidações ..... 17

Mobilizando os hidrogênios ..... 18

Ativando o oxigênio ..... 20

A cadeia de transportadores ..... 20

A estrutura das mitocôndrias ..... 23

Métodos de estudo da cadeia de transporte

de elétrons ..... 25

Fosforilação Oxidativa ..... 27

Inibidores e Venenos ..... 30

## CAPÍTULO 3. FONTE DOS ELÉTRONS-METABOLIS- MO INTERMEDIÁRIO

Metabolismo da Glicose ..... 31

Produção de ácido pirúvico a partir da oxidação

da glicose (glicólise) ..... 31

Destino do ácido pirúvico ..... 33

O Ciclo de Krebs ..... 34

Produção de ATP Durante a Oxidação de Piruvato .... 35

Queimando Gorduras ..... 37

A Oxidação dos Aminoácidos ..... 42

## CAPÍTULO 4. UTILIZAÇÃO DA ENERGIA

Mecanismo da Contração Muscular ..... 45

Transporte de Íons Através de Membranas ..... 50

Bioluminescência.....	53
Processos Biossintéticos Gerais .....	56
Outros nucleotídeos envolvidos nas reações de biossíntese .....	57
Biossíntese de polissacarídeos .....	59
Biossíntese de lipídios .....	60
Biossíntese de proteínas e de ácidos nucleicos ..	63
A replicação .....	65
A transcrição .....	66
A tradução.....	67
CAPÍTULO 5. FOTOSSÍNTESE	
Como a Clorofila Participa do Processo de Fotossíntese .....	73
O Fenômeno da Fotofosforilação.....	76
Formação de Carboidratos na Fotossíntese .....	80
A estrutura dos cloroplastos .....	80
 Bibliografia .....	 81

## GENERALIDADES

## AS FORMAS DE ENERGIA E OS SÊRES VIVOS

O fogo atemorizou o homem primitivo, que finalmente conseguiu dominá-lo, produzindo-o e utilizando-o como fonte de calor e de luz. Desde então, o homem fascinou-se pelo fenômeno da combustão, e o nascimento da química e da bioquímica está intimamente ligado ao seu estudo.

Há quase dois séculos, Lavoisier, estudando a composição do ar, concluiu ser o oxigênio um elemento indispensável tanto para a manutenção da combustão como para a manutenção da vida. Tão remotas e fundamentais foram as comparações entre combustão e metabolismo que até hoje é comum imaginar que o organismo seja basicamente uma máquina térmica.

Com a Revolução Industrial, o homem passou a cogitar das *transformações de energia*, inventando máquinas que realizam essas transformações. Reconhecida tal possibilidade, a unidade de energia térmica, a *caloria*, passou a ser utilizada também como unidade de outras formas de energia, com certa freqüência. Assim, por exemplo, o valor energético dos alimentos é expresso em calorias, dando ao estudante que se inicia a impressão de que o organismo utiliza o calor como forma básica de energia.

No século passado, o engenheiro Carnot, estudando máquinas térmicas, chegou à conclusão de que o seu rendimento dependia de dois fatores: da temperatura do vapor de água empregado e da temperatura da água que se condensava. Em outras palavras, o rendimento de uma máquina térmica depende da diferença de temperatura entre duas fontes: a fonte quente e a fonte fria. Quanto maior for a diferença de temperatura entre as duas fontes tanto maior será o trabalho que a máquina é capaz de realizar. O homem, possuindo uma temperatura uniforme, isto é, não tendo uma fonte quente e uma fonte fria, não pode utilizar a energia térmica como forma de energia básica. De fato, o calor que se desprende das transformações metabólicas de aves e mamíferos seria totalmente inútil se, no decurso da evolução, esses animais não ti-

vessem adquirido a capacidade de utilizá-lo para manter o corpo a uma temperatura adequada e constante. Entretanto esses animais, ditos homotérmicos, não possuem um meio especial de produzir calor. Assim, por exemplo, quando sentimos frio, trememos. Isso quer dizer que recorreremos à contração muscular --uma forma de produção de energia mecânica de baixa eficiência-- para a obtenção de calor.

Os seres vivos intertransformam diversas formas de energia facilmente reconhecíveis. Todos se lembram do movimento devido à contração muscular como forma de produzir *energia mecânica*. O vaga-lume e o peixe elétrico nos mostram que é possível aos seres vivos atualizar a energia sob a forma de *lux* e de *eletricidade*. Ao falar produzimos *som*; e é do conhecimento geral que os morcegos se orientam pela emissão de *ultra-som*. Ao lado dessas formas de atualização da energia, existem outras ainda menos óbvias à primeira vista. Todos os seres vivos são capazes de sintetizar substâncias complexas necessárias à constituição das células. As plantas utilizam bióxido de carbono para produzir açúcar. Nesses processos utiliza-se energia para a formação de ligações químicas, havendo pois uma transformação de outros tipos de energia em *energia química potencial*. Essa forma de energia é a mais importante para a manutenção da vida, pois é dela que o organismo se utiliza para a síntese de substâncias essenciais, compensando assim a destruição contínua. Por outro lado, sabemos que os rins filtram 180 litros de sangue por dia através de finíssimas membranas que formam os glomérulos renais. Esses órgãos são capazes de concentrar líquido por remoção de água, glicose e sais, produzindo urina. Esse processo de concentração requer energia que o organismo atualiza sob a forma de *energia de transporte*.

2

As diversas formas de energia que os seres vivos utilizam provêm de transformações adequadas da energia recebida do meio exterior: a *energia luminosa* possibilita às plantas a realização da fotossíntese, durante a qual, se armazena *energia química potencial* nos alimentos. E por meio dos alimentos que os animais obtêm energia.

Haveria outras formas de energia em jogo? Uma forma especial de "energia vital" foi muitas vezes alvitrada por adversários de Lavoisier, Pasteur e outros cientistas que procuravam utilizar-se da física e da química para entender os processos biológicos. Seria, segundo esses adversários, uma forma de energia especial "própria dos seres vivos". Outras formas de energia foram ainda alvitradas e mesmo "descobertas" como responsáveis pela transmissão do pensamento. Há menos de trinta anos, o início da radiofonia e a descoberta da radioatividade induziram muitos a sugerir a idéia de que as células em divisão emitiriam uma forma de

radiação capaz de estimular outras células a se dividirem. Tais raios, a transmissão de pensamento ou a existência de outras formas de energia nos sistemas biológicos nunca foram cientificamente comprovados.

## QUEIMANDO OS ALIMENTOS

Saberia o leitor medir calor? Ante esta pergunta, provavelmente já estará o leitor pensando num termômetro. O termômetro, entretanto, mede apenas a temperatura, o que não equivale à medida da quantidade de calor. A medida da temperatura pelo termômetro indica tão somente a diferença de nível de calor entre dois pontos e permite saber em que sentido flui o calor. Essa medida seria comparável à altura de que cai a água numa usina hidrelétrica.

Lavoisier propôs-se a medir o calor produzido por uma cobaia, utilizando para isso um calorímetro de gelo. Colocou o animal rodeado de gelo no interior de uma caixa e, depois de certo tempo, medindo a quantidade de água formada, calculou a quantidade de calor produzido.

Sabe-se que um grama de gelo necessita de 80 calorias para liquefazer-se. Utilizando esse dado e sua imaginação, reproduza a experiência de Lavoisier, exprimindo a quantidade de calor produzido por um rato em calorias por quilo de peso por hora.

Lavoisier procurou ainda determinar rigorosamente a quantidade de oxigênio consumida e a de gás carbônico produzida por um ser vivo. Por volta de 1850, Regnault e Reiset, confirmando experiências de Lavoisier, colocaram animais dentro de uma caixa e mediram o oxigênio consumido. O bióxido de carbono expelido era retirado do ar por intermédio de cal sodada e a sua quantidade determinada pesando-se a cal sodada antes e depois da experiência.

Faça o leitor esta determinação, utilizando um dessecador; um tubo de vidro, com o qual construirá o manômetro; e cal sodada, que poderá obter em qualquer hospital, pois essa substância é usada nos aparelhos de anestesia para remover  $\text{CO}_2$ . Como líquido no interior do manômetro improvisado, o leitor poderá usar água (Fig. 1).

Conhecidas as quantidades de energia produzida, de  $\text{CO}_2$  formado e de oxigênio consumido, pode-se tentar comparar o rendimento energético de qualquer substância utilizada pelo organismo

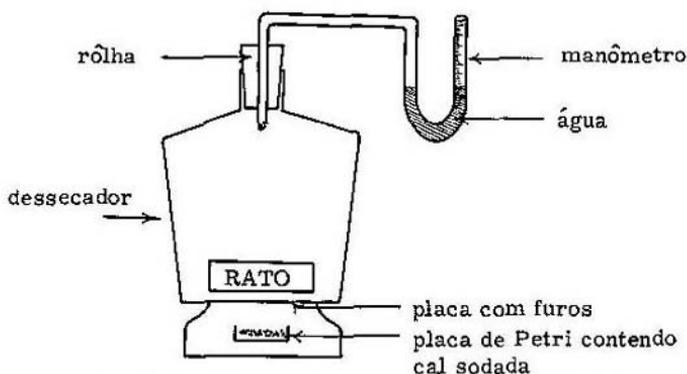
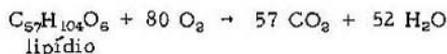
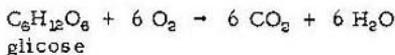


Fig. 1. Aparelho para medir consumo de  $O_2$  e produção de  $CO_2$ .

com o rendimento que essa mesma substância fornece quando oxidada em tubode ensaio. Foi o que Rubner fez, de forma brilhante, no século passado. Imagine o leitor duas moléculas sendo oxidadas totalmente: uma de glicose (carboidrato) e outra de um lipídio qualquer:



4

Dividindo-se a quantidade de gás carbônico produzido pela de oxigênio consumido, verifica-se que para a glicose a relação é de  $6/6 = 1$  e para o lipídio a relação é de  $57/80 = 0,71$ . Portanto, medindo-se o quociente respiratório, ou seja, a relação  $CO_2/O_2$ , pode-se ter um cálculo aproximado da proporção de açúcares e gorduras que o organismo está utilizando. Entretanto, ainda não nos ocupamos das proteínas, cujo consumo pode ser também facilmente estimado. Sabe-se que em média as proteínas contêm 16% de nitrogênio e que esse nitrogênio é eliminado na urina sob a forma de uréia, produto final do catabolismo das proteínas. Facilmente, pela quantidade de uréia eliminada na urina, calcula-se a quantidade de proteína que foi degradada pelo organismo.

Rubner, então, utilizando um calorímetro, comparou a quantidade de calor liberada pela combustão desses alimentos com a produção de calor de um indivíduo em repouso (não produzindo, pois, energia mecânica). Verificou aquele pesquisador que o rendimento energético era praticamente o mesmo, demonstrando que o ser vivo se comporta dentro das leis da termodinâmica e da termoquímica.

## DO ORGANISMO À CÉLULA

No fim do século passado, seguindo os passos de Regnault e Rubner, os cientistas construíam grandes aparelhos onde se colocavam homens e animais para o estudo de seu metabolismo em diversas condições: em repouso, após a administração de diferentes dietas, durante a digestão, o exercício e a atividade mental.

Em 1913-14, o grande cientista Otto Warburg empregou uma descoberta metodológica fundamental que transformou os grandes aparelhos num pequeno manômetro acoplado a um frasco. Com isso, passava-se a estudar o consumo de oxigênio não mais em indivíduos inteiros, mas sim em fatias de tecidos, pequenos fragmentos de órgãos, células e bactérias. Esse aparelho, conhecido como aparelho de Warburg, é constituído de um frasco onde se coloca o material que irá consumir oxigênio e, num pequeno subcompartimento do frasco, um papel de filtro embebido em hidróxido de sódio para remover todo o  $\text{CO}_2$  produzido. Esse frasco, que fica no interior de um banho a temperatura constante e sob agitação, é ligado a um manômetro que serve para medir a diminuição de pressão resultante do consumo de oxigênio. Embora construído inicialmente para medir consumo de oxigênio, o aparelho pode ser utilizado para medir qualquer reação que envolva utilização ou desprendimento de gás (Fig. 2).

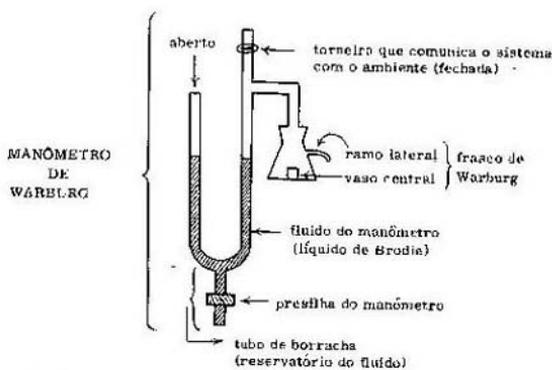


Fig. 2. Aparelho de Warburg. O consumo de oxigênio no frasco que está ligado ao ramo direito (fechado) do manômetro provoca queda em pressão, que é registrada por elevação do nível do fluido manométrico neste ramo e por abaixamento do nível do fluido no ramo esquerdo (aberto e, portanto, sujeito a uma pressão atmosférica constante). Ajusta-se então o nível do fluido no lado direito para a marca anterior predeterminada, com a presilha do manômetro. Isso causa abaixamento ainda maior do nível do fluido no ramo esquerdo. Medindo-se a diferença de altura entre esse nível e o nível inicial, é possível calcular a quantidade de oxigênio consumido.

Outro passo fundamental no estudo das reações biológicas foi a descoberta de diferentes técnicas de triturar tecidos. Pode-se fazer isso triturando o tecido num almofariz em presença de grãos de areia ou num liquidificador. Potter introduziu um aparelho constituído de um êmbolo que gira no interior de um tubo de vidro (Fig. 3).

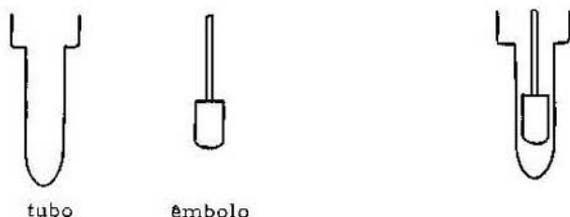


Fig. 3. Homogeneizador de Potter. O tecido é comprimido entre a parede do tubo e o êmbolo por meio de um movimento rotatório contínuo.

Por esses diferentes métodos conseguia-se transformar um tecido, por exemplo, um fígado, em uma suspensão homogênea conhecida pelos bioquímicos com o nome de "homogenato". Esse processo, além de romper a estrutura do tecido, destrói as membranas das células, liberando os seus componentes no meio homogeneizado.

6

Em 1946, Schneider e Hogeboom, sistematizaram um método de obtenção de estruturas intracelulares (organelas subcelulares). Esses autores homogeneizavam o tecido numa solução de sacarose que forma um meio viscoso e denso. Esse homogenato é então submetido a centrifugação a diversas velocidades. Assim, a uma velocidade relativamente baixa, que fornece aproximadamente uma força gravitacional mil vezes maior que a força gravitacional normal ( $1\ 000 \times g$ ), obtém-se um sedimento constituído de células que permanecem inteiras, membranas celulares, hemácias e núcleos. O material que fica em suspensão, após essa centrifugação, é submetido a forças gravitacionais maiores ( $15\ 000 \times g$ ), e o sedimento compacto que se obtém é formado de mitocôndrias, organelas que, veremos adiante, têm papel primordial na respiração celular. O sobrenadante remanescente é então centrifugado novamente a velocidades que fornecem uma força gravitacional de  $105\ 000 \times g$ . O precipitado compacto que se obtém é formado de partículas menores, denominadas microsomas, que nada mais são do que pequenos pedaços do retículo endoplasmático, rede de membranas que atravessam o interior da célula em todas as direções e que têm relações com as membranas citoplasmática e nuclear.

Obtido um modo de isolamento das organelas, tornou-se possível estudar minuciosamente os processos bioquímicos intracelulares.

## DA CÉLULA ÀS MOLÉCULAS

Outra linha de investigação não menos importante foi o estudo da fermentação alcoólica pela levedura de cerveja que, sem consumir oxigênio, transforma glicose em álcool etílico e  $\text{CO}_2$ :



Pasteur estabeleceu que essa reação é produzida por um ser vivo; a levedura ou fermento. Büchner demonstrou que matando a levedura, isto é, destruindo a sua estrutura celular, ela é ainda capaz de produzir fermentação alcoólica. Harden, colocando o extrato de levedura num saco de celofane e mergulhando-o num grande recipiente com água (processo de diálise), demonstrou que certos compostos químicos, constituídos de pequenas moléculas que pertencem ao extrato de levedura, escapam do saco de diálise, passando pelos poros do celofane, e o extrato perde a sua capacidade de fermentar. Entretanto, adicionando-se ao extrato os compostos perdidos durante a diálise, volta a verificar-se o fenômeno da fermentação alcoólica. O extrato de levedura foi então dividido por aquele pesquisador em dois componentes: um, que fica no saco de diálise e que se denomina apoenzima; e o outro, que sai do saco de diálise, chamado coenzima. A apoenzima de Harden foi intensamente estudada e a partir dela foram isoladas doze enzimas diferentes que catalisam, em reações sucessivas, a transformação de glicose até álcool.

7

## COMO AGEM AS ENZIMAS

Que faria o leitor para queimar um pedaço de pano? Certamente aproximaria dele um fósforo aceso. Como age o fósforo? Se a transformação do pano em gás carbônico e água é uma reação exotérmica, por que é necessário fornecer-lhe calor para que ele se queime? E por que, uma vez que começa a queimar-se, não mais precisamos aquecê-lo?

Para tentar responder a essas perguntas tomemos outro exemplo. Coloque uma bola sobre uma tábua inclinada. Claro está que a bola terá energia potencial suficiente para fazê-la deslizar até o chão. A diferença de energia potencial entre o estado primitivo e a nova posição ocupada pela bola é a mesma que se ela caísse da primeira posição livremente na vertical (considerando-se desprezível o atrito entre a bola e a tábua). Suponha agora que a bola se mantenha na posição primitiva sobre a tábua, presa por um pequeno obstáculo, qual seja uma tira de papelão colada sobre a tábua, que a impeça de deslizar (Fig. 4). A energia potencial da bola será a mesma que no caso anterior. Entretanto, para deslizar,

ela terá de vencer o pequeno obstáculo e, para vencê-lo, ter-se-á de fornecer-lhe uma quantidade de energia adicional que, no caso, pode ser representada por um pequeno empurrão.

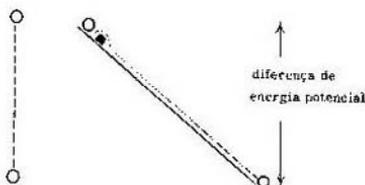


Fig. 4.

Para que uma determinada reação química -- como a queima de um pano -- ocorra, é preciso romper uma barreira que impede que ela se processe. A altura da barreira varia com a reação química e para cada reação química a energia que faz com que as moléculas transponham a barreira varia com a temperatura. Pelo aquecimento, fornecemos energia suficiente às moléculas para que saltem a barreira. Assim, à medida que o pano se queima, há liberação de energia suficiente para "aquecer" outras moléculas. Esse fato está esquematizado na figura 5.

Leve agora ao laboratório um cubinho de açúcar e tente queimá-lo. Para transformar o cubinho completamente em  $\text{CO}_2$  e água, o leitor terá bastante trabalho. Tente fazê-lo de outro modo: coloque um pouco de açúcar num copo e adicione ácido sulfúrico concentrado. O açúcar transformar-se-á numa espuma negra (umedecida com ácido) de carvão, mas a queima nessas condições não chegará à formação de  $\text{CO}_2$ . Formar-se-á apenas carbono elementar. Tome outro cubinho de açúcar e esfregue-o com cinza de cigarro. Pela aproximação de um fósforo aceso, o açúcar pegará fogo queimando-se lenta mas totalmente. A cinza de cigarro realiza no caso um "truque" impressionante, catalisando a reação de transformação do açúcar em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .

Nossas células, entretanto, fazem essa reação de modo mais espetacular ainda, sem lançar mão do ácido, do fósforo ou das cinzas de cigarro, à temperatura e nas condições que o nosso organismo lhes propicia. Para isso, as células lançam mão de catalisadores que elas mesmas produzem: as enzimas.

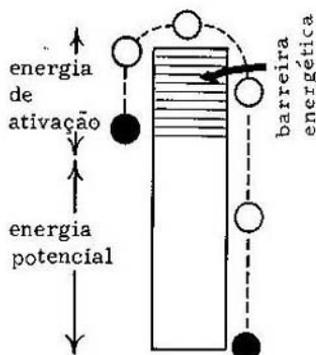


Fig. 5.

As enzimas são proteínas que, pela combinação química com as substâncias cuja transformação vão catalisar (chamadas substratos), diminuem a energia de ativação da reação. Isso ocorre porque o complexo intermediário formado --enzima-substrato-- exige menos energia de ativação para transpor a barreira energética. A reação então se processa e, ao seu término, dissociam-se o produto da reação e a enzima, cuja estrutura permanece inalterada (Fig. 6).

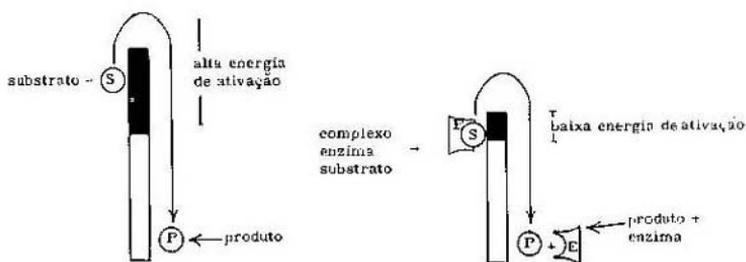


Fig. 6. Esquema para demonstrar a queda de energia de ativação necessária à reação quando a enzima atua pela combinação com o substrato.

Na realidade, a uma determinada temperatura, as moléculas de uma substância não têm todas a mesma quantidade de energia, obedecendo a uma curva de distribuição, como se vê na figura 7. Apenas as moléculas com mais energia conseguem atravessar a barreira energética. Aquecendo a substância, aumentamos o número de moléculas que podem transpor a barreira.

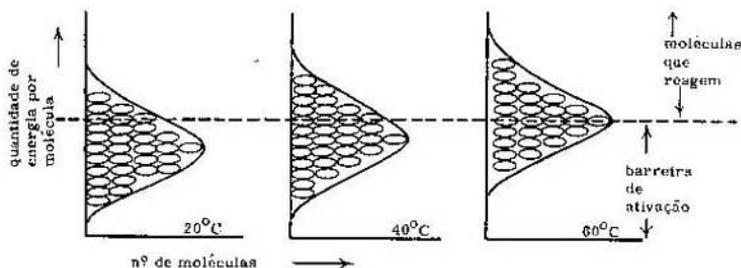


Fig. 7. Quanto mais aumentarmos a temperatura mais moléculas adquirem energia suficiente para atravessar a barreira de ativação.

Adicionando a enzima diminuimos a barreira (Fig. 8).

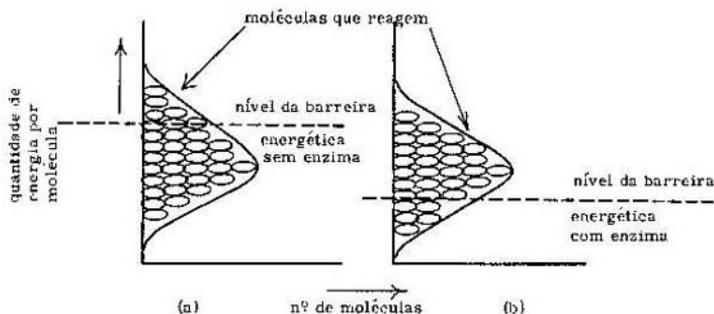
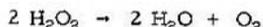


Fig. 8. Em (b) verifica-se que as moléculas de substrato reagindo com as moléculas de enzima têm de transpor uma barreira energética menor do que as moléculas de substrato na ausência de enzima (a).

10

O leitor poderá comparar a velocidade de decomposição da água oxigenada (10 volumes), observando a formação de bolhas. Verifique se a água oxigenada colocada num tubo se decompõe. Experimente aquecê-la. Em outro tubo faça a mesma experiência, colocando uma gota de permanganato de potássio bem diluído (1/10 000). Num terceiro tubo adicione à água oxigenada uma gota de sangue ou um pedacinho de carne fresca. Nesses tecidos existe uma enzima, a catalase, que decompõe rapidamente a água oxigenada segundo a equação:

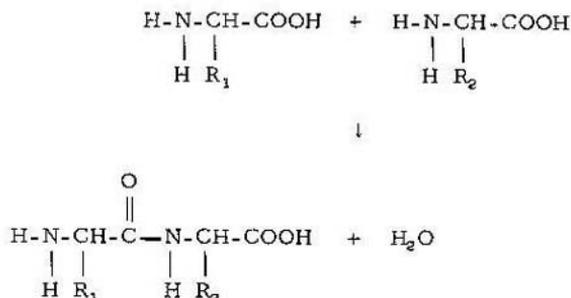


A energia de ativação necessária para iniciar a decomposição da água oxigenada é de 18 000 calorias/mol. O permanganato baixa essa energia para 10 000 e a catalase para 2 000.

Se a enzima catalisa uma reação em que estão envolvidos dois ou mais substratos, ela reage com esses substratos que se ligam em posições predeterminadas da molécula da enzima. Desse modo, a enzima orienta os grupos reativos dos diversos substratos, que ficam em posições adequadas, facilitando o rompimento da barreira energética. Entende-se que o fenômeno assim se processe porque seria extremamente difícil, à velocidade a que a reação enzimática ocorre, três substâncias reagirem por colisão casual justapondo certos pontos de suas superfícies.

## COMO SÃO FORMADAS AS ENZIMAS

Tôdas as enzimas são proteínas. Como tal, são macromoléculas, cujo pêso molecular varia de dez mil até meio milhão, formadas por aminoácidos unidos entre si pela ligação peptídica. Essa ligação é efetuada pela condensação entre o grupamento -COOH de um aminoácido e o grupamento -NH<sub>2</sub> do outro, com a eliminação de água. Isso é exemplificado abaixo pela reunião de dois aminoácidos genéricos em cujas fórmulas R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> representam radicais que diferem para cada aminoácido.



11

As cadeias peptídicas que normalmente ocorrem nas proteínas são formadas pela condensação de centenas de aminoácidos. Na época atual, principalmente, em virtude do desenvolvimento de métodos cromatográficos, é possível estabelecer a quantidade em que cada aminoácido existe numa proteína. Além disso, é possível também determinar a seqüência dos aminoácidos ao longo da cadeia peptídica. Esses estudos levaram à conclusão importante de que cada proteína tem uma composição que lhe é específica. Mesmo proteínas correspondentes, de diferentes espécies, diferem entre si, pelo menos em alguns aminoácidos. É o que ocorre com hemoglobinas quando se comparam homens, macacos e outros animais.

As enzimas são proteínas capazes de catalisar reações químicas. Essas proteínas podem, por meio de processos suaves e em geral a baixa temperatura, ser extraídas das células e purificadas. Entretanto, se as condições de extração forem drásticas (temperaturas relativamente altas, excesso de acidez ou basicidade no meio de extração), a proteína perde a sua atividade enzimática. É o chamado fenômeno da desnaturação.

A desnaturação de uma molécula de enzima não significa que suas ligações peptídicas tenham sido destruídas. É fato conhecido que proteínas e, portanto, as enzimas, têm uma estrutura muito mais complexa do que a simples combinação linear de seus aminoácidos.

Assim se demonstra que a molécula protéica existe no espaço sob a forma de uma hélice e que o eixo dessa hélice, em determinados pontos, muda de direção, formando um enovelado espacial cuja conformação depende da seqüência de aminoácidos. Além disso, os enovelados podem associar-se em número variável, formando uma estrutura de alta complexidade. Embora as ligações peptídicas sejam do tipo covalente, as ligações que permitem o dobramento da molécula no espaço são de ordem mais fraca. Assim sendo, estão sujeitas à destruição, se as condições utilizadas no manuseio da proteína não forem suaves; e, como veremos adiante mais pormenorizadamente, a atividade enzimática da proteína depende da sua estrutura espacial. A desnaturação é, pois, um reflexo da estrutura de ordem superior da molécula protéica.

## OS GRUPOS ATIVOS DAS ENZIMAS

Será a molécula inteira da enzima indispensável para catalisar a reação? Vejamos. Sabe-se que as enzimas são muito específicas, agindo sobre determinados compostos (substratos) e não atuando sobre compostos de estrutura química semelhante, o que pode ser bem exemplificado com a *fumarase*. A fumarase é uma enzima que catalisa a transformação de ácido fumárico em ácido d-málico (Fig. 9).

12

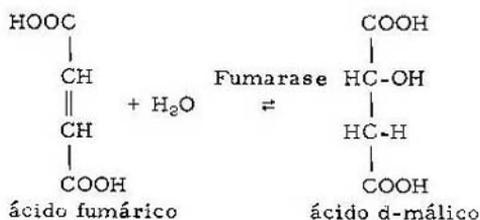
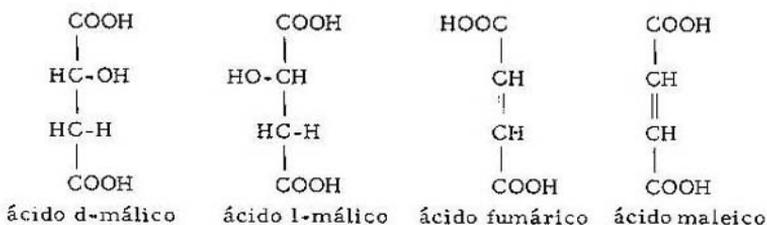


Fig. 9.

Existem dois isômeros óticos do ácido málico, o ácido d-málico e o ácido l-málico; e dois isômeros geométricos do ácido fumárico, o ácido fumárico e o ácido maleico:



A enzima, fumarase, atua somente sobre os ácidos fumárico e d-málico. Entretanto, a especificidade dessa enzima não se restringe apenas ao reconhecimento do isômero adequado. Estudando-se essa reação em presença de água pesada ( $D_2O$ ), isto é, água em que os átomos de hidrogênio da molécula foram substituídos por um isótopo, o deutério, teremos a formação de um ácido d-málico deuterado (Fig. 10).

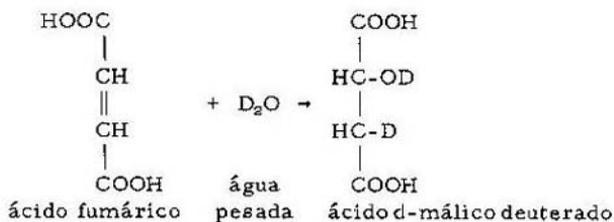


Fig. 10.

Como o leitor já deve ter notado (Fig. 9), a reação catalisada pela fumarase é reversível, isto é, a enzima catalisa a reação em ambos os sentidos. Podemos então, a partir do ácido d-málico deuterado, obter novamente o ácido fumárico. Usando a lógica das reações químicas, um químico orgânico esperaria que dessa reação resultassem dois compostos, um com deutério e outro sem deutério (Fig. 11).

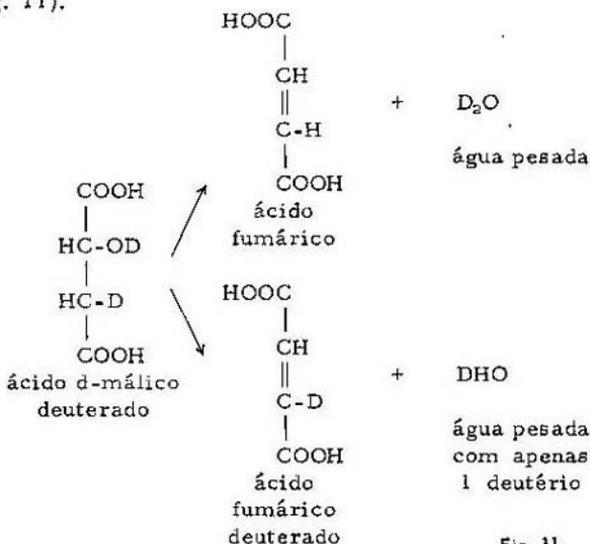


Fig. 11.

A análise dos produtos formados nessa reação revela apenas a existência de ácido fumárico *sem* deutério. Isso significa que a enzima

reconhece as duas "faces" do átomo de carbono às quais estão ligados os dois átomos de hidrogênio. Realmente, na experiência relatada acima, a enzima retirou o mesmo átomo de hidrogênio (no caso o deutério) que ela havia introduzido previamente na reação reversa (Fig. 10). Como se vê, a enzima reconhece não só um determinado isômero mas também a posição relativa dos átomos na molécula do substrato.

Pela leve alteração da estrutura química do substrato, obtêm-se substâncias que a enzima é incapaz de distinguir do verdadeiro substrato. Essas substâncias reagem com a enzima que não pode transformá-las e, em consequência, a reação não prossegue. No exemplo que estamos estudando, é o caso do ácido ftálico (Fig. 12):

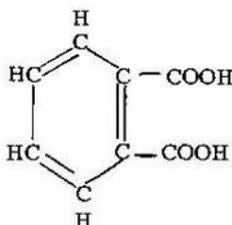
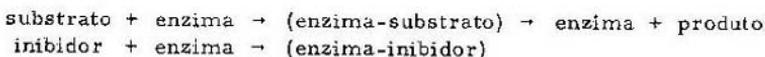


Fig. 12. Estrutura do ácido ftálico.

O ácido ftálico reage com a fumarase formando um complexo enzima-ácido ftálico (inibidor) inativo. Neste caso, a inibição da reação depende das concentrações relativas de inibidor e substrato, que competem pelos locais de ligação da superfície da enzima. Este é, pois, um exemplo de inibição competitiva.

Este exemplo nos informa que os inibidores ou os substratos naturais devem combinar-se com a enzima, formando um composto intermediário. Podemos então escrever genericamente que as reações que se passam durante a catálise são, respectivamente, para substrato e inibidor:



Pela utilização de processos físicos (modificação de cor ou de propriedades magnéticas), tornou-se possível a demonstração da existência do complexo enzima-substrato. No caso da catalase citado anteriormente, forma-se o complexo enzima-água oxigenada que se decompõe nos produtos água e oxigênio com uma velocidade de aproximadamente cinco milhões de vezes por minuto.

Se sabemos que os substratos e certos inibidores se combinam com as enzimas, podemos perguntar a que porção da molécula da enzima eles se ligam. Essa é uma indagação mais fácil de resolver quando as enzimas contêm, além da cadeia de aminoácidos, outros grupamentos químicos. É o caso das enzimas que contêm compostos metálicos na molécula como, por exemplo, a catalase, que contém ferro. Essa enzima perde totalmente a sua atividade se adicionarmos à reação cianeto, que reage com o ferro, inibindo a catálise. Conclui-se que o ferro deve tomar parte ativa na reação.

Repita a experiência da catalase, citada na página 10, tratando o homogenato previamente com uma gota de cianeto de potássio 0,1 M (tome cuidado ao manusear esta droga).

Dá-se o nome de núcleo prostético a um grupamento químico fortemente ligado à molécula da enzima e que participa do mecanismo da reação. Muitas enzimas contêm metais e substâncias derivadas de vitaminas como núcleos prostéticos.

Há enzimas, entretanto, que não possuem outros grupamentos químicos que não os aminoácidos que as constituem. Quais seriam os aminoácidos que participariam do mecanismo da catálise?

Um dos métodos utilizados para responder a essa pergunta é a inibição, por destruição ou por meio de uma reação de bloqueio específica, de determinados aminoácidos da molécula. Um dos modos mais simples é o da exposição da enzima à luz em presença de um corante chamado azul-de-metileno. Esse corante oxida apenas um dos aminoácidos da molécula: a histidina. Por meio desse processo tornou-se possível demonstrar que em determinadas enzimas a histidina é um grupamento ativo na catálise, pois a sua destruição inativa a enzima.

Uma enzima, a fosfoglicomutase, transfere o radical fosfato da molécula de glicose-fosfato da posição 1 para a posição 6:

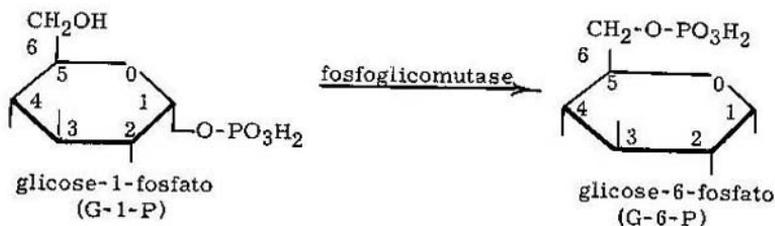


Fig. 13.

Usando-se fosfato radioativo, tornou-se possível demonstrar que a molécula de enzima durante a reação ficou radioativa. Concluiu-se que essa enzima atua doando fosfato à glicose numa posição e retirando-o de outra (Fig. 14).

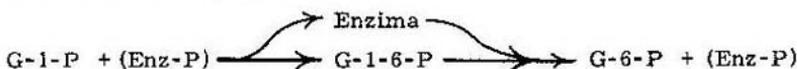


Fig. 14. Mecanismo de ação da fosfoglicomutase. A enzima fosforilada (Enz-P) forma o composto intermediário glicose-1-6-difosfato e numa fase subsequente retira o grupo fosfato da posição 1.

Verificou-se que o fosfato reage com a enzima num local onde existe uma molécula de serina. Um gás de guerra extremamente tóxico para o sistema nervoso, o diisopropil fluorofosfato (DFP), reage com a mesma molécula de serina na superfície da enzima que é o local de ligação do substrato. Esse gás, portanto, inibe um grupo de enzimas que agem por meio da serina como grupamento ativo. Entre elas encontram-se enzimas muito importantes para o funcionamento normal da transmissão nervosa e enzimas digestivas.

16

Métodos semelhantes permitiram a identificação dos grupos que participam ativamente da reação em determinadas enzimas. Em geral, os mais importantes são serina, histidina, lisina e cisteína.

Entretanto, para que esses grupos atuem, é necessário que eles estejam em posição adequada e essa posição no espaço é determinada pela configuração espacial da molécula, que depende da estrutura química do restante da cadeia. Desse modo, a retirada da molécula de grupos não essenciais impede que a enzima atinja a configuração espacial adequada e a enzima não funciona. No caso das enzimas digestivas, tripsina, quimotripsina e pepsina, a molécula ativa é obtida a partir de um precursor inativo que possui alguns aminoácidos a mais. Esses aminoácidos não permitem que a enzima atinja a configuração espacial necessária à atividade. Pela retirada desses aminoácidos, a enzima atinge tal configuração e passa a atuar. É o caso, por exemplo, da pepsina. O estômago produz um precursor inativo, o pepsinogênio, que chegando à luz do órgão é quebrado em duas moléculas pela ação do ácido clorídrico. Uma das moléculas assim formadas é a pepsina. Dessa forma as células do estômago que produziram a enzima se protegem de sua ação.

# 2

## OXIDAÇÃO E FOSFORILAÇÃO

### AS OXIDAÇÕES

Para obter energia os seres vivos utilizam-se de reações exergônicas. Reações exergônicas são todas as reações que se processam com liberação de certa quantidade de energia de forma utilizável para execução de trabalho. As reações exotérmicas são uma forma particular de reação exergônica em que há liberação de calor. As reações exergônicas mais importantes que ocorrem nos seres vivos são as reações de oxidação.

Do estudo da química o leitor certamente terá aprendido que um determinado elemento químico se oxida pela perda de um elétron. O fenômeno inverso, isto é, quando o elemento recebe um elétron, é denominado redução. Na figura 15 tem-se um exemplo de oxidação em que o cloreto ferroso ( $\text{FeCl}_2$ ), onde o ferro é bivalente ( $\text{Fe}^{++}$ ), se transforma em cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), onde o ferro é trivalente ( $\text{Fe}^{+++}$ ), pela emissão de um elétron.

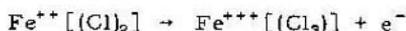


Fig. 15.

Da mesma forma a oxidação de uma molécula de hidrogênio ocorre como na figura 16.

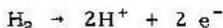


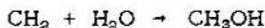
Fig. 16.

Algumas bactérias utilizam como fonte de energia a oxidação de compostos inorgânicos, mas a grande maioria dos seres vivos utiliza compostos orgânicos. Vejamos como se processa a oxidação de um composto orgânico, tomando como exemplo o mais simples deles, o metano ( $\text{CH}_4$ ). Seu produto de oxidação é um álcool chamado metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ). Como se pode ver, no caso das oxidações de compostos orgânicos, não se pode falar em alteração de valência. Na realidade, nesse tipo de oxidação, o elétron emitido pertence a um átomo de hidrogênio que, não possuindo mais o elétron de ligação com a molécula, é liberado sob a forma de próton.

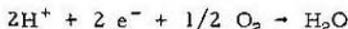
A reação se processa da forma descrita abaixo:



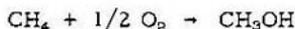
seguinte-se uma reação com água:



Se o oxidante, isto é, a substância que recebe os elétrons, for o oxigênio, os elétrons (e prótons) reagem com ele, formando água. Há, pois, uma redução do oxigênio:



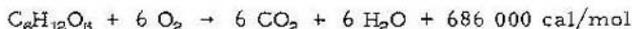
A soma das três reações parciais acima descritas dá a equação final:



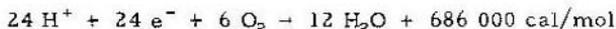
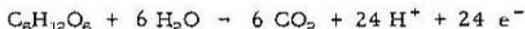
18 Dessa forma podemos concluir que a oxidação de substâncias orgânicas não foge à regra geral, sendo caracterizada pela emissão de elétrons. Entretanto, essa emissão é sempre acompanhada da liberação de um próton correspondente. Como o leitor já deve ter notado, toda oxidação é acompanhada da redução correspondente de uma substância que recebe os elétrons. Por isso, daqui por diante, quando nos referirmos a um processo de oxidação e redução, diremos abreviadamente processo de óxido-redução.

### Mobilizando os Hidrogênios

A combustão total da glicose pode ser descrita pela seguinte reação:



Essa equação pode ser subdividida, da mesma forma que fizemos com a oxidação do metano a metanol:



Realmente, pelo estudo detalhado do metabolismo intermediário, isto é, pela identificação de todas as reações que se processam durante a oxidação de uma molécula de glicose, verifica-se que são consumidas 6 moléculas de água e produzidas 12.

O estudo da respiração celular iniciou-se com observações feitas com um corante chamado azul-de-metileno. Esse corante na sua forma oxidada é azul, descolorando-se à redução. Há aproximadamente meio século, com a utilização do azul-de-metileno num tubo sem ar, iniciaram-se os estudos da respiração celular que evidenciaram a existência de catalisadores nos extratos celulares que permitem a transferência de elétrons de diversas substâncias (substratos) para o azul-de-metileno. Esses catalisadores, que nada mais são do que enzimas, receberam o nome genérico de *desidrogenases*. Esse nome é precedido do nome do substrato que fornece os elétrons (e os prótons). Tem-se assim a desidrogenase láctica, que oxida o ácido láctico; a desidrogenase alcoólica, que oxida álcool, e assim por diante.

Tome um pedaço de músculo de um animal recém-morto e triture-o num almofariz com areia do mar lavada em presença de um volume mínimo de solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%). A areia deve ser lavada previamente com ácido clorídrico 6 N e em seguida, exaustivamente, com água, até que todo o ácido seja removido. Transfira 2 ml desse extrato que contém células quebradas e adicione algumas gotas de azul-de-metileno numa solução a 1/1000. Há mudança de cor? Se há mudança de cor, processa-se ela uniformemente ou há alguma diferença entre o fundo do tubo e a superfície? Coloque noutro tubo igual número de gotas de azul-de-metileno e 2 ml de água. Junte uma pitada de hidrossulfito de sódio (também chamado ditionita, forte redutor usado na indústria e nos laboratórios). Note que o azul-de-metileno se descora e a cor reaparece quando agitamos o tubo ou borbulhamos ar. Podemos representar a reação que ocorre da seguinte forma:



Na figura 17 está descrito o processo de óxido-redução do azul-de-metileno:

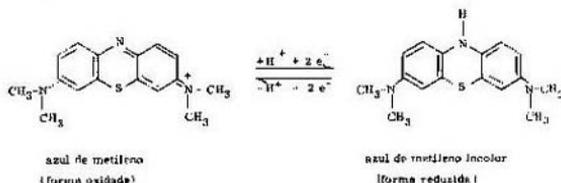
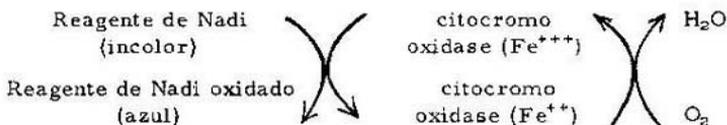


Fig. 17. Óxido-redução do molécula de azul-de-metileno.

## Ativando o Oxigênio

Warburg, estudando a célula, encontrou um pigmento respiratório semelhante à hemoglobina, que continha ferro e que, demonstrou-se posteriormente, é uma proteína ligada a um grupo heme que contém ferro e cobre. Essa proteína, denominada citocromo-oxidase, tem a capacidade de reagir com o oxigênio. O ferro tem grande afinidade pelo íon cianeto que atua inibindo a respiração celular pela combinação com a citocromo-oxidase.

Demonstre a atividade da citocromo-oxidase num extrato de tecido, usando o reagente de Nadi que é oxidado pela citocromo-oxidase tornando-se azul. Experimente também o efeito de uma gota de KCN 0,1 M nessa reação. A reação que se passa é a seguinte:



20

O reagente de Nadi é constituído de duas soluções: dimetilparafenilenodiamina (0,2% em água) e naftol (0,2% em álcool). O reagente de Nadi deve ser preparado no momento do uso, misturando-se partes iguais das duas soluções. Na figura 18 está descrito o processo de óxido-redução do reagente de Nadi.

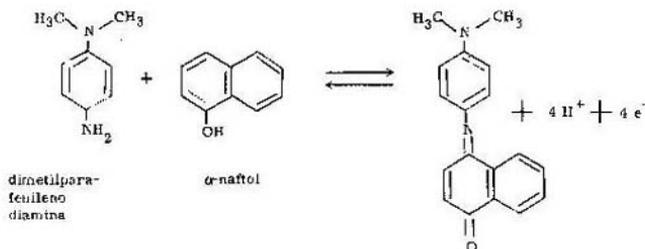


Fig. 18. Mecanismo de óxido-redução do reagente de Nadi.

## A Cadeia de Transportadores

Durante algum tempo travou-se uma polêmica entre os que acreditavam que a célula ativava o oxigênio e os que diziam que ela ativava hidrogênios. Graças aos trabalhos de Warburg e outros não menos famosos pesquisadores, esse problema foi esclarecido.

A célula tem nas mitocôndrias um complexo sistema de transportadores, desde as desidrogenases que ativam o hidrogênio até a citocromo-oxidase que ativa o oxigênio. Esses componentes foram isolados em estado puro e estudados. Os principais componentes do sistema de transporte são:

1. *Desidrogenases*: são enzimas que catalisam a oxidação de uma grande variedade de substratos. Elas atuam retirando elétrons (e prótons) da molécula de substrato e os entregam a uma coenzima derivada do ácido nicotínico, uma das vitaminas do complexo B; a nicotinamida adenina dinucleotídeo ou NAD (também conhecida como DPN). Deve ser salientado que as coenzimas têm a mesma função dos grupos prostéticos, com a diferença de que as coenzimas existem em estado livre, interagindo com a enzima no momento da reação, enquanto os grupos prostéticos são firmemente ligados à molécula da enzima e somente são separados dela por tratamentos físicos ou químicos mais drásticos. Na realidade, tanto as coenzimas como os grupos prostéticos não diferem essencialmente do que se entende por substrato. A única diferença entre substrato, coenzima e núcleo prostético está no maior ou menor grau de dissociação que essas substâncias apresentam em relação à molécula da enzima.

Na figura 19 está representada a molécula do NAD e, na figura 20, como ela interage com os elétrons provenientes do substrato.

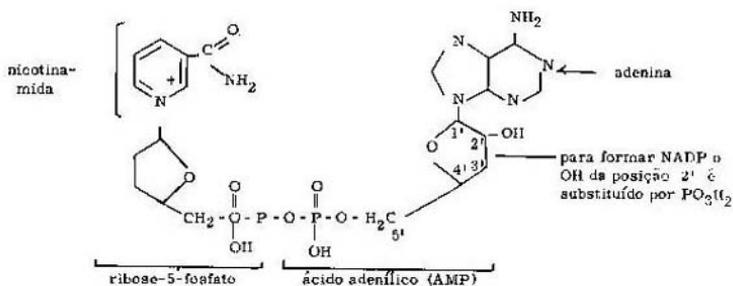


Fig. 19. Estrutura do NAD. Se o carbono 2' da ribose for esterificado por uma molécula de ácido fosfórico, tem-se o NADP (conhecido também como TPN), coenzima muito importante nas reações de biossíntese.

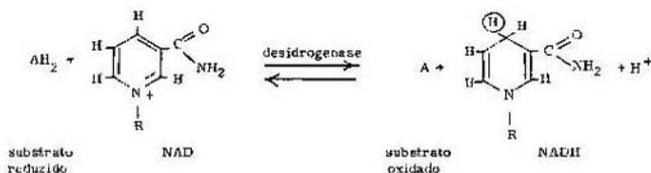


Fig. 20. Mecanismo de redução da molécula do NAD. Como se vê, esta molécula aceita somente um átomo de hidrogênio na posição assinalada com um círculo. O átomo de N do anel da nicotinamida, que na forma oxidada é pentavalente com uma carga positiva residual, torna-se trivalente pela neutralização da carga positiva pelo elétron do outro átomo de hidrogênio. Segue-se um rearranjo das ligações no interior do anel. Como se vê, a redução da molécula de NAD (ou NADP) é feita por um átomo de hidrogênio (elétron-próton) e um elétron. O próton remanescente fica em solução. É por isso que a forma reduzida do NAD é escrito como NADH. Entretanto, em alguns livros, o leitor poderá encontrar  $\text{NADH}_2$  para facilitar a notação.

2. *Flavoproteínas*: são enzimas que oxidam o NADH e têm como grupo prostético um derivado de outra vitamina (riboflavina=vitamina  $\text{B}_2$ ), o FMN, nome abreviado de flavina mononucleotídeo. Essas enzimas, por causa de seu núcleo prostético, têm, quando em solução, cor amarela. As flavoproteínas catalisam, pois, a transferência de elétrons (e prótons) para seu núcleo prostético que neste caso aceita, em virtude de sua estrutura, os dois átomos de hidrogênio nas posições 1 e 10 do anel (Fig. 21).

Desse modo, as flavoproteínas, na cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias, aceitam dois prótons e dois elétrons, que provêm da molécula de NAD reduzida. A oxidação das flavoproteínas se faz posteriormente pela seqüência de citocromos (Fig. 22).

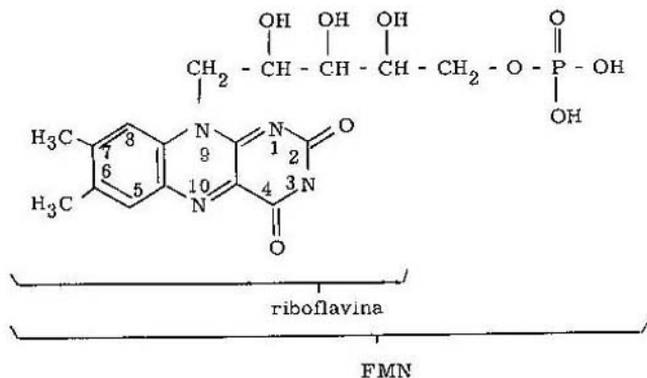


Fig. 21. Estrutura química do núcleo prostético das flavoproteínas. Se o radical fosfórico terminal 10r esterificado com uma molécula de ácido adenílico (ver figura 19), forma-se o FAD (flavina-adenina dinucleotídeo) que também é núcleo prostético de algumas flavoproteínas.

3. *Citocromos*: são pigmentos semelhantes à molécula de hemoglobina que contêm ferro no seu núcleo prostético. Este átomo de ferro é passível de sofrer óxido-redução, concluindo-se, portanto, que os citocromos, responsáveis pela oxidação das flavoproteínas, somente transportam elétrons. Existe na natureza um número considerável de citocromos que diferem entre si por propriedades físicas e químicas que são um reflexo das diferenças estruturais. Entretanto, esses citocromos podem ser classificados em três grandes grupos -- A, B e C -- sendo que os componentes de cada grupo recebem como nome a letra minúscula correspondente ao grupo seguida de um índice numérico. A passagem de elétrons pelos citocromos não necessita de enzimas adicionais. Ela se faz numa seqüência que obedece a uma ordem de eletropositividade de cada citocromo (b → c → a). Assim, os elétrons "pulam" de um citocromo de menor eletropositividade para outro de maior eletropositividade. Entretanto, os citocromos b e c não têm capacidade de reagir com o oxigênio. Dêsse modo, o último citocromo da seqüência reduz um citocromo do grupo A (citocromo-oxidase), que por sua vez reduz o oxigênio. Nessa reação, os prótons que foram liberados pela flavoproteína e que permaneceram em solução são utilizados na formação de água.

Essa cadeia de citocromos está bem estudada e é formada sucessivamente pelos citocromos b, c<sub>1</sub>, c. Este último reage com a citocromo-oxidase que, ela própria, parece ser formada por dois citocromos: a, a<sub>3</sub>, além de cobre. Assim, na figura 22, está descrita a seqüência de transporte de elétrons desde um substrato até a reação final com oxigênio.

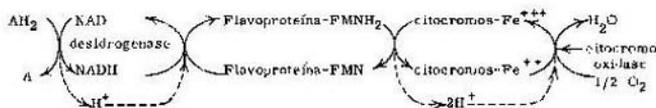


Fig. 22. Cadeia de transportadores da mitocôndria.

### A Estrutura das Mitocôndrias

As mitocôndrias são estruturas complexas de tamanho e formas variáveis. Em média, uma mitocôndria de fígado ou coração tem 2  $\mu$  de comprimento por 1  $\mu$  de espessura. Cada célula hepática tem aproximadamente 1000 mitocôndrias. Cada mitocôndria é

constituída de duas membranas: uma externa, lisa; e outra interna, que se dobra formando cristas que invadem a luz da organela. No espaço entre as cristas existe um material semifluido denominado matriz (Fig. 23).

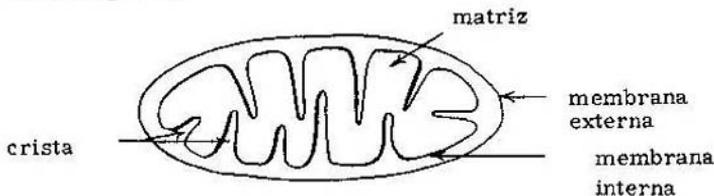


Fig. 23. Representação esquemática de um corte transversal de uma mitocôndria.

Cada membrana é formada por moléculas de lipídios (gordura) e proteínas, sendo que essas moléculas possuem uma orientação determinada. Assim, as moléculas de lipídios formam uma dupla camada rodeada por uma capa de proteína (Fig. 24).

24

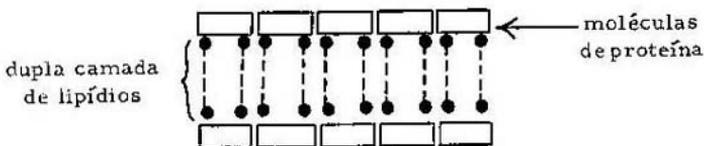


Fig. 24. Estrutura da membrana mitocondrial, onde as esferas representam grupamentos químicos que têm afinidade pela água e pelas proteínas.

Estudos complexos demonstram que os componentes da cadeia de transporte de elétrons não estão localizados livremente na matriz. Algumas desidrogenases, as flavoproteínas e os citocromos estão firmemente ligados às cristas mitocondriais, fazendo parte da constituição da membrana, e há indícios de que cada componente esteja localizado próximo do componente com o qual ele reage na seqüência descrita na figura 22. A membrana interna da mitocôndria seria, pois, formada de milhares de "unidades respiratórias" rigidamente ligadas às lipoproteínas estruturais (Fig. 25).

Dessa forma pode-se concluir que as reações de óxido-redução que ocorrem entre os componentes da cadeia respiratória não se fazem ao acaso pelo encontro de moléculas, como aconteceria se os transportadores estivessem livres numa solução. Há uma seqüência rígida, predeterminada, comparável a uma fila de operários

de construção que estivessem passando tijolos um para o outro até que o último operário colocasse os tijolos empilhados no fim da fila.

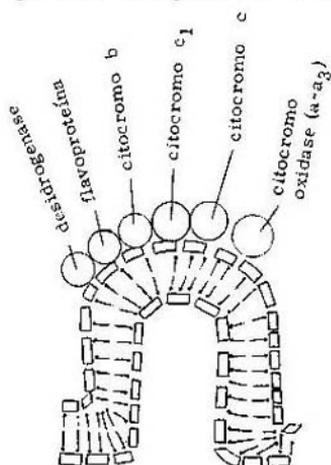


Fig. 25. Representação esquemática de uma unidade respiratória localizada na membrana interna da mitocôndria.

### Métodos de Estudo da Cadeia de Transporte de Elétrons

O estudo desta cadeia exige equipamento dispendioso e bastante complexo. A associação desta tecnologia com artifícios mais simples freqüentemente leva a descobertas importantes. Assim, tratando-se uma suspensão de mitocôndrias com solventes orgânicos (acetona, por exemplo), verificou-se que as organelas em estudo perdiam a capacidade de oxidar alguns substratos. Entretanto, a adição de uma substância chamada ubiquinona (ou coenzima Q) às mitocôndrias tratadas com acetona restaura a função respiratória. Estudos posteriores demonstraram que a coenzima Q participa do transporte de elétrons entre a flavoproteína e o citocromo c, não estando bem determinado o seu ponto de ação (ver Fig. 25). Entretanto, o fato de essa coenzima ser solúvel somente em solventes orgânicos leva à conclusão de que na membrana mitocondrial ela deve estar intimamente relacionada com a fração lipídica. A sua estrutura (Fig. 26) é muito semelhante à das vitaminas K, o que

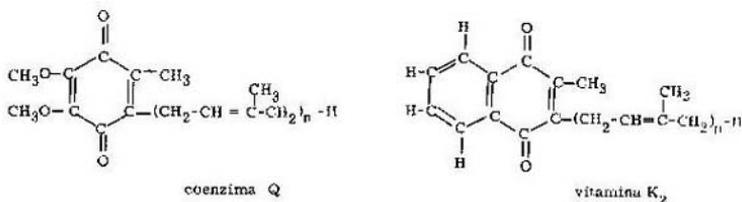


Fig. 26. Estrutura da coenzima Q e da vitamina K<sub>2</sub>.

faz sugerir uma participação, demonstrada em alguns casos muito específicos, dessas vitaminas nos processos de óxido-redução.

Outro modo de estudar os componentes da cadeia consiste na utilização de corantes.

Tome um extrato de músculo, preparado do modo anteriormente descrito, e junte o reagente de Nadi, esperando que ele fique visivelmente oxidado e, portanto, azul. Após a oxidação, bloqueie a reação com uma gota de KCN 0,1 M. Adicione então um substrato a ser oxidado, por exemplo, uma gota de uma solução neutra de ácido succínico. Observe o desaparecimento progressivo da cor, em virtude da redução do reagente de Nadi. É possível que não seja necessária a adição do substrato porque o extrato de músculo pode tê-lo em quantidade suficiente.

26 Ainda no estudo dos transportadores são utilizados aparelhos, denominados espectrofotômetros, que possuem um monocromador e, portanto, selecionam luz de um determinado comprimento de onda (cor). Cada transportador tem, em virtude de sua estrutura molecular, uma absorção maior ou menor de radiação em cada comprimento de onda. Com isso podemos construir o espectro de absorção de cada componente da cadeia. Como, para cada transportador, a absorção em determinado comprimento de onda é função do seu estado de óxido-redução e da sua quantidade, podem-se estabelecer relações quantitativas.

Obtenha de um laboratório de física um espectroscópio e coloque na entrada de luz um tubo de ensaio com um extrato diluído de músculo. Adicione uma pitada de hidrossulfito de sódio (em geral, no estado reduzido, a absorção dos transportadores é maior em determinados comprimentos de onda) e note o aparecimento de bandas de absorção: uma banda difusa, que esmaece os limites entre o violeta e o azul (em torno de 400 m $\mu$ ), correspondente a todos os citocromos; duas bandas nítidas à altura de 550 m $\mu$  (verde), correspondentes aos citocromos c e b; e uma outra banda mais à direita, próxima do amarelo, correspondente aos citocromos a-a<sub>3</sub>. Foi assim que Keilin, em 1925, demonstrou a existência de citocromos.

Inúmeros outros métodos ainda são utilizados, como, por exemplo, métodos associados à medida do consumo de oxigênio (um dois quais,

o aparelho de Warburg, descrito no Capítulo I, largamente usado ainda hoje). O microscópio eletrônico tem sido de grande valia, pois o bioquímico hoje, associando métodos bioquímicos com as técnicas de microscopia eletrônica, consegue visualizar fenômenos que antigamente somente poderiam ser previstos por meios indiretos.

## FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

No Capítulo 3 estudaremos pormenorizadamente quais são os substratos que durante os processos de óxido-redução fornecem elétrons para a cadeia de transporte de elétrons. No entanto, podemos adiantar ao leitor que a glicose é um deles. Já sabemos que a oxidação de uma molécula-grama (1 mol =  $6,02 \times 10^{23}$  moléculas) de glicose a gás carbônico e água libera uma quantidade de energia correspondente a 686 000 calorias. Entretanto, mesmo que a célula oxidasse apenas uma molécula (e não um mol) de glicose por vez diretamente, grande parte da energia liberada seria perdida sob a forma de calor, o que poderia causar à célula, no local dessa intensa liberação, um dano irreparável. A célula então contorna o problema, oxidando a glicose através de uma série de reações gradativas, todas catalisadas por enzimas. Em algumas dessas reações ocorrem processos de óxido-redução, pela participação de desidrogenases. Essas enzimas entregam então dois elétrons de cada vez à cadeia de transporte de elétrons que, ao funcionar, tem a principal

27

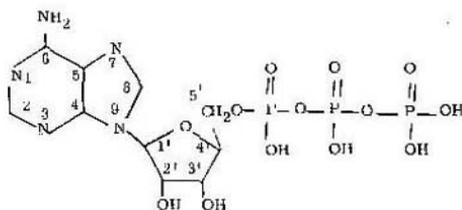


Fig. 27. Estrutura da molécula de ATP. Esta molécula é formada por uma base nitrogenada denominada adenina. As bases nitrogenadas formam um grupo de substâncias muito semelhantes, pois o anel cíclico é igual para todas. Existem duas subdivisões quanto à estrutura do anel: as pirimidinas, que contêm apenas os átomos numerados de 1 a 6; e as purinas, que contêm mais um anel acoplado numerado de 7 a 9. Os diferentes compostos que se enquadram na classificação de bases nitrogenadas diferem, principalmente, pelos diversos substituintes dos átomos do anel. No caso da adenina, que é uma purina, o carbono 6 tem como substituinte um grupo amino. Ligada à purina existe uma molécula de ribose (um açúcar formado por cinco átomos de carbono) que está representada na sua forma cíclica. Ligada à molécula de ribose tem-se uma sequência de três moléculas de ácido fosfórico. À retirada da molécula terminal de ácido fosfórico tem-se a estrutura do ADP. A retirada de duas moléculas terminais de ácido fosfórico forma o AMP (ácido adenílico) com o qual o leitor já entrou em contacto ao estudar a estrutura do NAD (ver figura 19).

função de *conservar parte da energia* que estava armazenada na molécula de glicose sob a forma de energia química potencial. Esse mecanismo de conservação da energia, que estudaremos a seguir, é denominado fosforilação oxidativa.

Durante os estudos de respiração em mitocôndria, observou-se que a oxidação de vários substratos (ou seja, a respiração com consumo de oxigênio) era estimulada quando se adicionava à reação, além de  $Mg^{++}$  que é um íon indispensável a muitas enzimas, íons fosfato e uma substância denominada ADP (adenosina difosfato). Estudando-se esse fenômeno, demonstrou-se que, durante o transporte de elétrons na mitocôndria, íons fosfato reagem com moléculas de ADP formando adenosina trifosfato, abreviado comumente como ATP (Fig. 27).

Verificou-se também que o máximo de rendimento para cada dois elétrons transportados e, portanto, para cada par de átomos de hidrogênio oxidado, é a formação de 4 moléculas de ATP a partir de 4 moléculas de ADP e 4 moléculas de fosfato inorgânico.

No estudo da hidrólise do ATP a ADP e fosfato inorgânico (que será doravante abreviado como  $P_i$ ), verificou-se que havia a liberação de 10 000 calorias por mol. Isso significa que a ligação pirofosfato entre ADP e  $P_i$  conserva energia correspondente a 10 000 calorias por mol.

28

Estudando as substâncias encontradas nas células que possuem grupamento fosfato, Lipmann conseguiu dividi-las em dois grandes grupos, um dos quais é um grupo de substâncias que, por hidrólise (cisão de uma ligação por reação com água), liberam uma quantidade de energia correspondente a mais de 5 000 calorias por mol. À ligação que retém essa quantidade de energia Lipmann deu o nome de ligação de alta energia. Por convenção, essa ligação é representada por um til (~) em vez da notação usual (-). Ao outro grupo de substâncias que possuem ligações que por hidrólise liberam menos de 5 000 calorias por mol, deu-se o nome de compostos de baixa energia (ligações de baixa energia). As ligações P-O-P encontradas na molécula de ATP (Fig. 27) são exemplos de ligações de alta energia.

Conclui-se, pois, que em condições de máximo rendimento a formação de 4 moles de ATP, para cada par equivalente de elétrons que é transportado pela cadeia de óxido-redução, conserva 40 000 calorias. Isso é importante porque a passagem de elétrons pela cadeia, desde o substrato até a formação de  $H_2O$ , libera uma energia total de 57 000 calorias para cada 2 átomos grama de hidrogênio transportados, isto é, para cada mol de água formado. O processo conserva, pois, teoricamente, 70% da energia dissipada durante a oxidação de substratos pelas mitocôndrias.

Como já discutimos anteriormente, a oxidação de uma molécula de glicose se faz em etapas, resultando na mobilização de 12 pares de hidrogênio. Entretanto, cada uma dessas doze etapas sofre uma nova subdivisão. Assim é que a liberação de energia desde o substrato até a formação de  $H_2O$  não se faz de uma só vez. A energia é dissipada em determinados pontos da cadeia durante o transporte de elétrons. Parte dessa energia é utilizada para a formação de ATP. Na figura 28 vêem-se os pontos da cadeia que liberam energia suficiente para formar uma molécula de ATP.

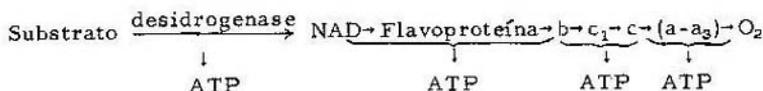


Fig. 28. Pontos de formação de ATP durante o transporte de elétrons.

Verifica-se, entretanto, que a liberação de energia suficiente para formar uma molécula de ATP entre o substrato e o NAD se dá em muito poucos casos e é chamada fosforilação ao nível do substrato. Para propósitos gerais, portanto, não será mais considerada doravante. Conclui-se, pois, que a cadeia de transporte subdivide a energia dissipada, em cada etapa da oxidação da glicose que envolve um processo de óxido-redução, em três (e às vezes quatro) porções. Considerando-se o caso mais geral da formação de três moles de ATP por mol de  $H_2O$  formado, calcula-se que o rendimento do processo é de  $30\ 000/57\ 000 = 52\%$ . O restante da energia é dissipado sob a forma de calor.

29

Em cada ponto de formação de ATP, a energia é conservada através de uma série de reações das quais participam, pelo menos, dois intermediários hipotéticos cuja existência é previsível por meios indiretos. Assim, o leitor pode, voltando à figura 25, imaginar, ligadas às cristas e intimamente relacionadas aos transportadores de elétrons, mais algumas moléculas de proteína (ou lipoproteína) responsáveis pela conservação de energia.

Tomando-se a região NAD-Flavoproteína como exemplo (e mecanismo semelhante deve ser imaginado para os outros dois pontos em que a energia é liberada para a formação de ATP), a seqüência hipotética de reações ocorre provavelmente como está descrito na figura 29.

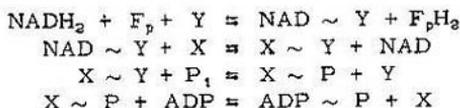


Fig. 29. Seqüência hipotética de formação de ATP ao nível da passagem de elétrons entre NAD e flavoproteína. X e Y são compostos intermediários hipotéticos (provavelmente proteínas) e  $\text{ADP} - \text{P} = \text{ATP}$ .

## INIBIDORES E VENENOS

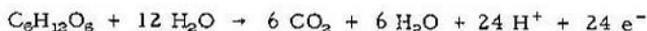
Grande número de substâncias interfere com os processos de oxidação e fosforilação. Algumas dessas substâncias agem sobre componentes de cadeia respiratória, inibindo o transporte de elétrons. Já citamos o efeito do cianeto que forma um complexo irreversível com o ferro da citocromo-oxidase. O monóxido de carbono atua no mesmo ponto. Outros inibidores agem ao nível das flavoproteínas: a atebriana, substância semelhante à riboflavina usada para tratar malária; a clorpromazina e os barbitúricos, substâncias que deprimem a atividade do sistema nervoso; e a rotenona, usada largamente como inseticida. A antimicina A, antibiótico usado largamente nos laboratórios como arma para o estudo da cadeia de transporte, mas não usado em clínica por ser extremamente tóxico, inibe ao nível do citocromob e da coenzima Q. A utilização da energia liberada durante a oxidação pelos compostos intermediários que levam à formação de ATP também é bloqueada por substâncias como o dinitrofenol (DNP) e antibióticos tóxicos como a oligomicina e a gramicidina. O dinitrofenol, hoje usado somente nos laboratórios de pesquisa e na indústria unicamente para conservar madeira, foi usado antigamente para emagrecer. O seu efeito hoje é facilmente compreendido. Impedindo quase totalmente (os efeitos dependem da concentração) o aproveitamento da energia pela via descrita na figura 29, impede em consequência a síntese de ATP. Com isso, a célula passa a oxidar substratos em maiores quantidades, com aproveitamento nulo. Há, portanto, aumento de consumo de alimentos e de oxigênio, sem a conservação de energia para os processos de biossíntese. Com isso, há emagrecimento. Entretanto, a utilização do DNP como emagrecedor foi completamente abolida, em virtude do grande número de casos fatais em consequência da extrema toxicidade da droga e da dificuldade de controle das dosagens. O hormônio da tiróide, em altas doses, parece ter o mesmo efeito e também é usado atualmente como agente emagrecedor.

## FONTE DOS ELÉTRONS, METABOLISMO INTERMEDIÁRIO

### METABOLISMO DA GLICOSE

Uma das fontes mais importantes de elétrons (e prótons) na célula são os açúcares, entre os quais a glicose. O estudo da degradação da glicose iniciou praticamente o estudo do metabolismo e da fermentação. Originária do meio exterior, ou sintetizada na célula, a glicose é acumulada sob a forma de um polímero, o glicogênio, nas células animais, ou o amido nas células vegetais.

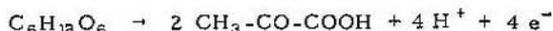
A soma das reações da oxidação da glicose a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  pode ser expressa pela equação abaixo:



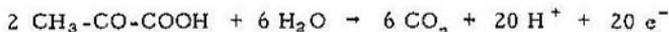
31

onde se verifica a mobilização de 12 pares de átomos de hidrogênio.

Podemos dividir o metabolismo intermediário da glicose em duas fases. Uma que corresponde à cisão da molécula de glicose em duas moléculas de piruvato:



e outra em que o piruvato formado é transformado no produto final:



No caso do homem, dos outros animais e da maioria das plantas, os produtos finais são  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ . No caso das bactérias de fermentação alcoólica, os produtos finais são  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e etanol. Existem ainda outros exemplos de transformação do ácido pirúvico em outros produtos finais específicos para cada tipo de organismo, como o ácido acético nas bactérias que produzem vinagre.

#### Produção de Ácido Pirúvico a Partir da Oxidação da Glicose (Glicólise)

Esta fase do metabolismo da glicose pode ser esquematizada como na figura 30:

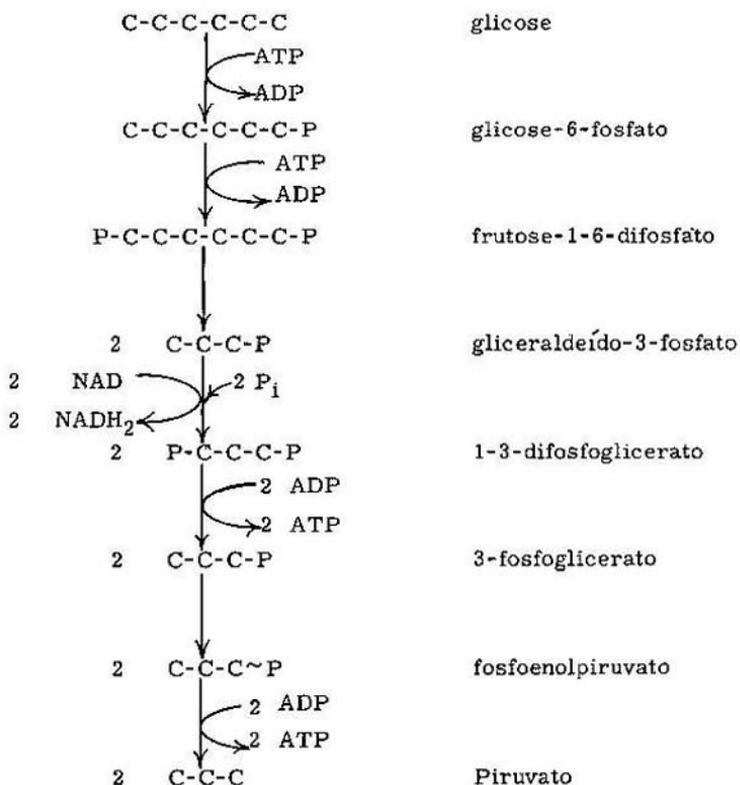


Fig. 30. Esquema resumido das reações que ocorrem durante a glicólise.

Observe o leitor que a primeira etapa da glicólise é a conversão da glicose em um composto com dois radicais fosfato. Entretanto, essas ligações são de baixa energia (ligações tipo éster = R-CH<sub>2</sub>O-P) e para essas duas transformações gastam-se duas moléculas de ATP, que é o doador de grupos fosfato. Transformam-se, portanto, duas ligações ricas em energia em duas ligações pobres em energia. O restante da energia resultante da hidrólise do ATP perde-se sob a forma de calor.

Pela cisão do composto difosforilado de 6 carbonos, formam-se duas moléculas de três carbonos. Este último composto, o gliceraldeído-3-fosfato, é oxidado ao ácido correspondente ao mesmo tempo que fosfato inorgânico é inserido na molécula, formando uma ligação rica em energia (Fig. 31).

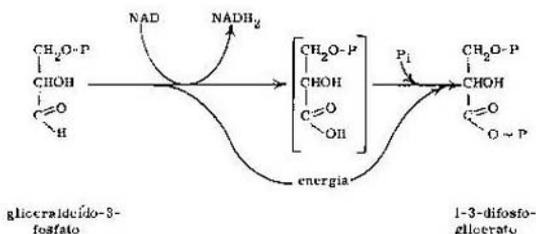


Fig. 31. Esquema de formação da primeira ligação de alta energia durante a glicólise. A oxidação e a fosforilação se passam simultaneamente e o ácido intermediário não pode ser detectado. Como se vê, durante o processo uma molécula de NAD é reduzida.

Na reação seguinte, o composto P-C-C-C ~ P doa um radical fosfato para uma molécula de ADP, conservando a energia sob a forma de ATP. O novo composto formado, 3-fosfoglicerato, sofre um processo de migração do grupo fosfato da posição 3 para a posição 2, seguida de óxido-redução, desta vez de caráter intramolecular (Fig. 32).

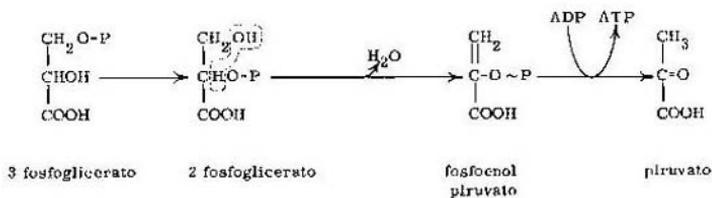


Fig. 32. A primeira reação é catalisada pelo fosfogliceromutase. A segunda reação, de óxido-redução interna, forma o fosfoenolpiruvato que conserva energia no fosfato ligado ao carbono 2. Nesta reação, o carbono 1 é reduzido do nível álcool ao nível hidrocarboneto e o carbono 2 é oxidado do nível álcool ao nível cetona. O fosfoenolpiruvato formado é hidrolisado a piruvato e a energia é conservada numa molécula de ATP.

Vemos, portanto, que durante a glicólise se passam duas reações de óxido-redução: uma que reduz NAD e outra intramolecular. Para cada mol de glicose que é transformado até ácido pirúvico, formam-se, pois, 4 moles de ATP à custa de 4 moles de ADP e consomem-se 2 moles de ATP para a fosforilação das duas primeiras reações da seqüência.

### Destino do Ácido Pirúvico

Como se viu, são formadas 2 moléculas de NADH<sub>2</sub> durante a glicólise. Supondo, entretanto, que a célula em estudo seja uma

célula muscular em anaerobiose, há de haver um mecanismo que restitua à célula continuamente NAD, porque a quantidade intracelular desse nucleotídeo é limitada. Neste caso, o ácido pirúvico é transformado em ácido láctico pela lactato-desidrogenase e o  $\text{NADH}_2$  é reoxidado (Fig. 33).

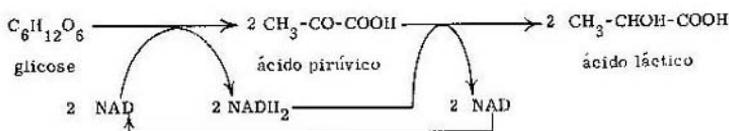


Fig. 33. Esquema de reoxidação do  $\text{NADH}_2$  no músculo em anaerobiose.

Na levedura, este mecanismo é um pouco diferente, pois o ácido pirúvico transforma-se em acetaldeído que é, por sua vez, reduzido a álcool (Fig. 34).

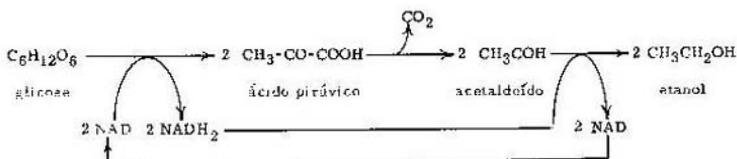


Fig. 34. Esquema de reoxidação do  $\text{NADH}_2$  em levedura, com a formação de álcool.

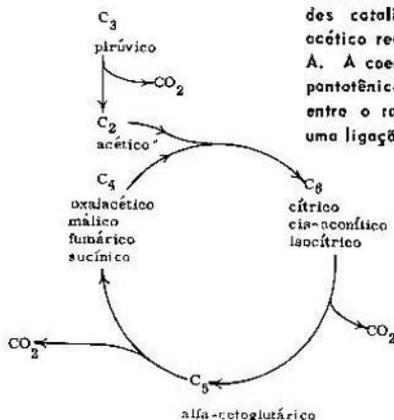
Em ambos os casos, produção de ácido láctico ou álcool etílico, o rendimento energético da oxidação da glicose é muito baixo, pois se formam apenas 2 moles de ATP por mol de glicose oxidado. A energia conservada é equivalente à quantidade de apenas 20 000 calorias. Como veremos a seguir, a liberação de energia é muito maior em condições que permitam a oxidação total do ácido pirúvico formado.

## O CICLO DE KREBS

Szent-Györgyi descobriu que vários ácidos orgânicos, formados por 4 átomos de carbono e possuindo dois grupos carboxílicos, estimulavam a respiração de extratos celulares. Por algum tempo pensou-se que esses ácidos atuavam como transportadores de elétrons. Estudos mais profundos, entretanto, vieram demonstrar que na realidade esses ácidos dicarboxílicos são intermediários (e

catalisadores) da oxidação do ácido pirúvico. Este composto oxida-se através de uma seqüência de reações chamada ciclo de Krebs (Fig. 35).

Fig. 35. Esquemática do ciclo de Krebs. As enzimas que catalisam as reações deste ciclo encontram-se no interior das mitocôndrias. Todos os ácidos que fazem parte do ciclo são tricarbóxicos ou dicarbóxicos e o número de átomos de carbono de cada um está indicado na figura. O composto  $C_4$ , que reage com uma molécula de ácido acético, é reformado a cada volta do ciclo e é necessário apenas em quantidades catalíticas. Na realidade, o ácido acético reage na forma de acetil-coenzima A. A coenzima A é um derivado do ácido pantotênico (uma vitamina) e a ligação entre o radical acetil e a coenzima A é uma ligação de alta energia (cf. Fig. 41).



## PRODUÇÃO DE ATP DURANTE A OXIDAÇÃO DE PIRUVATO

Em várias reações do ciclo de Krebs ocorrem processos de óxido-redução. Em cada uma dessas reações de óxido-redução libera-se um par de elétrons (e prótons) que é transferido aos transportadores da cadeia de óxido-redução da mitocôndria. O leitor poderá ver na figura 36 que, com duas exceções, todas as desidrogenases do ciclo entregam os elétrons a uma molécula de NAD. Essas exceções são: 1) a enzima que oxida o ácido succínico é uma flavoproteína (não uma desidrogenase) e como tal recebe diretamente do substrato os elétrons que, portanto, não passam pela molécula de NAD; 2) a enzima que oxida ácido alfa-cetoglutarico que, além de entregar elétrons ao NAD como o fazem os outros substratos do ciclo de Krebs, libera suficiente energia para que haja a formação de uma molécula de ATP ao nível do substrato. Um caso semelhante ao do ácido alfa-cetoglutarico é do gliceraldeído-3-fosfato (Figs. 30 e 31), que forma uma molécula de  $NADH_2$  e ao mesmo tempo conserva a energia na molécula do ácido 1-3 fosfoglicérico, que na reação posterior a transfere para uma molécula de ATP. Havendo oxigênio presente,

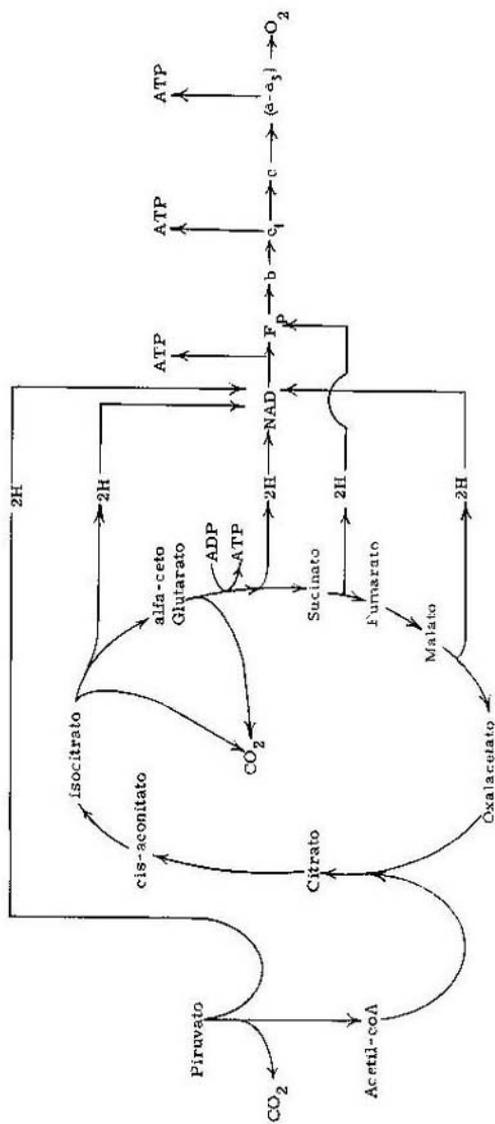


Fig. 36. Relações do ciclo de Krebs com a cadeia do transporte de elétrons.

o  $\text{NADH}_2$  formado é oxidado pela cadeia de transporte de elétrons normalmente.

Podemos agora calcular qual o rendimento total da oxidação de um mol de glicose a  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 37).

ETAPA	moles de ATP formado
1. Glicólise:	
a. ao nível do substrato	$4 \times 2 = 8$
b. oxidação do $\text{NADH}_2$ pela cadeia de transporte	$3 \times 2 = 6$
2. Ciclo de Krebs:	
a. piruvato - acetil coenzima A	$3 \times 2 = 6$
b. isocitrato - alfacetoglutarato	$3 \times 2 = 6$
c. alfacetoglutarato - succinato	$3 \times 2 = 6$
{ cadeia de transporte	
{ nível do substrato	$1 \times 2 = 2$
d. succinato-fumarato	$2 \times 2 = 4$
e. malato - oxalacetato	$3 \times 2 = 6$
SOMA	38

37

Fig. 37. Rendimento da oxidação total de um mol de glicose. Os valores foram multiplicados por 2 porque cada mol de glicose fornece dois moles de ácido pirúvico. Para melhor entendimento da tabela, o leitor deve reportar-se às figuras 30 e 36.

Considerando que a ligação de alta energia terminal do ATP armazena 10 000 calorias por mol, deduz-se que 38 moles conservam uma energia de 380 000 calorias. Entretanto, a oxidação total de um mol de glicose, medida por métodos físicos, fornece 686 000 calorias. Conclui-se, pois, que a oxidação da glicose pela célula é um processo que conserva aproximadamente 55% da energia. O restante é dissipado sob a forma de calor.

## QUEIMANDO GORDURAS

As gorduras (lipídios) chamadas neutras são formadas por uma molécula de glicerol (que é um álcool de três carbonos) esterificada por três moléculas de ácido graxos. Os ácidos graxos são formados por uma cadeia de átomos de carbono de tamanho variável,

possuindo invariavelmente um grupo carboxila terminal. Em geral, os ácidos graxos encontrados nas gorduras têm um número par de átomos de carbono e uma cadeia longa (Fig. 38).

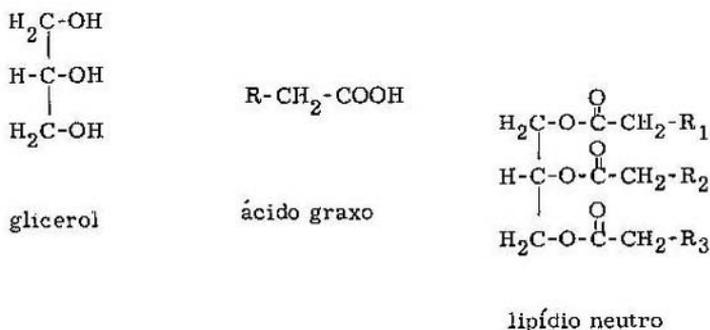


Fig. 38. Estrutura molecular de glicerol, dos ácidos graxos e dos lipídios neutros. Os radicais R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e R<sub>3</sub> são formados por uma seqüência de grupos -CH<sub>2</sub> em número variável.

O glicerol pode transformar-se no composto C<sub>3</sub>-P (ver Fig. 30) ou originarse d'êle.

38

O estudo da oxidação dos ácidos graxos iniciou-se no começo d'êste século, quando Knoop inventou um meio de marcar as moléculas conseguindo acompanhar o seu metabolismo. Knoop marcava a molécula de ácido graxo introduzindo na extremidade oposta à carboxila um anel benzênico, transformando-o num fenil derivado. Administrando a cães fenil-derivados de ácidos graxos com número par de átomos de carbono, Knoop encontrava sempre na urina d'esses animais ácido fenilacético (Fig. 39), sob a forma de um derivado da glicina, o ácido fenilacetúrico. A administração de ácidos graxos marcados de número ímpar de átomos de carbono levava sempre à excreção urinária de ácido benzóico sob a forma de um derivado da glicina, o ácido hipúrico. Em ambos os casos, a excreção de ácido acético era grande. Knoop postulou então que deveria haver uma remoção contínua, da molécula de ácido graxo administrado, de unidades formadas por dois carbonos (unidades C<sub>2</sub>) a partir da extremidade onde se encontra a carboxila. Esse postulado foi denominado teoria da β-oxidação (Fig. 39).

Essa teoria, entretanto, somente pôde ser comprovada após o término da Segunda Guerra Mundial, quando se descobriu o carbono radioativo (<sup>14</sup>C). As enzimas que realizam a oxidação dos ácidos graxos foram localizadas na mitocôndria e isoladas. A seqüência de reações foi chamada ciclo de Lynen (Fig. 40).

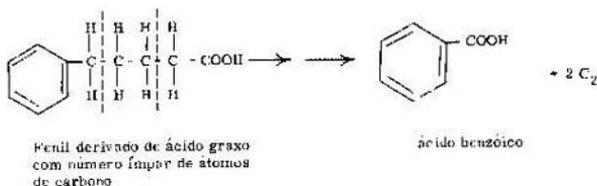
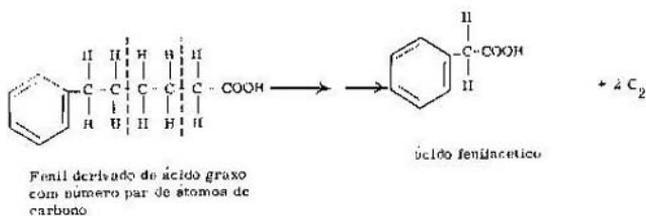
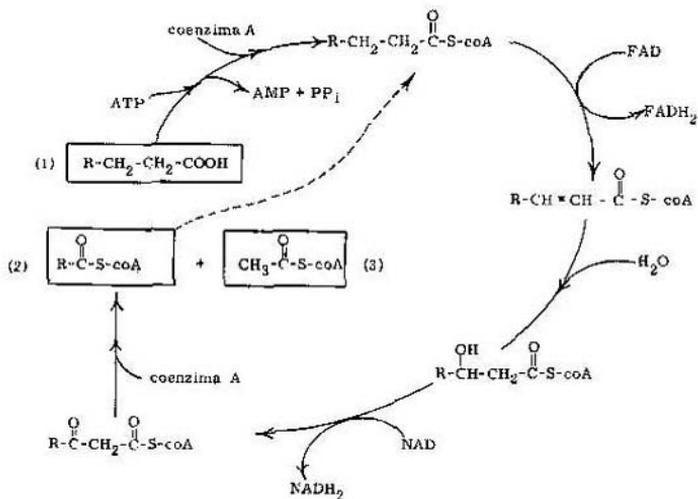


Fig. 39. Teoria da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos. As linhas pontilhadas indicam os pontos em que a molécula é cindida. A teoria é chamada de  $\beta$ -oxidação porque aos átomos de carbono atribuem-se letras gregas a partir do 1<sup>o</sup> carbono que se segue à carboxila.

Isto que hoje é simples e claro levou 50 anos, desde Knoop até Lynen, para ser entendido. Um dos principais problemas consistia em que não era possível isolar os ácidos graxos intermediários formados em diferentes níveis de oxidação. Esse problema, no entanto, ficou resolvido quando Lipmann (que como Lynen ganhou o Prêmio Nobel de Medicina) demonstrou que o ácido acético (unidade C<sub>2</sub>) derivado do metabolismo do ácido pirúvico, como primeiro passo do ciclo de Krebs, não aparecia sob a forma de ácido livre, mas combinado a um derivado do ácido pantotênico, uma das vitaminas do Complexo B. Esse derivado do ácido pantotênico e a forma biológica ativa da vitamina é chamada coenzima A (Fig. 41).

Lynen demonstrou que os intermediários da oxidação dos ácidos graxos são todos combinados à coenzima A.



40

Fig. 40. Ciclo de Lynen. O leitor pode verificar que, após uma volta do ciclo, o ácido graxo original (1) perde dois átomos de carbono sob a forma de ácido acético (3), transformando-se num ácido graxo com dois átomos de carbono a menos (2). Esse ácido graxo volta ao ciclo, como está indicado pela seta pontilhada, perde outros dois átomos de carbono e assim por diante. Vê-se, pois, que o ciclo de Lynen pode ser representado como uma espiral.

Na figura 40 verifica-se que, quando um ácido graxo é oxidado, durante a primeira volta do ciclo se liberam 4 elétrons que são apanhados respectivamente por uma flavoproteína e por uma desidrogenase. Dêsse modo, a cada volta do ciclo formam-se 5 moléculas

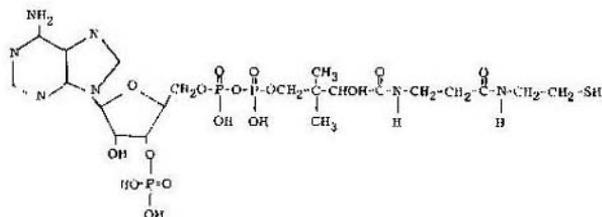


Fig. 41. Estrutura da coenzima A. Note o grupamento -SH na parte terminal da molécula. O leitor já deve estar familiarizado com este grupamento porque é com ele que a molécula da coenzima A (abreviado coA-SH ou coA) se liga aos radicais acil (acetil ou ácidos graxos de maior número de carbono). (cf. texto da Fig. 35.)

de ATP (não esqueça o leitor que, quando os elétrons saltam a passagem NAD-flavoproteína, se formam apenas dois ATP para cada par de elétrons). Cada vez que o ciclo dá uma volta forma-se uma molécula de acetil-coA que é oxidada pelo ciclo de Krebs, formando-se mais 12 moléculas de ATP para cada molécula de acetil-coA (consulte Fig. 37). Conclui-se então que a oxidação dos ácidos graxos é também um meio eficiente que a célula possui para conservar a energia e, como o leitor pode ver pela figura 42, há íntima relação entre o ciclo de Krebs e o ciclo de oxidação dos ácidos graxos.

41

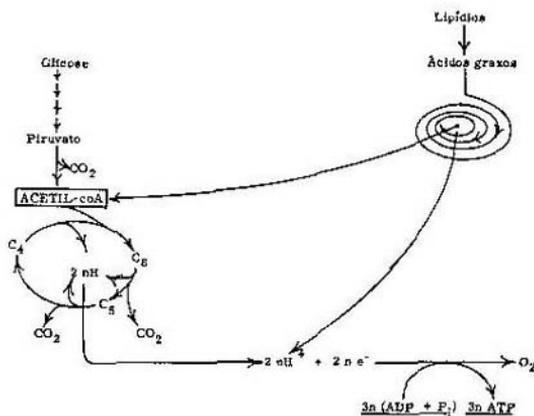
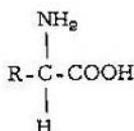


Fig. 42. Inter-relação entre os ciclos de Krebs e do Lypen.

## A OXIDAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são substâncias de estrutura geral



Perdendo amônia por oxidação ou por transferência a outras substâncias do metabolismo, os aminoácidos transformam-se em compostos comuns ao ciclo de Krebs e são oxidados por esta via (Fig. 43).

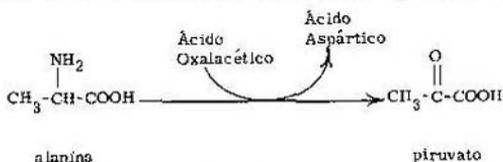


Fig. 43. Exemplo de oxidação de um aminoácido. Neste caso o grupo  $\text{NH}_2$  é apanhado por outra substância.

42

Os aminoácidos que possuem a cadeia carbônica ramificada, perdendo amônia, são transformados em ácidos graxos e, portanto, são oxidados pelo ciclo de Lynen.

A amônia é uma substância extremamente tóxica e não pode acumular-se no organismo. As células então, por meio de um mecanismo engenhoso (Fig. 44), conseguem metabolizar a amônia formada durante a oxidação dos aminoácidos. Assim é que, através de uma reação com  $\text{CO}_2$  que exige energia de uma molécula de ATP, se forma uma substância chamada carbamil fosfato, que reage com uma molécula de ornitina. Segue-se então uma série de reações enzimáticas até que a molécula de ornitina seja refeita. Nesta última reação, uma molécula de uréia é liberada e o organismo livra-se então de uma substância altamente tóxica, como é a amônia, transformando-a em uréia, praticamente inócua e facilmente excretada pelo rim.

Como se vê pela figura 44, um dos grupos  $\text{NH}_2$  da uréia provém do ácido aspártico (um aminoácido) que posteriormente é liberado sob a forma de ácido fumárico, um dos compostos  $\text{C}_4$  do ciclo de Krebs.

Em última análise, há estreita inter-relação entre os ciclos de Krebs, de Lynen e da uréia (ciclo de Krebs-Henseleit) e, para efeito de produção de energia a partir do catabolismo de açúcares, gorduras e proteínas, o ciclo de Krebs deve ser considerado como

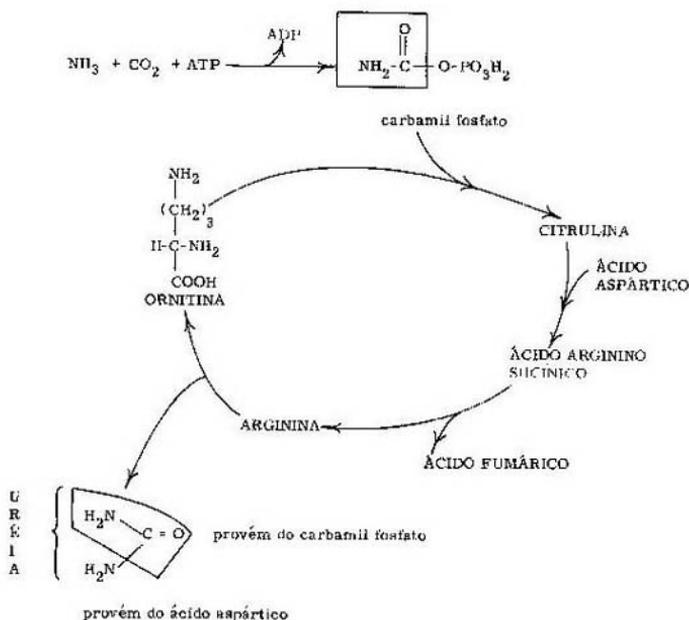


Fig. 44. Ciclo da uréia. Neste caso, o grupo  $\text{NH}_3$  reage com  $\text{CO}_2$  e é transportado através de um ciclo até a formação de uréia.

uma via final comum. De fato, esse ciclo não é somente uma continuação da glicólise, como poderia pensar o estudante mais incauto. Ele é realmente o desaguadouro comum de todas as vias catabólicas, seja pela entrada de intermediários comuns (ex.: ácido fumárico derivado do ácido aspártico ou ácido pirúvico derivado da alanina), seja pela formação de acetil-coA (proveniente da glicose, dos ácidos graxos e dos aminoácidos ramificados).



# 4

## UTILIZAÇÃO DA ENERGIA

Como o leitor pode concluir dos capítulos precedentes, a célula possui um complexo mecanismo que ela utiliza para conservar parte da energia proveniente dos alimentos. Essa energia, por meio dos mecanismos de óxido-redução, é fundamentalmente armazenada na molécula de ATP. Neste capítulo, o leitor familiarizar-se-á com uma série de processos que utilizam ATP (e outros nucleotídeos de alta energia formados a partir de ATP), quais sejam: contração muscular, transporte de substâncias através de membranas, bioluminescência e processos biossintéticos gerais.

### MECANISMO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

A contração muscular é um exemplo típico de mecanismo que, para ser entendido, necessita igualmente das técnicas desenvolvidas pela microscopia eletrônica e pela bioquímica. Como o leitor tem conhecimento, os músculos podem ser divididos de modo geral em dois tipos: os músculos esqueléticos ou estriados e os músculos lisos. Os músculos esqueléticos obedecem a um mecanismo voluntário de contração. Assim, por exemplo, basta que queiramos contrair um braço, e o fazemos perfeitamente. Os músculos lisos encontrados, por exemplo, na parede das vísceras, independem da vontade para se contraírem. Olhando-se um músculo esquelético ao microscópio comum, verifica-se que ele é formado por longas células com vários núcleos (fibras musculares) onde se notam estriações espaçadas regularmente e dispostas numa direção perpendicular em relação ao eixo maior das fibras. Os músculos lisos não possuem essas estriações. Por razões de ordem técnica, a pesquisa neste campo desenvolveu-se pelo estudo da musculatura estriada, e o leitor deve ser alertado de que o que descreveremos doravante se aplica a esse tipo de músculo.

Cada fibra muscular é composta de grande número de elementos paralelos, chamados miofibrilas. Cada miofibrila é composta de centenas de filamentos que têm aproximadamente o diâmetro de 1 micron, que é a milésima parte do milímetro. A miofibrila é formada principalmente por duas proteínas que o bioquímico consegue extrair do músculo e purificar, usando diferentes meios

de extração: a miosina e a actina. Nos músculos esqueléticos, estas duas proteínas estão dispostas em dois tipos de filamentos: filamentos finos e filamentos grossos. Os filamentos grossos, que possuem 100 Å de espessura e 16 000 Å de comprimento, são formados por moléculas de miosina.

Estima-se que cada filamento possua aproximadamente 400 moléculas. Os filamentos finos, formados por moléculas de actina, têm 50 Å de espessura e 10 000 Å de comprimento. Todos esses elementos estão rodeados por uma matriz citoplasmática que contém as estruturas necessárias para fornecer energia para os mecanismos de contração. Essas estruturas, mitocôndria e um tipo especial de vesículas que discutiremos adiante, não estão distribuídas ao acaso na matriz citoplasmática, mas possuem íntima relação com as miofibrilas.

A estrutura das miofibrilas ficou melhor conhecida com o uso do microscópio electrónico, embora ela também possa ser vista ao microscópio óptico comum (procure olhar um corte de músculo esquelético devidamente corado ao microscópio). Assim é que cada miofibrila é formada por uma série de unidades repetidas, conhecidas com o nome de *sarcômero* (Fig. 45). Cada sarcômero é delimitado por duas linhas Z, que são estruturas de natureza fibrilar às quais estão intimamente ligados os filamentos finos (moléculas de actina).

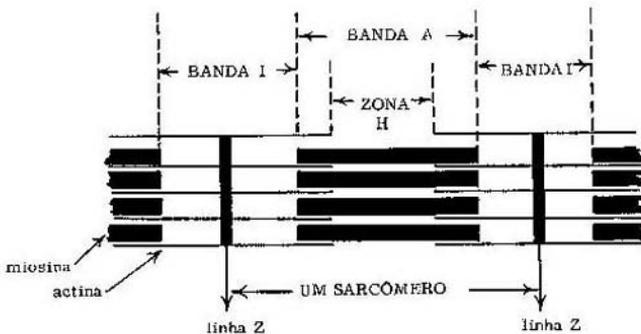


Fig. 45. Esquematisação de um sarcômero. Os filamentos finos (actina) estão ligados à linha Z.

A banda I, ao microscópio electrónico, é pouco densa porque ela é formada tão somente de filamentos de actina. A banda A é mais densa porque é formada de filamentos grossos (miosina). Entretanto, a densidade é maior nas extremidades dos filamentos de miosina porque nessa região há superposição desses filamentos

com os filamentos de actina. Portanto, a zona H, que é formada somente pelos filamentos de miosina, é menos densa que as regiões de superposição. As diferentes propriedades ópticas de refração da luz, que estas moléculas apresentam, são responsáveis pela observação, ao microscópio comum, das estriações de que falamos anteriormente.

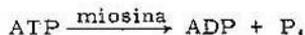
Verifica-se que, quando um músculo se contrai, não há diminuição do comprimento das fibras e, sim, diminuição das distâncias entre as linhas Z e aumento da área mais densa da banda A, com desaparecimento gradual das bandas I e da zona H. Esse fato levou à teoria, hoje geralmente aceita, de que a contração muscular se faz pelo deslizamento das fibras de actina sobre as fibras de miosina.

Fazendo-se um corte transversal dosarcômero ao nível da superposição das fibras finas e grossas, nota-se que há uma interação entre esses dois tipos de fibras através de pontes que se entrecruzam. Acredita-se que essas pontes sejam o único elemento mecânico responsável pela continuidade ao longo de toda a miofibrila e sejam muito importantes na manutenção da tensão desenvolvida pelo músculo. Entretanto, pela medida aproximada das distâncias que se transformam durante a contração, não haveria possibilidade de manutenção das pontes de entrecruzamento primitivas, que devem então se desfazer durante o deslizamento e se refazer em outros locais.

47

Triturando-se o tecido muscular num liquidificador, consegue-se obter no homogeneizado uma dispersão das estruturas acima relatadas. No entanto, a estrutura da miofibrila permanece intacta provavelmente porque as pontes de ligação são suficientemente fortes para resistir ao tratamento mecânico. Essas fibras assim isoladas são chamadas fibras de actomiosina. Entretanto, tratando-se as fibras de actomiosina com soluções de sais de concentração adequada, pode-se enfraquecer a ligação entre miosina e actina e obtê-las em separado. Com isso, facilita-se o estudo da ultra-estrutura molecular.

É possível, portanto, obter uma solução de miosina bastante purificada. A molécula de miosina é uma estrutura alongada de 1500 Å de comprimento. Se, numa experiência simples, colocarmos uma solução de miosina em presença de ATP, verificaremos, depois de certo tempo, grande liberação de ácido fosfórico no meio de incubação. Isso significa que a miosina tem uma atividade enzimática de hidrólise do ATP, isto é, uma atividade ATPásica:



Essa propriedade da miosina é um dos poucos exemplos, na literatura, de uma proteína que perfaz ao mesmo tempo uma função estrutural e uma função enzimática.

Se a molécula de miosina for observada ao microscópio eletrônico, notar-se-á que ela possui uma estrutura linear e em uma das pontas uma estrutura globular. Se tratarmos a molécula de miosina com uma enzima que hidrolisa proteínas, por exemplo, a tripsina (enzima proteolítica), separam-se duas frações, chamadas respectivamente de meromiosina pesada e meromiosina leve. Observando-se a meromiosina pesada ao microscópio, verifica-se que ela é formada principalmente pela ponta globosa e por uma pequena cauda. Além disso, esta fração possui atividade ATPásica e é capaz de se combinar com fibras purificadas de actina, reconstituindo assim a actomiosina. A meromiosina leve, por outro lado, é tão somente formada por estruturas lineares sem atividade ATPásica e é incapaz de se combinar com a actina. Conclui-se, portanto, que a miosina é uma estrutura assimétrica que possui atividade ATPásica e sítios de ligação com a actina na parte globosa terminal que chamaremos de cabeça da molécula. A cabeça liga-se a uma cauda que, na estrutura das miofibrilas, está sempre voltada para o interior da região que contém filamentos grossos (Fig. 46).

48

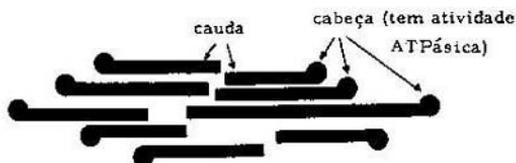


Fig. 46. Disposição das moléculas de miosina nos filamentos grossos.

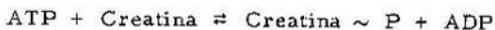
As fibras de actina isoladas e colocadas ao microscópio eletrônico aparecem nitidamente formadas por dois filamentos enrolados um no outro em forma de hélice. Cada um desses filamentos é composto de unidades globulares menores que se dispõem como contas de um colar. Essas unidades menores que se repetem têm o nome de Actina G (actina globular) que, pela polimerização, forma Actina F (actina fibrilar). Em cada uma dessas unidades da actina haveria um ponto de ligação (interação) para a cabeça da molécula de miosina que assim, durante a contração, poderia refazer uma ligação em qualquer ponto da molécula de actina que estivesse deslizando sobre ela.

O estudo bioquímico das fibras de actomiosina demonstrou uma atividade ATPásica diferente da atividade das fibras isoladas de miosina. Assim, enquanto a atividade ATPásica da miosina é inibida por íons  $Mg^{++}$ , a atividade da actomiosina é estimulada por êsses íons e por íons  $Ca^{++}$ . Como no músculo intacto o que existe é uma interação entre fibras de actina e miosina (actomiosina), conclui-se que  $Mg^{++}$  e  $Ca^{++}$  são necessários à contração pela ativação da ATPase. Nessas condições, há hidrólise do ATP que fornece energia ao sistema.

Recentemente, foram descobertas enzimas associadas ao retículo endoplasmático (rede de canais membranosos que se entrecruzam por toda a célula e que têm relações com as membranas nuclear e citoplasmática) que são capazes, estimuladas por um impulso nervoso, de liberar e retirar íons  $Ca^{++}$  do meio. Êsses íons são acumulados em vesículas especiais que podem ser isoladas por métodos bioquímicos.

Dêsse modo, em presença dêsses dados, pode-se construir uma teoria para o mecanismo de contração muscular: um impulso nervoso faria com que o retículo endoplasmático descarregasse íons  $Ca^{++}$  nos locais da miofibrila que possuem atividade ATPásica (interação actina-miosina). Êsses íons, juntamente com íons  $Mg^{++}$  naturalmente presentes, ativariam o processo de hidrólise do ATP que forneceria energia para o deslizamento e provavelmente para a formação das novas ligações ao longo da interação miosina-actina. À cessação do impulso nervoso, o retículo endoplasmático retiraria os íons  $Ca^{++}$ , desaparecendo dêsse modo as condições de ativação da hidrólise do ATP. Com isso, romper-se-iam as novas ligações formadas e o sarcômero voltaria ao estado de repouso. Demonstra-se que, para que o retículo endoplasmático retire  $Ca^{++}$  das proximidades da miofibrila, há necessidade de ATP, isto é, o retículo também possui uma ATPase que hidrolisa ATP, fornecendo energia para o processo de acúmulo de  $Ca^{++}$  nas vesículas.

Por fim, deve-se considerar que o músculo contém uma enzima, a creatina fosforil-transferase, que transfere o ácido fosfórico terminal do ATP formado pelas mitocôndrias para a molécula de creatina:



A creatina é um composto nitrogenado que mantém, quando recebe o ácido fosfórico, a ligação de alta energia. Dêsse modo, o músculo pode armazenar grande quantidade de energia sob a forma de fosforil-creatina. Quando, durante o trabalho muscular, há necessidade de grande dispêndio de energia, o músculo faz a reação reversa, obtendo assim grandes quantidades de ATP para a contração.

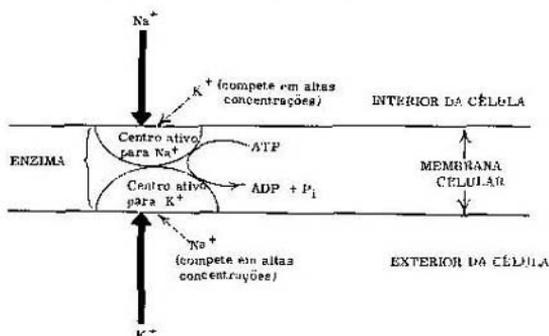
*Preparação de Szent-Györgyi.* Retire um músculo longo de qualquer animal disponível e amarre-o esticado numa ripa de madeira. Coloque a preparação em glicerina (50%) na geladeira. Substitua a glicerina diariamente durante tres dias. Após a extração, conserve a preparação no congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Com um alfinete retire algumas fibras musculares, ponha numa placa de Petri e adicione algumas gotas de uma solução de ATP qualquer. Observe e interprete o resultado.

## TRANSPORTE DE ÍONS ATRAVÉS DE MEMBRANAS

Está bem estabelecido que, na maioria das células,  $\text{Na}^+$  é transportado do citoplasma para o fluido intersticial contragradiente. Em outras palavras, mesmo que a concentração de  $\text{Na}^+$  no fluido intersticial seja muito maior que no citoplasma da célula, há sempre um contínuo transporte desse íon de dentro para fora. Se a membrana da célula fosse uma membrana inerte, semipermeável, o movimento de  $\text{Na}^+$  ocorreria em ambos os sentidos até que se igualassem as concentrações. Esse transporte de substâncias através da membrana contra um gradiente é denominado transporte ativo. Entretanto, para que  $\text{Na}^+$  seja transportado do interior do citoplasma para o fluido extracelular, há necessidade de que este último contenha  $\text{K}^+$ , que é levado para o interior do citoplasma à medida que o  $\text{Na}^+$  é jogado para fora. É evidente que esse transporte iônico deva ser feito com gasto de energia. Realmente, demonstra-se que a energia é doada ao sistema pela hidrólise do ATP e que este nucleotídeo não pode ser substituído por nenhum outro homólogo que contenha alta energia nas suas ligações químicas.

A maior parte dos estudos de transporte iônico foram feitos com membranas de hemácias e de células nervosas. Um achado interessante é que esses sistemas de transporte fazem parte da estrutura da membrana e que a enzima ou os sistemas de enzimas que o realizam possuem centros ativos específicos e independentes de ligação para  $\text{Na}^+$  e para  $\text{K}^+$ , cada um deles voltado para o lado em que o transporte é efetivo. Assim, o centro ativo para o  $\text{Na}^+$  está voltado para o interior do citoplasma e o centro ativo para o  $\text{K}^+$  está voltado para o exterior. Cada um desses íons compete com o outro pelo centro ativo específico. Entretanto, para que  $\text{Na}^+$  desloque  $\text{K}^+$  do seu centro específico na região da membrana voltada para o exterior, há necessidade de grandes concentrações de  $\text{Na}^+$ . O mesmo é verdade para o centro específico do  $\text{Na}^+$  no interior da membrana, que é capaz de ligar  $\text{K}^+$ , mas somente quando este íon se acha em grandes concentrações em relação ao  $\text{Na}^+$ . As preparações de membrana que realizam o transporte destes íons o fazem apenas em presença de ATP, que é hidrolisado.

Por outro lado, ATP é hidrolisado pela membrana apenas quando se acha em presença de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  que podem ser mantidos em condições ótimas. Quando isso acontece, o transporte dos íons e a atividade ATPásica atingem velocidade máxima. Diz-se então que a atividade ATPásica da membrana citoplasmática é *ativada* por  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Ao contrário da ATPase do músculo que é ativada por  $\text{Ca}^{++}$ , baixas concentrações de  $\text{Ca}^{++}$  inibem a atividade ATPásica das membranas e conseqüentemente o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Dados experimentais mais complicados sugerem que as atividades de transporte e de hidrólise do ATP são realizadas pela mesma enzima ou pelo mesmo sistema de enzimas. Esses dados podem então ser exemplificados pela figura 47.



51

Fig. 47. Mecanismo de ação da enzima localizada na membrana celular que realiza o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  mediante a hidrólise de ATP.

Os digitálicos, usados no tratamento dos pacientes cardíacos, inibem a atividade ATPásica da membrana inibindo o transporte de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Entretanto, aumentando-se a quantidade de  $\text{K}^+$ , consegue-se reverter, em determinadas condições, os efeitos do digitálico. É possível, pois, que digitálicos e  $\text{K}^+$  compitam pelo mesmo centro ativo da enzima.

Este mecanismo seletivo de transporte é conhecido também como "bomba de sódio". A "bomba de sódio" tem um papel muito importante no mecanismo da transmissão nervosa. Assim, se considerarmos uma célula nervosa com seu axônio num estado de repouso, haverá maior concentração de íons  $\text{Na}^+$  no exterior da célula e seus prolongamentos e de íons  $\text{K}^+$  no interior. Esses íons podem por difusão mudar de compartimento, mas a "bomba" recoloca-os no seu compartimento de eleição. Em virtude das diferentes concentrações iônicas dentro e fora da célula e das diferenças de diâmetro dos dois íons, a resultante geral é que no estado de repouso o exterior é sempre mais positivo que o interior (Fig. 48). Isso provoca uma diferença de potencial que, na maioria das células, é da ordem de 40-50 mV.

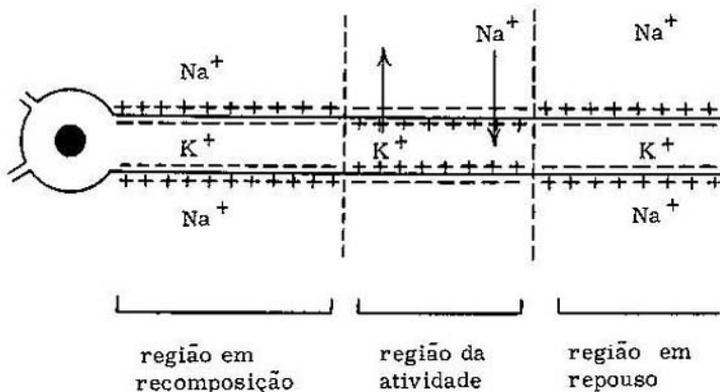


Fig. 48. Diagrama de uma célula nervosa e seu axônio. A permanência de  $K^+$  no interior e de  $Na^+$  no exterior: leva a uma diferença de potencial ao longo da membrana. Essa diferença é mantida pela bomba de sódio. Quando a célula recebe um impulso vindo de outra célula, há uma difusão de íons através da membrana que anula a diferença de potencial primitiva.

No momento em que a célula nervosa é excitada por um impulso vindo de outra célula, há uma despolarização localizada no ponto vizinho mais próximo. A membrana torna-se facilmente permeável aos dois íons e há passagem de  $Na^+$  para o interior e  $K^+$  para o exterior. Com isso, altera-se a diferença de potencial primitiva. Entretanto, a "bomba de sódio", a expensas de ATP, bombeia  $Na^+$  para o exterior e  $K^+$  para o interior e a região afetada entra em recomposição. Ao mesmo tempo, a região vizinha sofre o mesmo fenômeno e o impulso nervoso caminha então como uma onda de despolarização. Conclui-se, pois, que a "bomba de sódio" é muito importante na transmissão do impulso nervoso.

Não é somente a membrana citoplasmática que possui capacidade de selecionar ativamente o transporte de íons. As mitocôndrias também são capazes de acumular cátions no seu interior e esse acúmulo é dependente de ATP. Assim, as mitocôndrias são capazes de acumular  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $K^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Li^+$  e outros íons. Em geral, quando um cátion é transportado para o interior da mitocôndria, ele é acompanhado por um ânion, por exemplo, fosfato. Entretanto, demonstra-se também que as mitocôndrias realizam troca ativa de cátions com o citoplasma. Assim, por exemplo, a entrada de um íon de  $Ca^{++}$  é acompanhada pela extrusão de um íon de  $Mg^{++}$ . É interessante notar que as mitocôndrias podem usar como doador de energia para o processo o intermediário não fosforilado  $X \sim Y$ . Em alguns casos, como no rim, a troca de  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  e  $K^+$  com o citoplasma é controlada pelo hormônio da paratireóide que parece regular a utilização de  $X \sim Y$ .

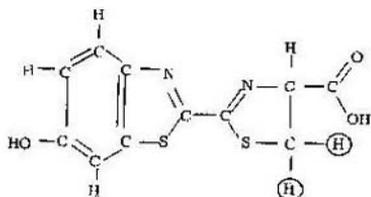
## BIO-LUMINESCÊNCIA

De há muito se sabe que inúmeros seres vivos são capazes de emitir luz. Entre eles encontram-se bactérias, cogumelos, samambaias, crustáceos e muitos invertebrados marinhos, insetos e peixes. A razão da existência desse fenômeno é mal conhecida, entretanto. Sabe-se que os vaga-lumes (insetos) usam os sinais luminosos como forma de atração sexual; que alguns peixes (caçadores) que vivem em águas profundas os utilizam para atrair pequenos animais com os quais eles se alimentam; e que algumas espécies de lulas usam a luz produzida para proteger-se momentaneamente de um inimigo. Entretanto, não se sabe porque esse fenômeno de emissão de luz é largamente desenvolvido nas formas mais primitivas de vida.

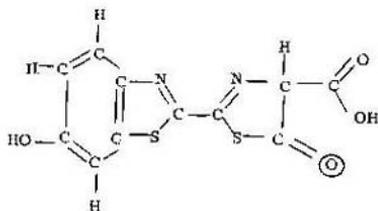
Esse fenômeno nada mais é do que a conversão da energia química potencial em luz que é liberada por meio de uma reação de oxidação. Verifica-se, portanto, que a presença de oxigênio é essencial à bioluminescência.

O estudo das reações envolvidas na emissão de luz mostrou diferenças entre os diversos seres estudados. O sistema enzimático que realiza a oxidação foi chamado de luciferase. O substrato na maior parte das vezes é uma substância denominada luciferina, cuja estrutura varia na dependência do ser vivo estudado (Fig. 49).

53



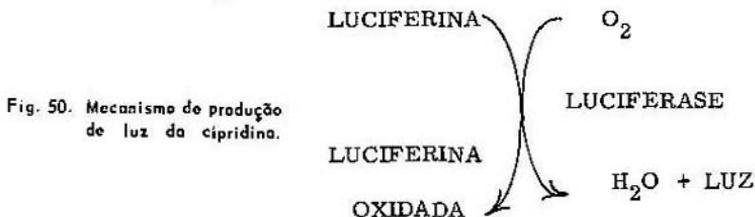
LUCIFERINA ( $LH_2$ ) Fig. 49. Estrutura da luciferina encontrada nos vaga-lumes.



LUCIFERINA OXIDADA ( $L=O$ )

A luciferina ( $LH_2$ ) reage com oxigênio, transformando-se em luciferina oxidada ( $L=O$ ).

Na cipridina (crustáceo microscópico do plancton), a luciferase catalisa diretamente a oxidação, havendo liberação de energia sob a forma de luz (Fig. 50).



As bactérias utilizam um mecanismo intimamente relacionado com a cadeia de transporte de elétrons. Os elétrons que provêm de um substrato qualquer (p. ex., ciclo de Krebs) reduzem uma flavoproteína que contém como núcleo prostético FMN. Deste ponto os elétrons podem seguir seu caminho normal através da cadeia respiratória que já estudamos, ou o  $\text{FMNH}_2$  pode reagir com um aldeído e formar um complexo ativado que, reagindo com o oxigênio pela ação da luciferase, se decompõe e libera energia sob a forma de luz. Neste caso, a flavina mononucleotídeo e o aldeído substituíram a luciferina (Fig. 51).

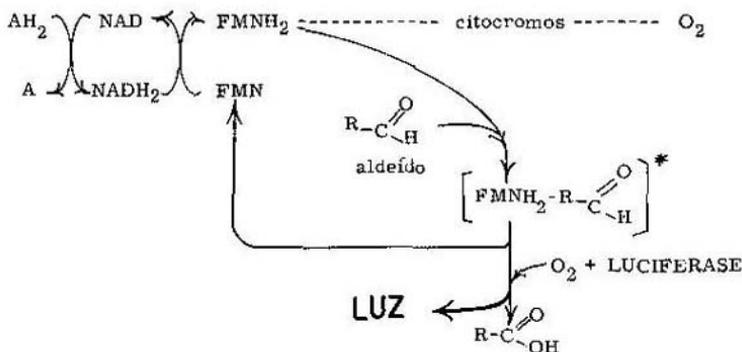


Fig. 51. Mecanismo de produção de luz nas bactérias.

Estes mecanismos descritos e muitas outras observações experimentais levaram alguns pesquisadores a sugerir que os mecanismos de emissão de luz nos organismos inferiores sejam um resquício, que a evolução não apagou, de um mecanismo primitivo de defesa adotado por ancestrais anaeróbicos que habitaram a superfície da terra. O aparecimento gradual de oxigênio na atmosfera

teria feito com que esses organismos anaeróbicos se adaptassem pela síntese de um sistema que os livrasse dos efeitos tóxicos do gás.

O mecanismo de emissão de luz pelos vaga-lumes é mais complicado. Verifica-se que além de oxigênio, que é largamente suprido por uma larga rede de vasos sanguíneos e tubos traqueais que atingem a lanterna (órgão luminoso) desses insetos, há necessidade de ATP. Extratos de lanterna de vaga-lume emitem luz de intensidade crescente pela adição de correspondentes quantidades de ATP, de tal modo que se pode estabelecer correlação entre a quantidade de ATP adicionado e a intensidade de luz emitida. Nesses animais, mais adiantados na escala evolutiva, demonstra-se que há controle do sistema nervoso sobre a emissão de luz. Desse modo, se o inseto for decapitado, a lanterna deixa de produzir luz e a estimulação elétrica da fibra nervosa que vai à lanterna estimula a emissão de luz.

Na figura 52 vê-se um esquema das reações químicas envolvidas no fenômeno de bioluminescência do vaga-lume. Nota-se que a enzima (Luciferase = E) forma um complexo com o ATP. Esse complexo reage com a luciferina ( $LH_2$ ) e durante a reação há perda de duas moléculas de ácido fosfórico da molécula de ATP sob a forma de pirofosfato. O complexo luciferase-AMP-luciferina é oxidado e durante a oxidação ganha energia suficiente para emití-la sob a forma de luz.

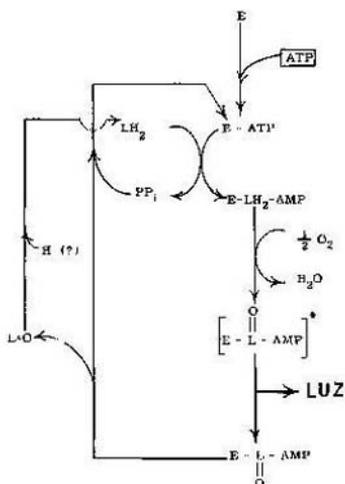


Fig. 52. Mecanismo de produção de luz nos vaga-lumes. O asterisco indica o complexo ativado.

Verifica-se pelo esquema que tudo funciona como se o complexo luciferase-luciferina oxidada-AMP tivesse a função de reter em suas ligações a energia que é liberada sob a forma de luz. Um detalhe interessante desse processo é que o ATP é ressintetizado no fim do ciclo através de pirofosfato e do complexo oxidado. Não há, portanto, gasto de ATP, mas apenas participação desse nucleotídeo no ciclo de reações.

## PROCESSOS BIOSINTÉTICOS GERAIS

56 Como já vimos, as células possuem uma máquina complexa de degradação de substâncias e todo um aparelho montado com a finalidade de conservar a energia armazenada nas ligações químicas. Essa energia que é conservada nas ligações dos compostos ricos em energia, principalmente ATP, é utilizada numa série de funções específicas que o organismo requer. Desse modo a energia disponível pode ser utilizada para a contração de uma fibra ou para a emissão de luz ou, ainda, para o transporte de substâncias através das membranas. Como veremos agora com algum detalhe, a energia conservada durante as reações catabólicas é também utilizada num processo de construção --talvez o mais importante de todos porque é comum a todos os seres vivos-- que vai desde a síntese de pequenas moléculas a partir de precursores simples até a formação de complexos de membranas cuja associação e integração exprimem a célula viva.

Da mesma forma que nos processos catabólicos cada fase de uma série de reações é catalisada por uma enzima, nos processos de biossíntese a adição de pequenas unidades para a formação da estrutura mais complexa exige enzimas específicas. Como as enzimas são proteínas, deduz-se que o processo de biossíntese de proteínas é um dos fenômenos mais importantes que ocorrem na célula viva. Realmente, a sua síntese é programada por uma quantidade enorme de informação armazenada no núcleo, requerendo portanto um aparelho especial para a direção do processo, e depende 90% de toda a energia disponível para as reações de biossíntese.

De qualquer forma, o princípio geral que rege a biossíntese de substâncias no organismo é o mesmo já visto anteriormente: o fosfato terminal do ATP é retirado da molécula e a energia liberada pela hidrólise da ligação é acoplada por outra substância, ou por meio de uma reação de fosforilação, ou pela simples ativação de uma pequena molécula, tornando possível a sua reação com outra molécula.

## Outros Nucleotídios Envolvidos nas Reações de Biossíntese

Apesar de os nucleotídios de ATP, ADP e AMP, serem os mais importantes e ocorrerem universalmente em todas as células, existem outros nucleotídios, muito semelhantes na estrutura e na função, que participam dos processos de transferência de energia. Esses compostos são todos derivados de bases nitrogenadas que se dividem em dois grupos: as purinas e as pirimidinas. A essas bases liga-se um açúcar de cinco carbonos, uma pentose, que pode ser a ribose ou a desoxiribose. Os nucleotídios que contêm ribose são chamados ribonucleotídios e os que contêm desoxiribose são chamados desoxiribonucleotídios. Ao açúcar ligam-se um, dois ou três grupos fosfato em seqüência, formando os mono, di ou trinucleotídios (Fig. 53).

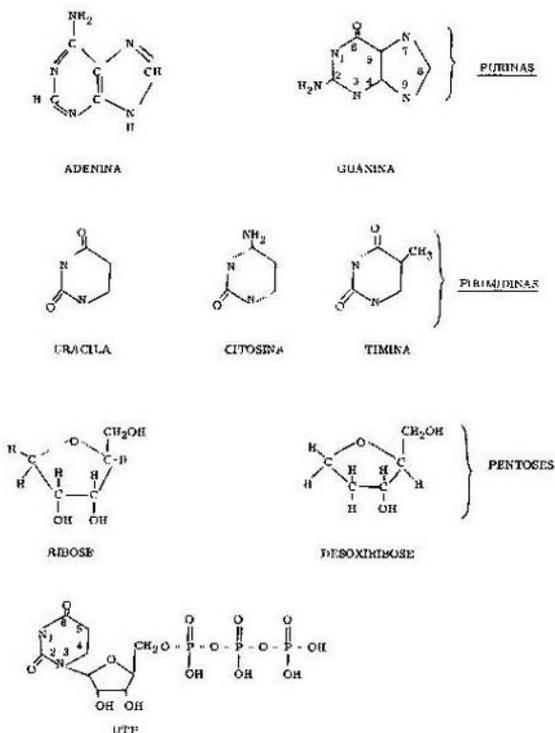


Fig. 53. Bases nitrogenadas e açúcares encontrados nos nucleotídios. Em baixo, para exemplificar, vê-se a estrutura da UTP (uridina trifosfato). Confronte esta figura com o texto da figura 27.

Como já vimos, os principais processos de síntese de compostos de alta energia formam ATP. Os outros trinucleotídeos são formados a partir dos dinucleotídeos que reagem com o ATP e recebem o grupo fosfato terminal. Essas reações são catalisadas por enzimas chamadas nucleotídeos difosfoquinases (Fig. 54).



Fig. 54. Exemplo de interconversão de nucleotídeos.

Muitos desses nucleotídeos são utilizados em processos biossintéticos específicos. Assim, UTP fornece energia para a biossíntese de alguns polissacarídeos; CTP é um doador específico para a biossíntese de lipídios complexos; e GTP atua na síntese de proteínas. Na figura 55, tem-se um quadro geral da participação dos diversos nucleotídeos na biossíntese de diferentes moléculas; e na figura 56, um esquema mostrando que o ATP participa da construção de moléculas na célula não somente pela doação de energia, mas também doando radicais que irão incorporar-se às moléculas que estão sendo formadas.

58

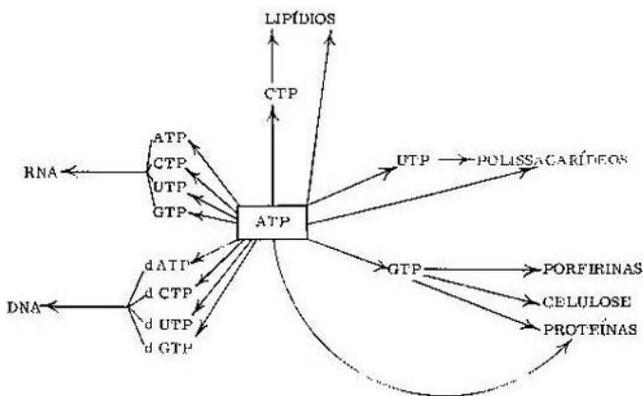


Fig. 55. Participação dos diversos nucleotídeos nos processos de biossíntese da célula.

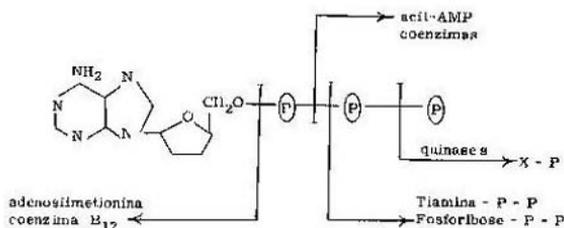


Fig. 56. Papel central da molécula de ATP nos processos de biossíntese. Há enzimas que são capazes de remover grupamentos inteiros da molécula de ATP e utilizá-los para a biossíntese de outros compostos. As quinases removem o grupo fosfato terminal do ATP formando compostos fosforilados (ex.: a glicocinase, que forma glicose-6-fosfato a partir de glicose). As enzimas de ativação de aminoácidos formam AMP-derivados de aminoácidos (acil-AMP), reação obrigatória no processo de síntese protéica (cf. Fig. 63). O fosforibosil-P-P é precursor da síntese de purinas e várias coenzimas (ex.: tiamina-P-P e coenzima B<sub>12</sub>) possuem núcleos químicos provenientes da molécula de ATP.

### Biossíntese de Polissacarídeos

Os polissacarídeos são moléculas de alto peso molecular (podem chegar até 10 000 000) formadas pela condensação de moléculas simples de açúcar. Entre os diversos polissacarídeos devemos destacar alguns mais importantes: a *amilopectina* e a *amilose*, principais constituintes do amido, que são a forma de armazenamento da glicose nas plantas; o *glicogênio*, polissacarídeo, correspondente à amilopectina, encontrado nos animais; *celulose*, substância fibrosa e insolúvel que tem função estrutural nas plantas; ácido *hialurônico*, que faz parte importante do grupo dos mucopolissacarídeos, que são substâncias viscosas encontradas no tecido conjuntivo intercelular.

Embora a amilose e o glicogênio sejam formados de moléculas de glicose, a amilose é uma molécula linear, disposta no espaço com uma estrutura helicoidal, e o glicogênio é uma molécula altamente ramificada. Na figura 57, vê-se como as moléculas de glicose se dispõem para formar o polímero. Essencialmente, as ligações entre as moléculas de glicose se fazem nas posições 1-4. Para haver ramificação basta que se estabeleça uma ligação 1-6. É o que acontece com o glicogênio e amilopectina. Como se vê pelo esquema, o principal nucleotídeo que participa da formação de glicogênio é o UTP, que durante a reação libera uma molécula terminal de ácido fosfórico e coloca nesta posição uma molécula de glicose. A construção da molécula do glicogênio é feita simplesmente pela adição de moléculas de glicose uma a uma (Fig. 58). Entretanto, deve-se notar que no processo geral são

gastas duas moléculas de ATP, uma para a fosforilação da glicose e outra para a regeneração do UTP. Na síntese da celulose, o UTP, é substituído pelo GTP.

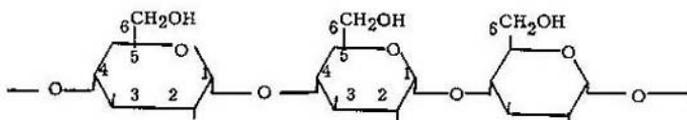


Fig. 57. Exemplo de estrutura de um polissacarídeo. A estrutura mostrada é linear porque feita exclusivamente por ligações 1-4. Há enzimas que estabelecem ligações 1-6, ramificando a molécula.

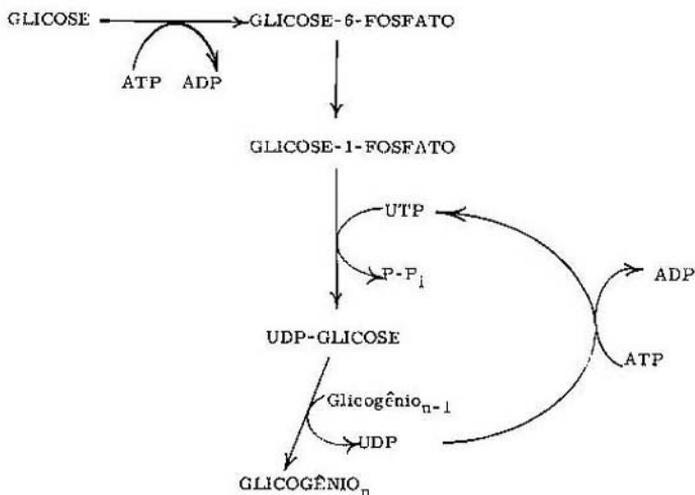


Fig. 58. Esquema de síntese do glicogênio.

### Biossíntese de Lipídios

Embora os lipídios sejam substâncias de peso molecular bem menor que os polissacarídeos (raramente atingem 1 000), a sua síntese é mais complicada em virtude da diversidade de subgrupos de lipídios existentes e em consequência do maior número de

diferentes ligações químicas que devem ser realizadas. Como já foi discutido anteriormente, os lipídios mais simples são os triglicerídios, formados por uma molécula de glicerol esterificado por ácidos graxos. A substituição de um dos ácidos graxos por um radical fosfato ao qual está ligada frequentemente uma molécula básica do tipo da colina ou da serina, forma o que se chama fosfolipídio. Os triglicerídios são encontrados no tecido adiposo, formando a gordura de reserva. Os fosfolipídios têm importante função estrutural, pois participam da formação de membranas, como a membrana da célula ou da mitocôndria. Além disso, as moléculas de fosfolipídio se encontram no plasma sanguíneo, onde exercem função de transporte de proteínas e outras substâncias. Em alguns tecidos, entretanto, encontram-se lipídios mais complexos, ligados a moléculas de açúcares simples ou de polissacarídeos: são as esfingomielinas, os cerebrosídeos e os gangliosídeos. É o caso do cérebro e das bainhas dos nervos, onde estes lipídios complexos exercem função estrutural importante.

Suponhamos, para exemplificar, a síntese de um fosfolipídio, a fosfatidilcolina ou *lecitina*. Essa substância é formada de quatro tipos principais de moléculas: glicerol, ácidos graxos, colina e ácido fosfórico. Evidentemente, cada uma dessas moléculas, antes de reagir, deve ser convenientemente ativada, de tal modo que a energia adquirida seja suficiente para a reação. Como se vê pela figura 59, a ativação dos ácidos graxos se faz por meio do ATP, que cede energia suficiente para que uma molécula de coenzima A possa reagir com o ácido graxo (cf. Figs. 40 e 41). Forma-se, assim, uma molécula de ácido graxo ativado, chamada genericamente de acil-coA. O glicerol, por sua vez, é ativado por outra molécula de ATP, formando-se o 3-fosfoglicerol. Finalmente, este complexo reage com a colina na forma de CDP-colina. Entretanto, para que se forme CDP-colina, há necessidade de que primeiramente a colina seja ativada a fosforilcolina, reação que despende outra molécula de ATP. A fosforilcolina reage então com CTP para formar CDP-colina. O leitor verifica, portanto, que, para a formação de uma molécula simples de lecitina, se gastam 4 moléculas de ATP e uma de CTP.

Posteriormente, a expensas de mais duas moléculas de ATP, o CMP que é liberado no final da reação transforma-se em CTP (Fig. 59). O leitor deve notar que, durante a ativação dos ácidos graxos, a energia doada provém de duas ligações de alta energia da molécula do ATP porque, em vez de ADP, se libera AMP. Esse AMP formado pode reagir com uma molécula de ATP mediante a catálise de uma enzima conhecida como mioquinase (ou aderilato quinase), formando-se duas moléculas de ADP que posteriormente serão fosforiladas a ATP pela cadeia de fosforilação oxidativa ou

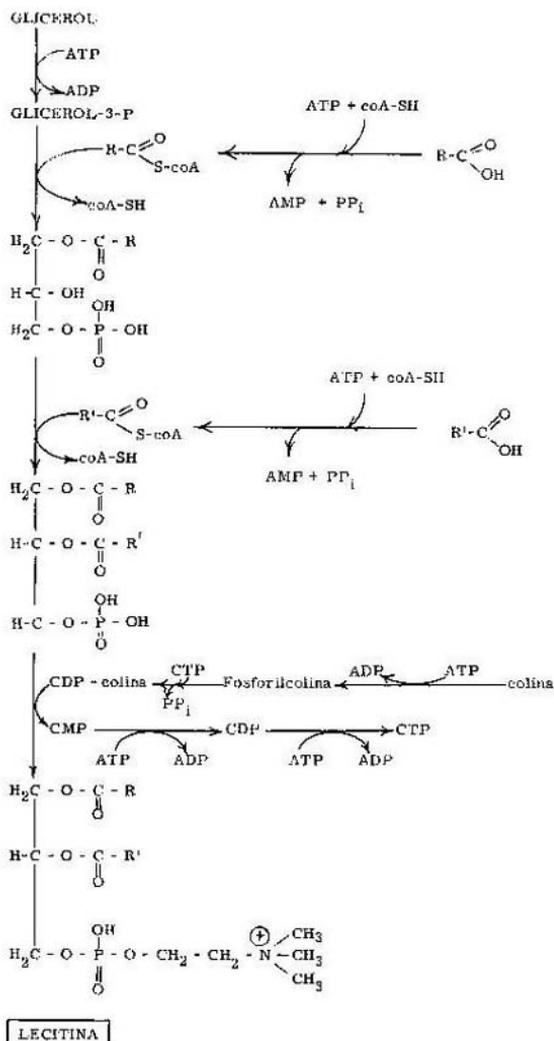


Fig. 59. Exemplo de biossíntese de um fosfolipídio: a lecitina ou fosforil-colina. A substituição da molécula de lecitina por serina ou inositol forma fosfatidil-serina ou fosfatidil-inositol, dois outros fosfolipídios comuns encontrados nas células. Confronte com a figura 38.

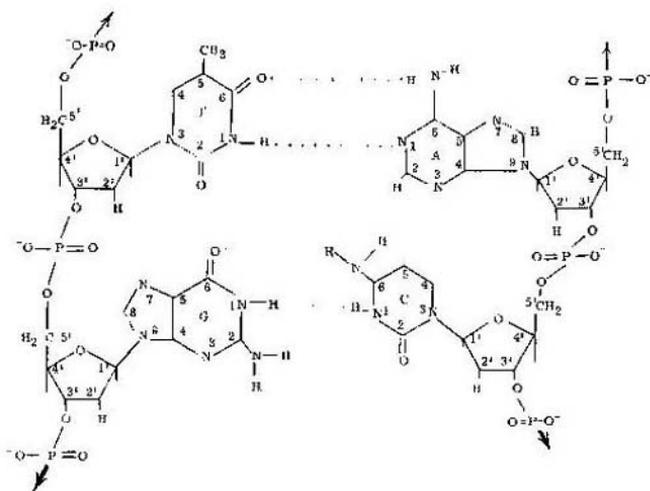
pela glicólise. Como se pode concluir, a menos que a estrutura do ATP não seja destruída e parcialmente incorporada como se descreve na figura 56, ele pode ser regenerado a partir de ADP e  $P_1$ , estabelecendo-se assim um equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação.

## Biossíntese de Proteínas e de Ácidos Nucléicos

Os ácidos nucleicos são moléculas especializadas que foram adaptadas para armazenar e transcrever informação. Em outras palavras, as células, ao se reproduzirem, transmitem às descendentes a mesma quantidade de informação que elas possuem, e essa informação está contida nas moléculas de ácidos nucleicos. Essa informação dirige os processos básicos de síntese de enzimas que, como já vimos, são responsáveis por todas as reações metabólicas na célula viva.

Há dois tipos de ácidos nucleicos: o DNA, ou ácido desoxiribonucleico, e o RNA, ou ácido ribonucleico. Ambos são moléculas de alto peso molecular, formadas essencialmente pela polimerização de nucleotídeos. O DNA é formado somente por desoxiribonucleotídeos, isto é, por nucleotídeos que contêm desoxiribose na molécula, e o RNA é formado somente por ribonucleotídeos, isto é, por nucleotídeos que contêm ribose na molécula. As bases nitrogenadas encontradas nesses ácidos também variam ligeiramente. Enquanto o DNA possui adenina, citosina, guanina e timina, o RNA possui adenina, citosina, guanina e uracila (cf. texto da Fig. 27).

O DNA é a principal molécula no armazenamento da informação e existe confinado no núcleo da célula. O peso molecular dessas substâncias atinge números mais altos do que  $10^8$  e a sua estrutura está descrita na figura 60. Como se vê pela figura, os diversos nucleotídeos, na forma de nucleotídeo monofosfato, ligam-se através de ligações 3'-5' entre os anéis de açúcar através de uma molécula de ácido fosfórico. Essa estrutura se repete milhares de vezes, possibilitando a formação de uma cadeia longa. Uma molécula de DNA de peso molecular  $10^8$  tem aproximadamente 3 000 000 de mononucleotídeos ligados entre si da forma descrita. Ainda pela figura 60, o leitor pode ver que uma dessas cadeias é acompanhada por outra paralela, de estrutura semelhante, e que as bases nitrogenadas ficam voltadas para o interior da dupla cadeia, ligadas entre si por meio de pontes de hidrogênio. As pontes de hidrogênio são ligações de natureza mais fraca que as ligações covalentes, e formam-se entre dois átomos de natureza eletronegativa (por exemplo, N e O), mantidos próximos um do outro por meio de um átomo de hidrogênio que "distribui" a sua carga positiva entre ambos. As pontes de hidrogênio são um tipo de ligação que mantém



64

Fig. 60. Estrutura da molécula de DNA. As letras no interior dos anéis significam: A=adenina, T=timina, C=citosina, G=guanina. As linhas pontilhadas representam as pontes de hidrogênio entre as bases.

a estrutura de ordem superior das proteínas (e, portanto, enzimas) discutida no Capítulo 1.

Entretanto, a estrutura da molécula de DNA é ainda um pouco mais complicada do que o que foi descrito. Como as proteínas, essa molécula tem uma estrutura espacial. Realmente, as duas longas cadeias paralelas se enrolam uma na outra formando uma longa hélice, classicamente comparada a uma escada helicoidal semelhante às encontradas nos faróis que iluminam a entrada dos portos. Os corrimãos da escada seriam as moléculas de desoxirribose ligadas entre si através de moléculas de ácido fosfórico e os degraus seriam as bases nitrogenadas.

Cada molécula de DNA tem uma seqüência de bases diferente e tal diferença determina a sua especificidade. O leitor pode imaginar a infinidade de combinações que podem ser realizadas numa seqüência que contém 3 000 000 de bases. Sabe-se também que a timina pertencente a uma cadeia somente estabelece pontes de hidrogênio com uma adenina da outra cadeia. A mesma correlação existe entre guanina e citosina. Por isso, numa molécula de DNA (dupla hélice), adenina = timina (A=T) e guanina = citosina (G=C). As duas cadeias são chamadas complementares.

Como dissemos anteriormente, o DNA encontra-se localizado no núcleo. Entretanto, ele dirige todos os processos básicos da célula, tais como a reprodução, o crescimento e síntese de moléculas necessárias à manutenção da vida na célula adulta. Por outro lado, sabe-se que as proteínas (e, portanto, enzimas) são sintetizadas nos ribossomos que existem no citoplasma. Como então uma substância que se encontra no núcleo pode dirigir um processo complexo que se passa no citoplasma? Como se reproduzem essas moléculas de DNA de tal modo que as células descendentes, após um ciclo reprodutivo, contenham a mesma quantidade de DNA e pode-se responder dividindo-se os fenômenos de transmissão da informação em três processos básicos distintos: a replicação, a transcrição e a tradução.

### A Replicação

O fenômeno da replicação, isto é, da síntese de uma molécula de DNA a partir de outra durante o fenômeno da divisão celular, ficou compreendido depois que se conseguiu obter a purificação do DNA e que se descobriu e purificou uma enzima que catalisa a síntese de DNA, a DNA-polimerase. É possível, num tubo de ensaio, obter síntese de DNA a partir de trinucleotídeos (desoxinucleotídeos) pela ação da DNA-polimerase (Fig. 61). Note o leitor que a matéria-prima para a síntese são os trinucleotídeos, substâncias de alta energia cuja síntese e interconversão já discutimos. A energia desses compostos é utilizada para realizar a sua ligação sob a forma de mononucleotídeos. Importante nessa reação é que não se consegue obter a síntese de DNA novo sem a adição prévia de algumas moléculas de DNA ao meio em que se processa a reação. A análise das novas moléculas de DNA formadas demonstra uma estrutura complementar.

Com esses dados e com a estrutura espacial da molécula de DNA em mente, podemos imaginar como se processa a síntese de novas moléculas de DNA (replicação) durante a divisão celular. As duas fitas que compõem a dupla hélice se separam e a DNA-polimerase, utilizando desoxinucleotídeos que se encontram no núcleo, sintetiza novas cadeias complementares àquelas que se estão separando. Formam-se então duas novas moléculas de DNA em dupla hélice, cada uma contendo uma das fitas complementares da molécula primitiva. Desse modo, mantém-se a informação através das sucessivas gerações. É importante notar que cada desoxinucleotídeo que entra na molécula libera a energia armazenada em duas ligações pirrofosfato. O leitor pode então imaginar



transcrição são determinadas pela existência de duas enzimas específicas. Uma que reconhece desoxiribonucleotídios e, particularmente, pareia adenina com timina (DNA-polimerase), e outra que reconhece ribonucleotídios e, particularmente, pareia adenina com uracila (RNA-polimerase). A estrutura do RNA é, pois, semelhante à do DNA e, portanto, as ligações entre os mononucleotídios se fazem entre as posições 3' e 5' das moléculas de ribose através de moléculas de ácido fosfórico. Deve-se salientar, entretanto, que a molécula de RNA é formada apenas por uma fita (single-stranded) e pouco se sabe sobre a sua estrutura espacial. Dêsse modo, apenas uma das fitas da molécula de DNA é copiada e o RNA assim formado, que contém a seqüência de bases complementar à seqüência de bases da fita copiada do DNA, é chamado RNA mensageiro, ou mRNA, e, do núcleo, vai ao citoplasma, onde dirige a síntese de proteínas. Assim, o leitor pode concluir que embora as duas fitas de DNA estejam presentes, somente uma é copiada e o mRNA formado tem então a seqüência de bases da fita de DNA que não foi copiada.

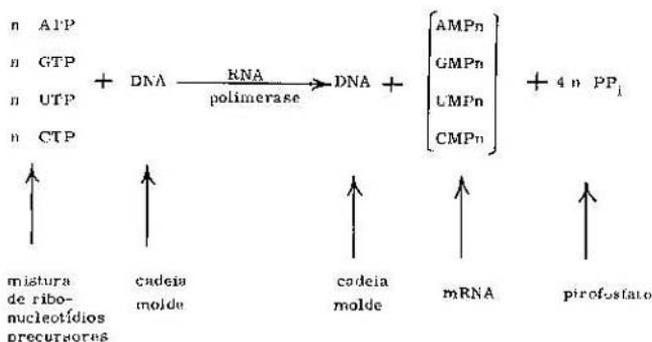


Fig. 62. Biossíntese do mRNA. Esta reação, como a reação homóloga de replicação, necessita de algumas moléculas de DNA, como molde, para se processar. Numa fase intermediária, consegue-se detectar a presença de uma molécula híbrida DNA-RNA que não está representada na figura.

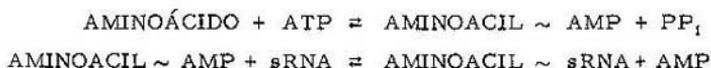
Do mesmo modo que na replicação, deve-se notar que grande número de ligações de alta energia é hidrolisado na formação do mensageiro.

### A Tradução

Com o mensageiro carregando a informação do núcleo aos ribossomos, podemos ver como se processa a síntese de uma proteína. De que modo esta informação é traduzida, isto é, de que modo as

enzimas que realizam a condensação dos aminoácidos ao nível dos ribosomas conseguem entender a mensagem e transformá-la numa proteína? A esta pergunta somente poderemos responder depois que discutirmos a função e a estrutura de um outro tipo de RNA, chamado RNA solúvel ou de transporte ou, simplesmente, sRNA.

Cada aminoácido, dos 20 existentes, deve, antes de ser incorporado a uma molécula protéica em crescimento, ser ativado. Do mesmo modo que, na síntese de fosfolipídios, um ácido graxo somente reage com a molécula de glicerol após a sua ativação a acil-coA, e do mesmo modo que, na síntese de glicogênio, a adição de mais uma molécula de glicose requer a sua ativação por meio de um nucleotídeo, os aminoácidos também devem adquirir energia suficiente para poderem reagir com a cadeia polipeptídica nascente. Essa ativação se faz em duas etapas: na primeira, a energia de uma molécula de ATP é conservada numa ligação entre o aminoácido e o AMP e, na segunda, o aminoácido ativado reage com uma molécula de sRNA e a energia do ATP é conservada nesta ligação (Fig. 63).



68

Fig. 63. Ativação do aminoácido. A molécula de aminoácido liga-se ao sRNA pela sua adenina terminal, na posição 3' da molécula de ribose (v. texto adiante).

O RNA solúvel existe no citoplasma da célula onde se dá a reação de ativação e é por meio dele que o aminoácido é transportado para os ribosomas. Ao contrário do mensageiro, que em geral é uma molécula de alto peso molecular, o sRNA tem aproximadamente um peso molecular de 30 000. Há, pelo menos, um sRNA específico para cada um dos 20 aminoácidos. Embora esse RNA seja também formado por uma única fita, a sua estrutura espacial é helicoidal e dupla. Isso porque a molécula é dobrada ao meio e se enrola sobre si mesma, formando uma espiral dupla (Fig. 64). Dêsse modo, as bases nitrogenadas de cada lado podem estabelecer pontes de hidrogênio e, portanto, forma-se uma estrutura espacial estável. Como resultante dêsse fato, uma das extremidades da molécula tem duas pontas livres, que estariam em extremidades opostas se a molécula fosse esticada. Todos os sRNA, independentemente de sua especificidade para determinado aminoácido, têm como terminação em uma das pontas a seqüência citosina-citosina-adenina (C-C-A) e na outra ponta, guanina (G).

A outra extremidade da molécula de sRNA, onde houve o dobramento, possui três bases livres, isto é, não pareadas com bases

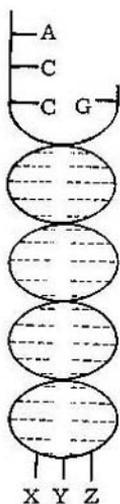


Fig. 64. Estrutura da molécula de sRNA. A terminação C-C-A é igual para todos os sRNA e os aminoácidos ligam-se à ribose da molécula de adenina terminal. As linhas pontilhadas representam as pontes de hidrogênio que se estabelecem entre as bases opostas. A especificidade de cada sRNA é determinada pela diferença na seqüência dessas bases e pelas três bases livres, representadas genericamente por X, Y, Z.

homólogas, que desempenham papel importante na especificidade da reação de síntese protéica. São essas bases que reconhecem as suas homólogas na superfície do mensageiro e estabelecem com elas pontes de hidrogênio. Desse modo, conclui-se que é a seqüência de bases do RNA mensageiro que determina qual o sRNA que vai ser utilizado em cada ponto da formação da cadeia protéica. (Fig. 65).

Os ribossomos, constituídos por ácido ribonucléico de alto peso molecular e proteínas, são necessários como superfície de contacto para que a reação entre o mensageiro e os sRNA possa processar-se. Os sRNA e o mensageiro ligam-se à superfície dos ribossomos que orientam os grupos reativos dessas duas substâncias, colocando-os em posição adequada para reagir.

Saliente-se que a formação das ligações peptídicas ao nível dos ribossomos necessita de GTP, que provavelmente cede energia para a reação.

Como se vê pela figura 65, três bases adjacentes na molécula de mensageiro são responsáveis pela adição de uma molécula de aminoácido na cadeia protéica. O DNA, portanto, transmite a sua mensagem ao ribossoma por meio de um código de três letras. O tipo de nucleotídeo e a ordem em que ele se encontra na seqüência traduz-se num aminoácido específico. Essa seqüência de três nucleotídios, que constitui uma unidade de informação, é chamada *codon*. A seqüência de bases complementares

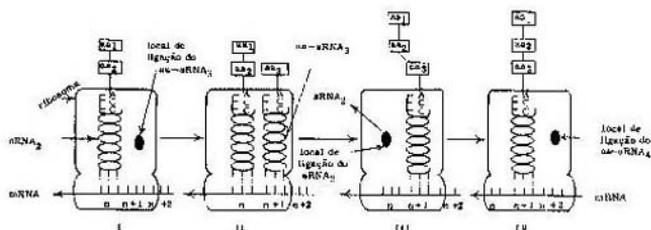


Fig. 65. Mecanismo de síntese de uma cadeia polipeptídica. A figura mostra como se processa a adição de um aminoácido a uma cadeia polipeptídica nascente. O ribossoma tem um local de ligação para o RNA mensageiro e pontos de ligação para os sRNA. Em I vê-se um sRNA ligado ao mensageiro na superfície do ribossoma. Saliente-se que a ligação entre o mRNA e o sRNA é feita por meio de uma seqüência de três bases complementares através de pontes de hidrogênio. Assim, por exemplo, na posição  $n$ , se a seqüência de bases do RNA mensageiro for A-U-C, o sRNA terá a seguinte seqüência de bases livres terminais: U-A-G. Ao sRNA, denominado sRNA<sub>2</sub>, estão ligados dois aminoácidos. Em II, verifica-se que uma outra molécula de sRNA transportando outro aminoácido liga-se ao ribossoma, pareando as suas bases livres com a seqüência de bases do mRNA adjacente à posição  $n$ , chamada  $n + 1$ . Numa terceira fase (III), o sRNA<sub>2</sub> é liberado, mas os dois aminoácidos que a ele estavam ligados (aa<sub>1</sub> e aa<sub>2</sub>) estabelecem uma ligação peptídica com o aminoácido aa<sub>3</sub> ligado ao sRNA<sub>3</sub>. Finalmente, em IV, verifica-se que a cadeia polipeptídica cresceu em mais um aminoácido e que a seqüência de três bases do mRNA na posição  $n + 2$  se coloca em posição na superfície do ribossoma para receber o sRNA<sub>4</sub>. Forma-se assim a cadeia protéica. Na figura foi apenas descrito o que acontece numa fase determinada do crescimento de uma proteína, isto é, durante a adição de um aminoácido. Entretanto, o RNA mensageiro é muito grande, chegando a ter pesos moleculares da ordem de 1 000 000. Isso faz com que, ao longo de toda a fita de RNA mensageiro, possa estar ligado mais de um ribossoma. Realmente, é o que acontece e, em geral, verifica-se que a uma molécula de mensageiro ligam-se 5 a 7 ribossomas, formando o que se chama de *polisoma*. Como, após cada adição de um aminoácido, há necessidade de que a seqüência de três bases adjacentes do mRNA se coloque na superfície do ribossoma para receber a próxima molécula de sRNA, todo o fenômeno se processa como se os ribossomas estivessem caminhando sobre o molécula de mensageiro, ou o mRNA estivesse deslizando sobre os ribossomas, como está indicado na figura pelo sentido das flechas. Daí se conclui que cada polisoma sintetiza o mesmo tipo de proteína (que é condicionada pelo mensageiro único) e que cada ribossoma na superfície do mRNA possui uma cadeia protéica em diferentes estágios de crescimento.

da molécula de sRNA que se liga ao codon é chamada *anticodon*. O leitor pode imaginar que um erro na transmissão da informação, durante a transcrição, a tradução ou a replicação, leva à produção de uma proteína cuja seqüência de aminoácidos não é a natural. Com isso pode-se ter a síntese de uma enzima deficiente ou inativa. Esse erro pode dar-se pela simples troca de uma das bases na molécula de DNA, durante a replicação; ou na molécula de RNA, durante a transcrição. Esse fenômeno, que ocorre na natureza com uma freqüência de  $10^{-6}$ , é chamado mutação. Entretanto, a freqüência de mutação pode ser aumentada em condições experimentais pelo uso de drogas ou de radiações que atuam nos mecanismos de transmissão da informação.

Verifica-se, portanto, pelo que foi descrito, a extrema importância dos nucleotídios purínicos e pirimidínicos nos processos de biossíntese de ácidos nucléicos e proteínas. Não só participam eles da estrutura das moléculas que contêm a informação como cedem enormes quantidades de energia para a sua formação.

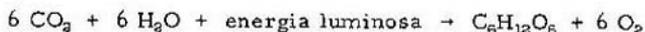


# 5

## FOTOSSÍNTESE

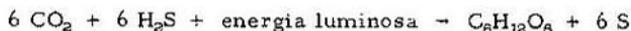
A energia proveniente do sol é, em última análise, a fonte primeira de toda a energia dos sistemas biológicos. Essa energia é transformada em energia química potencial pelos vegetais durante o processo da fotossíntese. De modo genérico, podemos dizer que a fotossíntese é um processo pelo qual as plantas conseguem utilizar dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) para a síntese de moléculas de açúcar (glicose e outros carboidratos).

A equação geral da fotossíntese pode ser descrita como se segue:



Esta reação, entretanto, somente é possível em presença de um pigmento verde que existe nos vegetais --chamado clorofila-- e que é capaz de absorver luz de determinados comprimentos de onda.

Embora, por questão de facilidade, se descreva a reação acima nas plantas verdes, há outros seres vivos, como certas bactérias, que não produzem oxigênio durante a fotossíntese. Esses seres usam outras substâncias em vez de  $\text{H}_2\text{O}$ , como, por exemplo,  $\text{H}_2\text{S}$ . Neste caso, em vez de oxigênio, há produção de enxofre elementar:



### COMO A CLOROFILA PARTICIPA DO PROCESSO DE FOTOSSÍNTESE

Muitas são as substâncias cujas moléculas têm capacidade de absorver energia. Essa capacidade varia muito e é determinada pela estrutura atômica e, particularmente, pela estrutura eletrônica da molécula.

Como se sabe, a luz é uma forma de radiação eletromagnética formada de corpúsculos denominados fótons. Quando um

fóton atinge uma molécula que é capaz de absorver a radiação luminosa, um elétron pertencente a uma camada interna (mais próximo do núcleo do átomo e, portanto, com energia mais baixa) pode absorver a energia desse fóton e saltar para uma camada mais externa. Quando isso acontece, o átomo torna-se bastante instável e é dito no estado excitado. Esse elétron, depois de certo tempo, pode voltar à orbital primitiva, e nesse processo há dissipação da energia absorvida, parte sob a forma de calor e parte sob a forma de luz. Este último fenômeno é denominado fluorescência. Às vezes, entretanto, se a quantidade de energia absorvida pelo elétron for muito grande, ele pode escapar do átomo a que pertence e pode, por exemplo, ser recolhido por um fio, gerando uma corrente elétrica. Este fenômeno é o que ocorre nas células foto-elétricas.

Se então isolarmos e purificarmos clorofila a partir de folhas de plantas, por exemplo, podemos no tubo de ensaio obtê-la no estado excitado, quando fazemos incidir luz sobre ela em determinadas condições. Entretanto, essas moléculas de clorofila excitadas são incapazes de realizar trabalho químico porque elas simplesmente voltam ao estado primitivo quando se suprime a fonte de energia e toda a energia absorvida é liberada sob a forma de calor e luz. Como entender, então, a participação da clorofila no processo da fotossíntese?

A molécula da clorofila é formada por quatro anéis pirrólicos ligados entre si através de pontes metênicas e de um átomo central de magnésio. Como se verifica pela figura 66, é uma molécula bastante parecida com o grupo prostético das moléculas de citocromo e de hemoglobina.

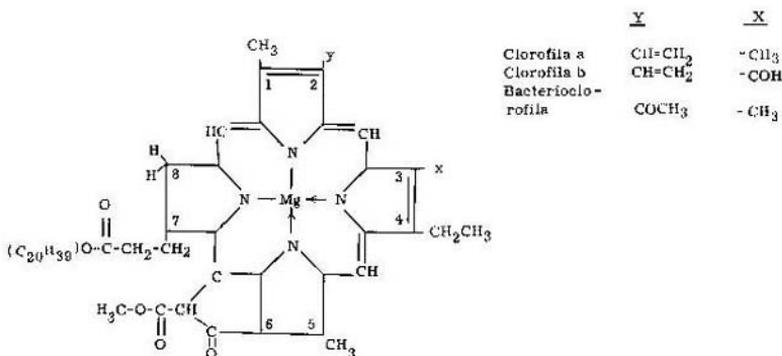


Fig. 66. Estrutura da molécula de clorofila. O radical ligado no carbono 7 do anel pirrólico é um radical fitil.

Se, num gráfico de coordenadas cartesianas, colocarmos a capacidade que possui a clorofila de absorver luz nas ordenadas e os comprimentos de onda nas abscissas, teremos (Fig. 67) o espectro de absorção dessa substância. Pela figura vê-se também que a eficiência de fotossíntese medida, por exemplo, pela quantidade de oxigênio produzido por quantum de luz incidente, acompanha o espectro de absorção e atinge o máximo no pico máximo de absorção de luz. Ainda pela figura 67 vê-se que a absorção máxima está na região do vermelho, o que dá à clorofila a cor verde característica que é refletida.

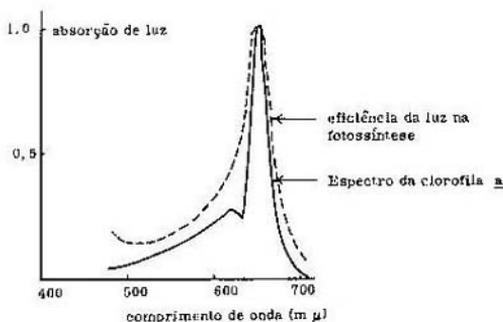


Fig. 67. Espectro de absorção da clorofila *a*.

Existem dois tipos de clorofila descritos: clorofila *a* e clorofila *b*, que diferem entre si por absorverem luz de comprimentos de onda diferentes, o que é uma expressão da diferença molecular como se vê na figura 66. Entretanto, sistemas mais acurados de medida "in vivo" demonstram que a clorofila *a* possui dois componentes que têm absorção máxima em dois comprimentos de onda diferentes: 670 e 683 mμ. Essa diferença talvez reflita tipos diferentes de associação da molécula de clorofila com outras substâncias como lipídios, proteínas e fosfolipídios da célula. Além disso, verifica-se que outros pigmentos estão envolvidos no processo de fotossíntese, variando na dependência do tipo de organismo estudado. Para efeito de melhor compreensão, dividiremos em dois os sistemas envolvidos no processo de fotossíntese: o sistema I, que contém clorofila *a* (670 mμ), clorofila *b* e alguns pigmentos acessórios; e o sistema II, que contém clorofila *a* (683 mμ) e pigmentos.

Apesar da clorofila "in vitro" passar ao estado excitado pela ação de uma fonte luminosa e posteriormente retornar ao estado primitivo com emissão de luz, "in vivo" a energia que atinge os sistemas de pigmentos é suficiente para expelir um elétron, que

é apanhado por uma série de substâncias intermediárias capazes de sofrer processos de óxido-redução, como veremos mais adiante. A clorofila e os pigmentos acessórios funcionam, pois, como verdadeiras células fotoelétricas.

## O FENÔMENO DA FOTOFOSFORILAÇÃO

Por simplicidade, vejamos primeiramente por que modo participa o sistema I na fotossíntese. Quando um fóton de luz atinge o sistema I, um elétron que adquiriu suficiente energia é expelido e passa por uma cadeia de substâncias que sofrem óxido-redução num processo semelhante ao que ocorre no transporte de elétrons nas mitocôndrias.

A substância que recebe em primeiro lugar o elétron é conhecida com o nome de *ferredoxina*, que é uma proteína que contém ferro e que possui eletronegatividade maior que os nucleotídeos piridínicos (NAD e NADP), o que equivale a dizer que em presença desses compostos a *ferredoxina* é capaz de se oxidar entregando elétrons a eles. Como se vê pela figura 68, a *ferredoxina* tem alta eletronegatividade, sendo um dos compostos da natureza de menor potencial de óxido-redução. É fácil deduzir que somente com a energia doada ao elétron pelo fóton é possível o "salto" do elétron do sistema I para a *ferredoxina*. A *ferredoxina* então entrega os elétrons para um citocromo da classe dos citocromos B, denominado citocromo  $b_6$ , que, por sua vez, reduz outro citocromo, chamado citocromo  $f$ , que é encontrado somente nas plantas verdes. Finalmente, o elétron volta ao sistema I. Como se vê pela figura 68, a passagem do elétron através dos citocromos a partir da *ferredoxina* se faz de potenciais negativos para potenciais positivos, vale dizer, espontaneamente. Com isso, há uma liberação de energia que é suficiente para a síntese de duas moléculas de ATP. Esse fenômeno é chamado *fotofosforilação cíclica*; e facilmente se conclui que a energia luminosa cedida pelo fóton é conservada sob a forma de energia química na molécula de ATP, em vez de se dissipar por fluorescência como acontece "in vitro".

Verifica-se, entretanto, que os fenômenos que ocorrem durante a fotofosforilação são mais complicados do que o que foi exposto. Realmente, o processo de fotofosforilação cíclica é apenas uma parte de um processo mais geral denominado *fotofosforilação não cíclica*. Assim é que a *ferredoxina* pode atuar como um potente redutor de diversas substâncias necessárias como precursores de diversos processos biossintéticos (ver Fig. 69). Uma dessas substâncias é o NADP, cuja função será vista mais adiante. Entretanto, se a *ferredoxina* gasta os elétrons na redução de outras substâncias,

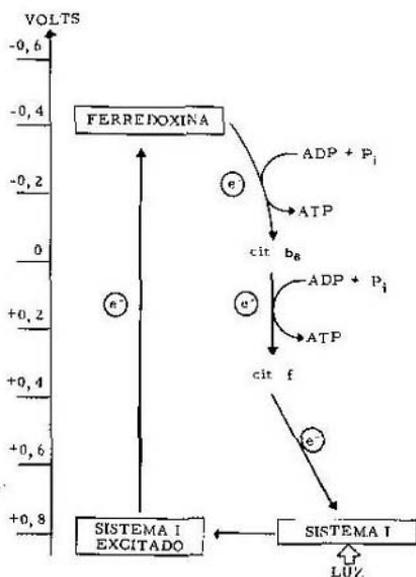
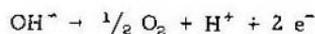
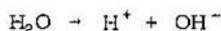


Fig. 68. Esquema da fotofosforilação cíclica.

há necessidade de que haja uma fonte de elétrons para compensar as perdas do sistema I, que não mais os recebe de volta. Essa compensação é feita pelo sistema II que, sob a ação dos fótons de luz, emite elétrons que seguem o caminho descrito na figura 69. O sistema II, por sua vez, é compensado com elétrons provenientes da molécula de  $H_2O$  que, acredita-se, sofre as seguintes reações:



Pouco se sabe dos detalhes desta reação, que apresenta muitas dificuldades de estudo, mas por este esquema verifica-se que o oxigênio que é liberado pelas plantas durante a fotossíntese provém da molécula de água. Isso foi demonstrado usando-se isótopos do oxigênio como marcadores.





## FORMAÇÃO DE CARBOIDRATOS NA FOTOSÍNTESE

Uma vez ocorridos os processos de fotofosforilação, as reações que iremos descrever podem ocorrer na ausência de luz (reações de escuro).

✽

O problema da biossíntese da glicose durante a fotossíntese, pela utilização de  $\text{CO}_2$ , somente foi elucidado quando se utilizaram técnicas engenhosas e precisas de detecção dos intermediários. Isso foi conseguido pela utilização de  $\text{CO}_2$  marcado com o isótopo radioativo do carbono, o  $^{14}\text{C}$ . Os pesquisadores injetavam, numa suspensão de algas verdes,  $\text{CO}_2$  radioativo sob a forma de ácido bicarbônico ( $\text{H}^{14}\text{CO}_3$ ) e, em curtos espaços de tempo, paralisavam a reação por intermédio de álcool que desnatura as enzimas e analisavam os produtos formados por meio de cromatografia em papel e radioautografia. Verificaram então que havia uma reação do  $\text{CO}_2$  com ribulose-1-5-difosfato, que é um açúcar de 5 carbonos bifosforilado (Fig. 70). Verificaram também que o primeiro produto estável que se formava após 5 segundos de exposição à luz era o ácido 3-fosfoglicérico. Se a exposição à luz se fizesse por mais tempo, apareciam nos radioautogramas açúcares fosforilados de 3, 4, 5, 6 e 7 carbonos, aminoácidos e ácidos orgânicos. Por esse método e, posteriormente, pelo isolamento das enzimas e estudo das reações individuais, estabeleceu-se um esquema geral do processo de fotossíntese que está descrito na figura 70. Verifica-se pelo esquema que algumas reações necessitam de ATP e de uma fonte redutora que é o  $\text{NADPH}_2$ , substâncias que, como já vimos, são feitas durante a fotofosforilação.

80

### A Estrutura dos Cloroplastos

Todas as reações que acabamos de descrever se passam no interior dos cloroplastos, que são corpúsculos de 3 a  $8\mu$  de comprimento e, portanto, um pouco maiores que as mitocôndrias. Entretanto, como as mitocôndrias, esses corpúsculos possuem uma dupla membrana e cristas que se projetam no interior e que provêm da membrana interna. As membranas possuem lipídios e proteínas dispostas de modo semelhante às mitocôndrias; e os pigmentos e enzimas que catalisam as reações fazem parte da estrutura da membrana, também dispostos numa ordem definida. Há, portanto, grande semelhança estrutural entre os cloroplastos e as mitocôndrias.

## BIBLIOGRAFIA

### Compendios

- (1) CONN, E. E. e STUMPF, P. K. *Outlines of Biochemistry*, Wiley, Nova York, N. Y. (1963).
- (2) WHITE, A., HANDLER, P. e SMITH, E. L. *Textbook of Biochemistry*, McGraw-Hill, Nova York, N. Y. (1964).
- (3) RAW, I. e COLLI, W. *Fundamentos de Bioquímica*, Editora Universidade de Brasília, Brasil, 2 Vol. (1965).
- (4) FRAENKEL-CONRAT, H. *Design and Function at the Threshold of Life: The Viruses*, Academic Press, Nova York, N. Y. (1962). Este livro pode ser obtido na tradução portuguesa publicada pela Editora Universidade de Brasília, Brasil (1965).
- (5) LEHNINGER, A. L. *Bioenergetics*, Benjamin, Nova York, N. Y. (1964).
- (6) LEHNINGER, A. L. *The Mitochondrion: Molecular Basis of Structure and Function*, Benjamin, Nova York, N. Y. (1964).
- (7) WATSON, J. D. *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin, Nova York, N. Y. (1965).
- (8) INGRAM, V. M. *The Biosynthesis of Macromolecules*, Benjamin, Nova York, N. Y. (1965).
- (9) CALVIN, M. e BASSHAM, J. A. *The Photosynthesis of Carbon Compounds*, Benjamin, Nova York, N. Y. (1962).
- (10) MAHLER, H. R. e CORDES, E. H. *Biological Chemistry*, Harper & Row, Nova York, N. Y. (1966).

### Artigos de Divulgação

- (11) Inúmeros artigos de ótimo nível têm sido publicados pela Editora do *Scientific American*, Nova York, N. Y., sobre quase todos os assuntos tratados neste livro.

### Artigos Especializados

- (12) Todos os anos publica-se uma revisão das últimas descobertas em diversos campos da bioquímica no *Annual Review of Biochemistry*.
- (13) Simpósios sobre Fosforilação Oxidativa. *Federation Proc.*, **22** (1963).
- (14) SKOU, J. C. Enzymatic Aspects of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  Transport. Em: *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **14** (1964).
- (15) HASSELBACH, W. Relaxing Factor and Relaxation of Muscle. Em: *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **14** (1964).
- (16) PULLMAN, M. E. e SCHATZ, G. Mitochondrial Oxidations and Energy Coupling. Em: *Ann. Rev. Biochem.* (1966).

## COLEÇÃO DE MONOGRAFIAS CIENTÍFICAS

### Publicadas

#### Série de matemática

- Nº 1. La Revolución en las Matemáticas Escolares, pelo Conselho Nacional de Professores de Matemática dos Estados Unidos da América.
- Nº 2. Espacios Vectoriales y Geometría Analítica, por Luis A. Santaló.
- Nº 3. Estructuras Algebraicas, por Enzo R. Gentile.
- Nº 4. Historia de las Ideas Modernas en la Matemática, por José Babiní.

#### Série de física

- Nº 1. Concepto Moderno del Núcleo, por D. Allan Bromley.
- Nº 2. Panorama de la Astronomía Moderna, por Félix Cernuschi e Sayd Codina.

#### Série de química

- Nº 1. Cinética Química Elemental, por Harold Behrens Le Bas.
- Nº 2. Bioenergética, por Isaías Raw e Walter Colli.

#### Série de biología

- Nº 1. La Genética y la Revolución en las Ciencias Biológicas, por José Luis Reissig.
- Nº 2. Bases Ecológicas de la Explotación Agropecuaria en la América Latina, por Guillermo Mann F.
- Nº 3. La Taxonomía y la Revolución en las Ciencias Biológicas, por Elías R. de la Sota.

### Em preparação

#### Série de matemática

- Algebra Lineal, por Orlando Villamayor.
- Algebra Linear e Geometria Euclidiana, por Alexandre Martins Rodrigues.
- Funções Reais de Variável Real, por Djairo Guedes de Figueiredo.

Números Reales y Complejos, por César A. Trejo.  
Programación Lineal, por Enrique Cansado.  
Introducción a la Topología, por Juan Horváth.  
Funciones de Variable Compleja, por José Nieto.

#### Série de física

Física de Partículas, por Igor Saavedra.  
La Estructura Electrónica de los Sólidos, por Leopoldo M. Falicov.  
Física Nuclear, por Mariano Bauer E. e Alfonso Mondragón.  
Física Cuántica, por Thomas A. Brody.  
Experimento y Teoría en la Enseñanza de la Física al Nivel Secundario, por Félix Cernuschi.  
Nuevas Orientaciones en la Enseñanza de la Física, por Darío Moreno.

#### Série de química

Mecanismos de Reacciones, por Jorge Brieux.  
Elementos Encadenados, por Jacobo Gómez Lara.  
Macromoléculas, por Alejandro Paladini e Moisés Burachik.  
Enseñanza de la Química Experimental, por Francisco Ciral.  
Complejos, por Manuel Madrazo Garamendi.

#### Série de biología

Principios Básicos para la Enseñanza de la Biología, por Oswaldo Frota-Pessoa.  
A Vida da Célula, por Renato Basile.  
Microorganismos, por J. M. Gutiérrez-Vázquez.  
El Comportamiento Animal, por Josué A. Núñez.

