

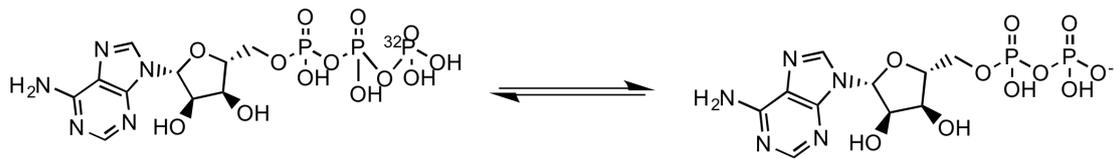
QBQ 1252 – Bioquímica Metabólica 2016
Roberto K. Salinas
roberto@iq.usp.br

Metabolismo

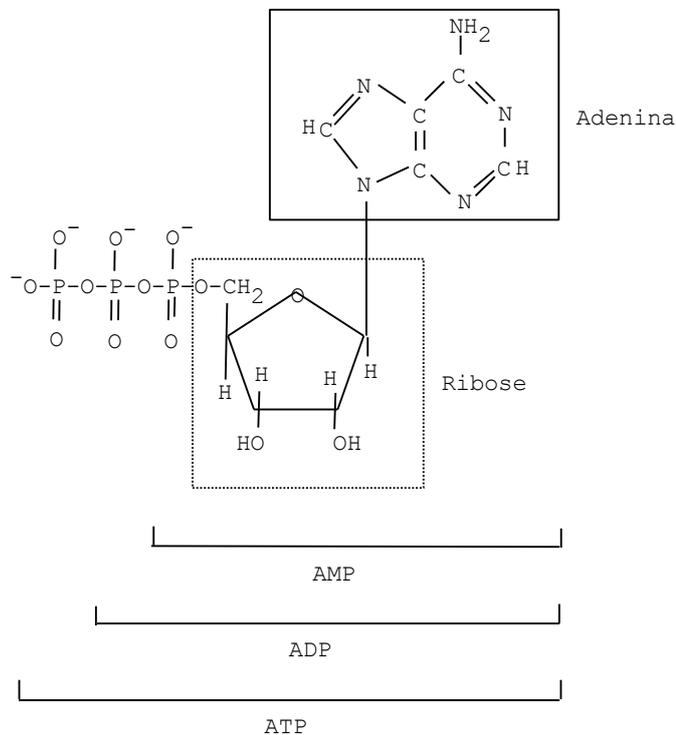
Fermentação alcoólica

Em aulas anteriores vimos como a hidrólise de ATP formando ADP e fosfato inorgânico libera uma grande quantidade de energia (**Figura 11**) que será utilizada para promover processos celulares que requerem o fornecimento de energia. Estes processos podem ser: i) contração muscular e movimentos celulares, ii) transporte ativo de íons e moléculas através da membrana, iii) síntese de aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, DNA e outros compostos necessários à célula.

Como exemplo de transporte ativo, lembrem-se daquele promovido pela bomba de Na^+/K^+ para a manutenção do gradiente iônico através da membrana plasmática (*aulas anteriores*).



$$\Delta G^\circ = -30.5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$



ATP = Adenosina 5'-trifosfato

Figura 11. Reação de hidrólise de ATP formando ADP e fosfato inorgânico (Pi). A variação de energia livre nas condições padrão (ΔG^0) está indicada. Esta reação possui um ΔG ainda mais negativo nas condições celulares devido às concentrações fora do equilíbrio de ADP e ATP (veja a equação 3, pág. 10)!! Estrutura dos compostos fosforilados ATP, ADP e AMP.

O metabolismo celular é voltado para dois aspectos fundamentais: i) produção de ATP para fornecer energia para os processos celulares e ii) síntese de intermediários de biossíntese (ác. graxos, lipídeos, hormônios, aminoácidos, nucleotídeos, etc). O metabolismo degradativo é chamado de **catabolismo**, enquanto que o metabolismo biosintético é conhecido como **anabolismo**. Organismos que obtém energia livre a partir da luz do sol são chamados de fótotropicos, enquanto que

organismos que obtêm energia livre através da oxidação de moléculas (exemplo açúcares) são chamados de quimiotrópicos.

Células clivam e oxidam moléculas glicose para produzir energia na forma de moléculas de ATP e intermediários para as reações de biossíntese. A principal via para obtenção de ATP é o metabolismo de glicose que se inicia através da quebra da glicose pela via glicolítica, **na qual uma molécula de glicose é clivada em duas moléculas de piruvato (ácido pirúvico) com a concomitante formação de duas moléculas de ATP.**

A descoberta da via glicolítica (ou glicólise) está intimamente relacionada ao estudo da **fermentação alcoólica** promovida por leveduras. De fato, uma parte da bioquímica tal qual conhecemos hoje originou-se a partir do estudo da fermentação alcoólica durante o final do século XIX e a primeira metade do século XX. Nessa época, sabia-se que leveduras eram capazes de fermentar açúcar para produzir etanol (**Figura 12**), e percebeu-se que tanto o extrato de levedura como as células vivas possuíam a mesma atividade. Uma fração do extrato de leveduras que era não dializável e sensível à temperatura foi chamada de zymase, enquanto que outra fração que era dializável e insensível à temperatura foi chamada de cozymase. Mais tarde descobriu-se que zymase e cozymase eram, respectivamente, uma mistura de enzimas e de co-fatores como NAD^+ , ATP, ADP e íons metálicos.

Pesquisas realizadas para compreender este fenômeno acabaram conduzindo à descoberta da sequência de reações de envolvidas na quebra anaeróbica de glicose (hexose; açúcar de 6 carbonos) em etanol e gás carbônico, e à identificação e isolamento das enzimas que catalisam estas reações. Estes estudos, realizados simultaneamente tanto em leveduras como em extratos de músculo, mostraram que a glicólise é uma via comum a todos os organismos, de procariotos às nossas células humanas.

A glicólise quebra duas moléculas de glicose (uma hexose) em duas moléculas de piruvato (ácido pirúvico). O catabolismo **anaeróbico** do piruvato em células de levedura leva à formação de **etanol**, enquanto que em células musculares leva à formação de **ácido láctico (Figura 13)**. O ácido láctico é formado no músculo quando a quantidade de oxigênio disponível é insuficiente para promover o metabolismo aeróbico (por exemplo, uma situação de exercício físico intenso). O ácido láctico formado no músculo pode ser convertido novamente em glicose nas células do fígado pelo chamado “ciclo de Cori”.

A sequência de reações enzimáticas da via glicolítica tal como a conhecemos hoje pode ser observada na Figura 14.

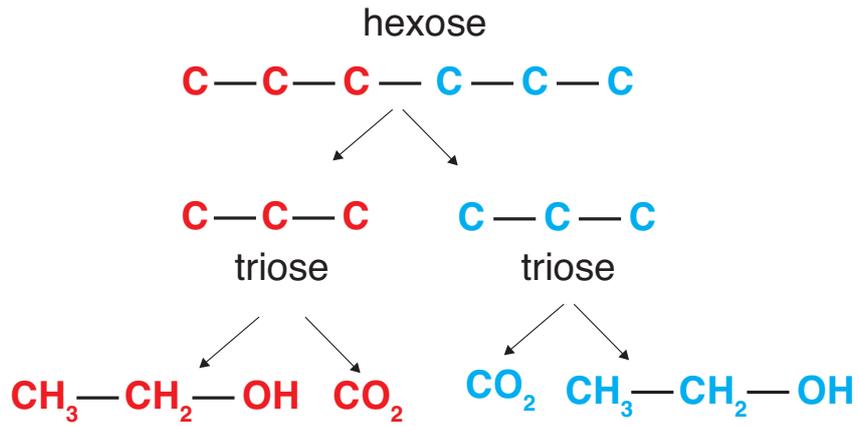


Figura 12. Destino dos átomos de carbono da glicose durante a fermentação em leveduras. Baseado em Barnett (2003) *Yeast* **20**: 509-543.

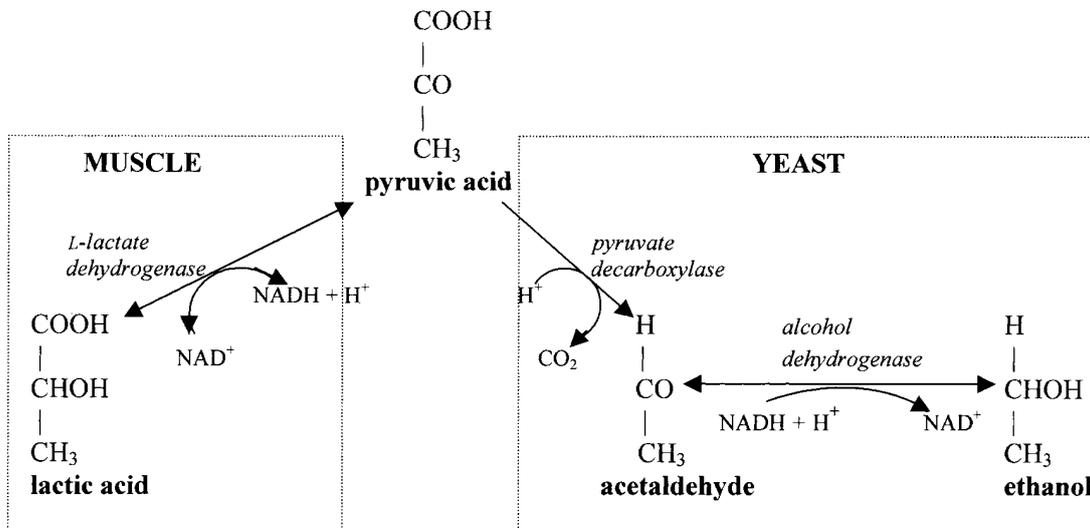


Figura 13. Catabolismo do piruvato a etanol (levedura) ou ácido láctico no músculo em condições anaeróbicas. Retirado de Barnett (2003) *Yeast* **20**: 509-543.

GLICÓLISE

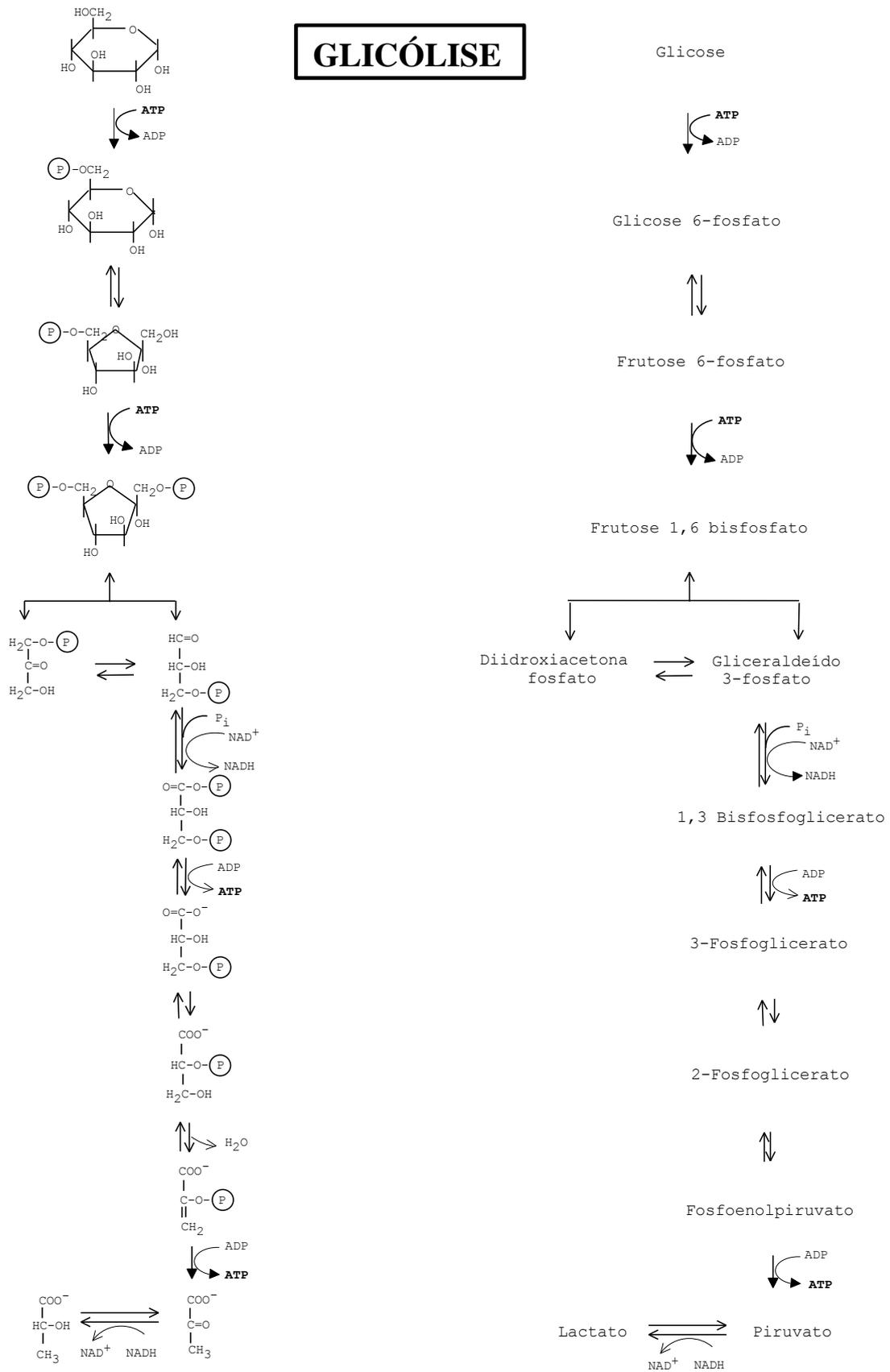


Figura 14. Sequência de reações que compõem a glicólise e a fermentação láctica.

Todas as reações ocorrem no citosol das células eucarióticas. A glicose não atravessa a membrana celular, entra na célula com auxílio de uma proteína carreadora específica. Imediatamente, é possível notar que: i) a glicólise envolve duas etapas de fosforilação por ATP, formando ADP e fosfato inorgânico (Pi); ii) cada molécula de glicose contendo 6 átomos de carbono é convertida em duas moléculas de ácido pirúvico, mais oxidado; iii) o processo global envolve a formação de 4 moléculas de ATP, ou seja, produção líquida de duas moléculas de ATP; iv) ocorre uma reação de oxido-redução quando gliceraldeído-3-fosfato é convertido em 1,3-bifosfoglicerato, os elétrons são transferidos para a coenzima **NAD⁺** formando **NADH**.

Vamos analisar estas reações em mais detalhe.

Reação 1: Fosforilação de glicose por ATP formando glicose-6-fosfato e ADP. Essa reação é catalisada pela hexoquinase.

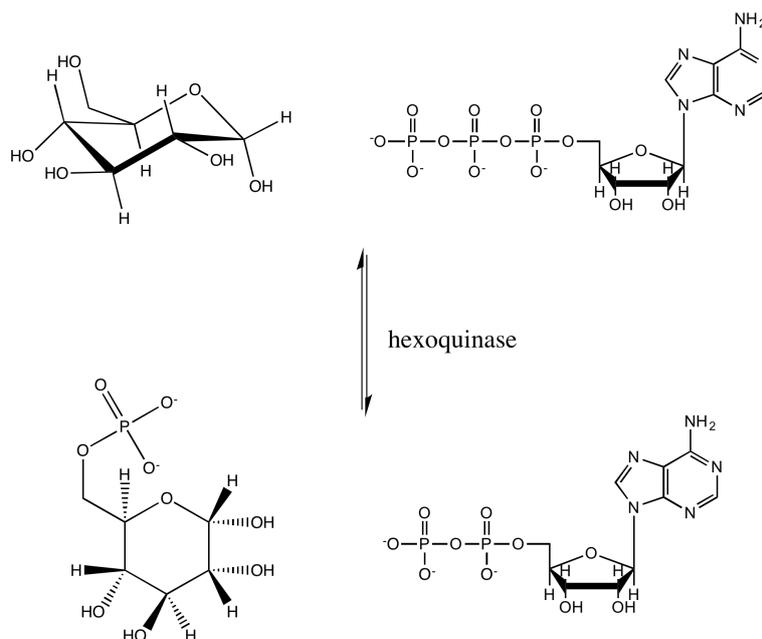


Figura 15. Reação de fosforilação da glicose por ATP formando glicose-6-fosfato e ADP. Essa reação é catalisada pela hexoquinase. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = -16.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

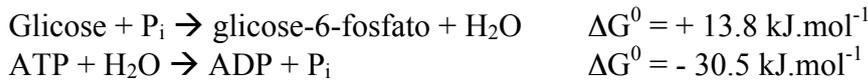
É interessante notar que já no início do século XX era sabido que glicose-6-fosfato (hexose fosfato) não era fermentada ou hidrolisada por leveduras. A explicação para essa observação é que as células não possuem proteínas de membrana transportadores de glicose-6-fosfato (ou frutose 1,6 bifosfato). Portanto, o açúcar fosforilado é incapaz de entrar ou sair da célula.¹

A enzima que catalisa esta reação é chamada **hexoquinase**. Quinases são enzimas que catalisam a adição de um grupo fosforil do ATP para outra molécula.

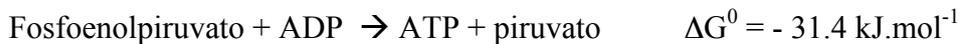
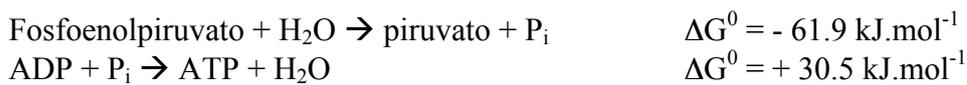
A reação de fosforilação da glicose formando glicose-6-fosfato ilustra um dos aspectos principais do metabolismo: reações endergônicas (que requerem o fornecimento de energia livre para ocorrer) são tornadas espontâneas através do acoplamento com outra reação altamente exergônica (que libera uma grande

¹ Note que a célula possui transportadores de glicose (exemplo GLUT1, GLUT2, etc). Estes transportadores são específicos para glicose.

quantidade de energia livre). A reação entre glicose e fosfato inorgânico (PO_4^{-3}) formando glicose-6-fosfato consome uma grande quantidade de energia e não ocorreria caso não fosse acoplada à reação de hidrólise de ATP:



Evidentemente estas duas reações não ocorrem isoladamente em água, mas uma enzima, a hexoquinase aproxima os reagentes e propicia um ambiente adequado para a reação ocorrer. Da mesma forma, a formação de ATP somente é possível porque está acoplada a outra reação mais exergônica (ver abaixo):



Logicamente que se as reações de hidrólise de fosfoenolpiruvato e fosforilação de ATP ocorressem isoladamente em água uma não influenciaria a outra. A enzima *piruvato kinase* liga fosfoenolpiruvato e ADP no seu sítio ativo proporcionando condições para que a reação acoplada ocorra.

Reação 2. Isomerização da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato, catalisada pela enzima fosfoglicose isomerase (Figura 16).

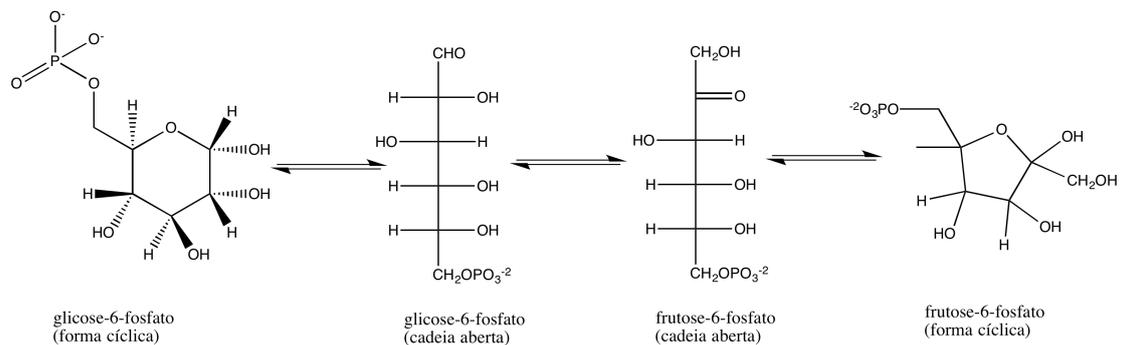


Figura 16. Reação de isomerização de glicose-6-fosfato, uma aldose, em frutose-6-fosfato, uma cetose. Essa reação é catalisada pela enzima *phosphohexose isomerase*. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = +1.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, o que indica que a reação é reversível.

Reação 3. Fosforilação da frutose-6-fosfato por ATP formando frutose 1,6 bifosfato. Essa reação é catalisada pela enzima fosfofrutoquinase 1 (PFK1, do inglês *phosphofructo kinase*).

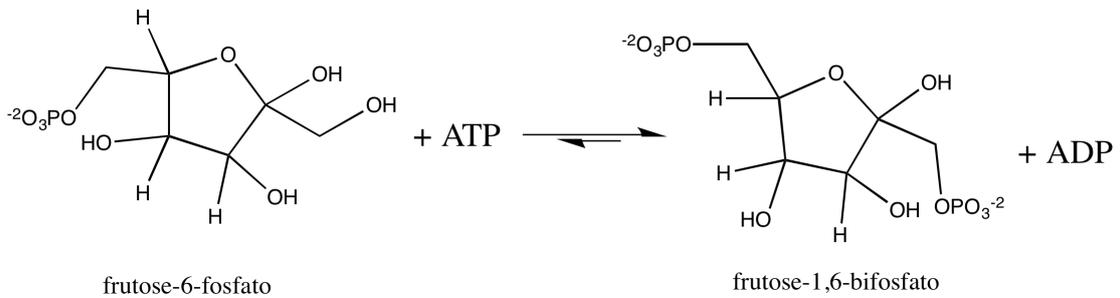


Figura 17. Reação de fosforilação da frutose-6-fosfato catalisada pela enzima fosfofrutoquinase 1 (PFK1) com o consumo de uma molécula de ATP. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = -14.2 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

A variação de energia livre envolvida na reação de fosforilação de frutose-6-fosfato catalisada pela fosfofrutoquinase-1 é altamente negativa, indicando que esta é uma reação *praticamente irreversível*. Reações irreversíveis costumam ser pontos de regulação no metabolismo. A fosfofrutoquinase-1 é uma enzima alostérica e está sujeita à regulação a partir de uma série de fatores alostericos como ATP/ADP e *frutose-2,6-bifosfato*. A **figura 18** mostra a estrutura da PFK1 em complexo com os produtos da reação. A estrutura consiste de duas cadeias polipeptídicas cada qual contendo um sítio ativo e um sítio para ligação do efetor alostérico ADP.

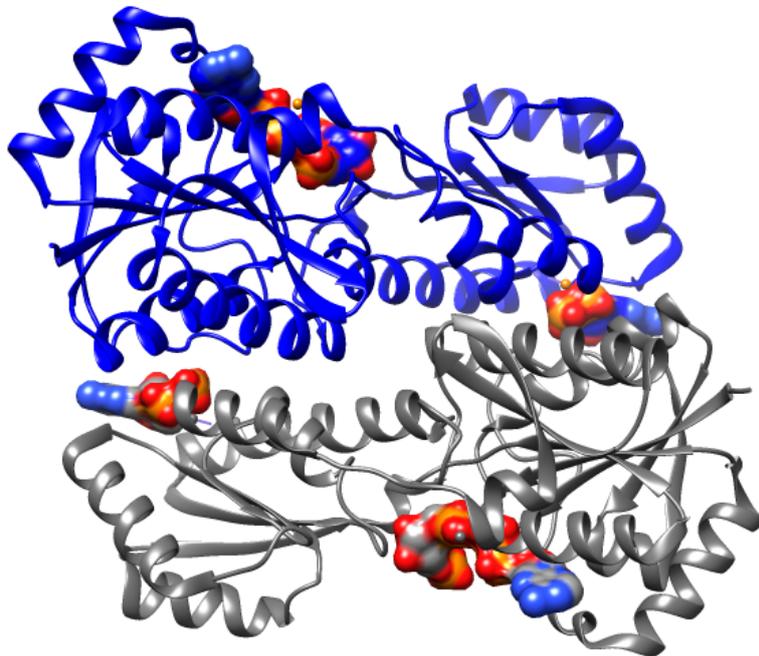


Figura 18. Estrutura tridimensional da PFK1 (PDB PFK1) em complexo com os produtos da reação, frutose 1,6 bifosfato e ADP no sítio ativo, e o ativador alosterico ADP. Esta estrutura mostra duas subunidades da enzima, que é tetramérica.

Reação 4. A quarta reação corresponde à clivagem da frutose 1,6 bifosfato em dois compostos de 3 átomos de carbono: gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxi-acetona fosfato (**Figura 19**):

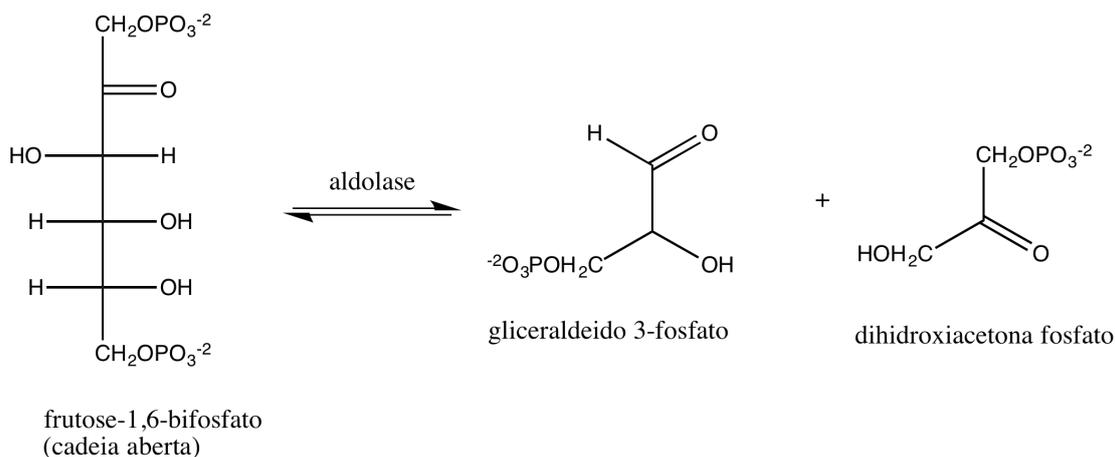


Figura 19. Reação de clivagem da frutose 1,6 bifosfato em dois compostos de 3 átomos de carbono, gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato. Essa reação é catalisada pela enzima aldolase. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = +23.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Apesar de que a variação de energia livre envolvida é positiva, nas condições celulares os produtos da reação são rapidamente consumidos o que faz com que o ΔG da reação seja menor e ela torne-se praticamente *reversível*. Apenas o gliceraldeído-3-fosfato será utilizado para as próximas etapas da glicólise. Com a finalidade de não perder um composto de 3 carbonos, as células produzem uma isomerase (triose-fosfato isomerase – TPI ou TIM), que é capaz de catalisar a reação de isomerização de uma cetose (dihidroxiacetona fosfato) em uma aldose (gliceraldeído-3-fosfato) (**Figura 20**):

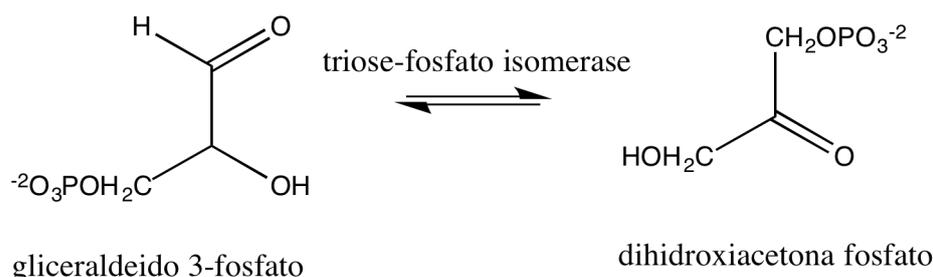


Figura 20. Reação de isomerização entre gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxi-acetona-fosfato. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = +7.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

Apesar de que o ΔG^0 da reação é positivo, nas condições celulares esta reação também é praticamente reversível. Esta etapa conclui a conversão de uma molécula de glicose em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, um composto de 3 átomos de carbono e mais oxidado do que a glicose. Para tanto foi necessário a hidrólise de duas moléculas de ATP formando ADP. As próximas etapas envolvem a oxidação de gliceraldeído-3-fosfato em piruvato, um ácido carboxílico e portanto um composto mais oxidado. A conversão de gliceraldeído-3-fosfato envolverá perda de elétrons (oxidação) e a formação de duas moléculas de ATP (quatro moléculas no computo geral).

Reação 5. A reação de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato formando 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BPG) é catalisada pela *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*. Esta reação depende da presença de uma coenzima, NAD^+ . Historicamente, NAD^+ foi

chamado de co-fermento ou co-enzima. O papel do NAD como carreador de hidrogênio foi sugerido em torno de 1920, mas a natureza química da coenzima somente foi elucidada nos anos 30. NAD (**Figura 21**) é um dinucleotídeo de nicotinamida e adenina. Ele funciona como um carreador de átomos de hidrogênio em uma ampla série de reações de oxido-redução ao aceitar um íon hidreto (H^- ; um próton e 2 elétrons). NAD e NADH são solúveis, e podem mover-se de uma enzima para outra.

Reações de oxido-redução:

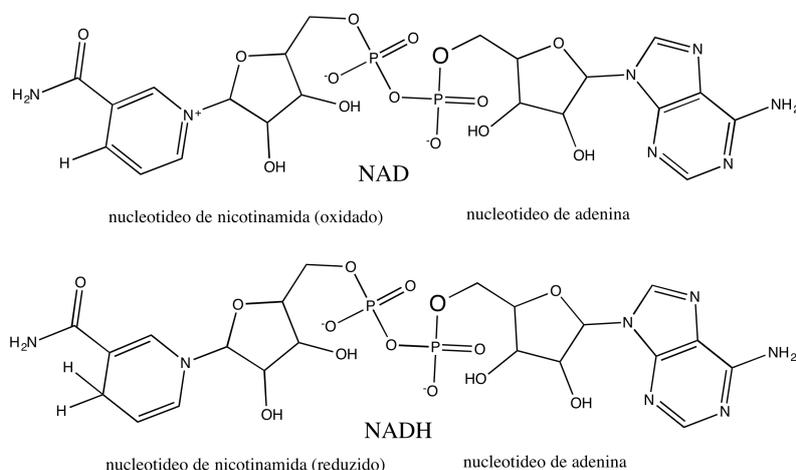


Figura 21. Estrutura da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nas formas oxidada (NAD) e reduzida (NADH).

Um grande número de enzimas utiliza NAD como co-enzima carreadora de elétrons, catalisando reações nas quais NAD aceita um íon H^- do substrato (oxidação) ou doa um íon H^- ao substrato (redução). Estas enzimas são chamadas de **oxidoreduases** ou **desidrogenases**. A *gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase* utiliza a coenzima NAD^+ para receber um íon H^- do gliceraldeído-3-fosfato que é oxidado a 3-fosfoglicerato formando NADH. O domínio responsável por ligar NAD^+ ou NADH é chamado de *Rossmann fold*. A coenzima NAD (e NADP) é fracamente associada à enzima e pode difundir-se de uma enzima para a outra funcionando como um composto carreador de elétrons solúvel. O NADH formado como resultado da ação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase difunde-se até encontrar a álcool desidrogenase que promoverá a redução de acetaldeído à etanol durante a fermentação alcoólica:



A reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pode ser compreendida como a soma de dois processos (**Figura 22**):

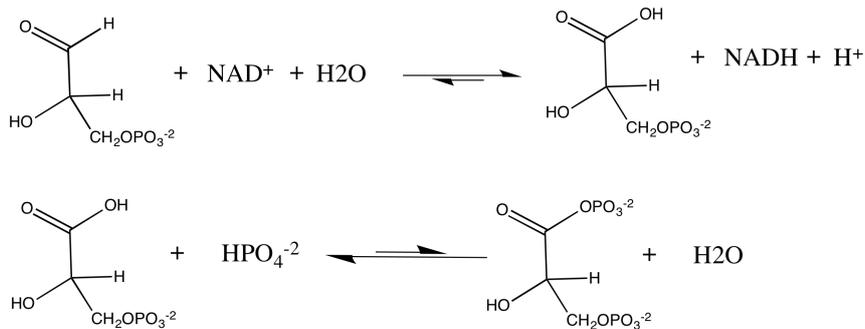
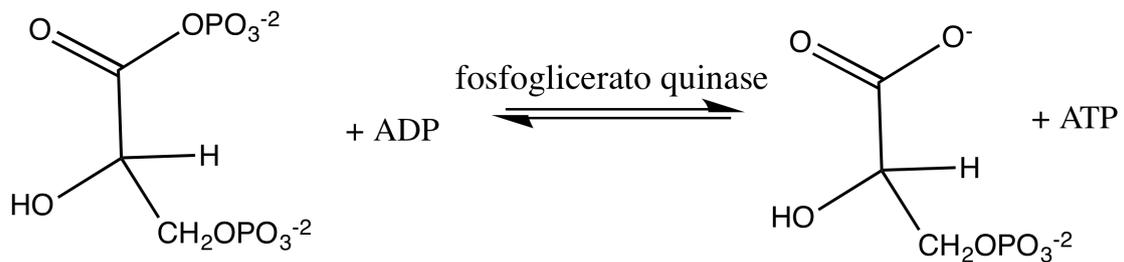


Figura 22. Reação de *oxidação e adição de ortofosfato* catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Reação 6. A próxima reação envolve a transferência de um grupo fosforil do 1,3-bifosfoglicerato (1,3 BPG) para ADP formando ATP e 3-fosfoglicerato. Essa reação é catalisada pela enzima fosfoglicerato quinase (**Figura 23**).



1,3 bifosfoglicerato

3-fosfoglicerato

Figura 23. Reação catalisada pela fosfoglicerato quinase. A variação de energia livre dessa reação nas condições padrão é $\Delta G^0 = -18.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$, no entanto nas condições celulares a reação é reversível com $\Delta G = + 1.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Reações 7 a 9: As próximas reações envolverão a conversão de 3-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, um composto com alto potencial de transferência de um grupo fosforil, e finalmente a piruvato com a concomitante formação de uma molécula de ATP (Figura 24):

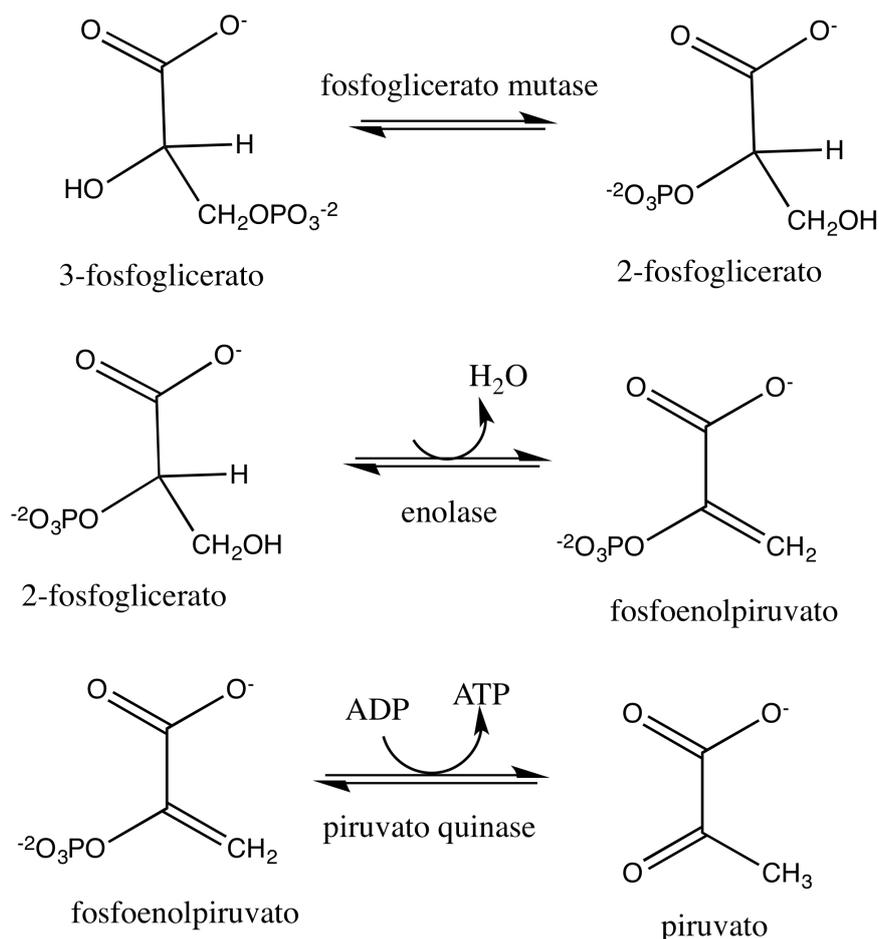


Figura 24. Reações de isomerização de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato ($\Delta G^0 = +4.6 \text{ kJ.mol}^{-1}$); de desidratação de 2-fosfoglicerato formando uma dupla ligação e o composto fosfoenolpiruvato ($\Delta G^0 = +1.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$); e de transferência de um grupo fosforil do fosfoenolpiruvato ao ADP formando ATP e piruvato ($\Delta G^0 = -31.4 \text{ kJ.mol}^{-1}$).

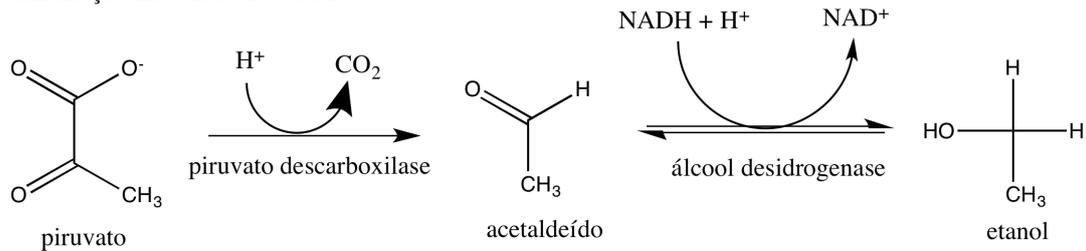
É interessante notar que a reação de transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato ao ADP é extremamente favorável. Uma explicação para essa observação é que a forma enólica do piruvato é altamente instável e converte-se espontaneamente para a forma cetônica, piruvato.

A reação completa da quebra de glicose em duas moléculas de piruvato é:



Esta reação envolve uma variação de energia livre da ordem de $\Delta G^0 = -73.1 \text{ kJ.mol}^{-1}$, e resulta na formação de duas moléculas de ATP e na redução de duas moléculas de NAD^+ . Esse processo poderia seguir indefinidamente não fosse o fato de que a disponibilidade de NAD^+ na célula é finita. Conforme já discutido acima, em condições anaeróbicas, o piruvato é reduzido a lactato (células musculares) ou a etanol (levedura) regenerando NAD^+ . Esse processo é conhecido como fermentação (**Figura 25**):

Fermentação alcoólica - levedura



fermentação láctica (músculo)

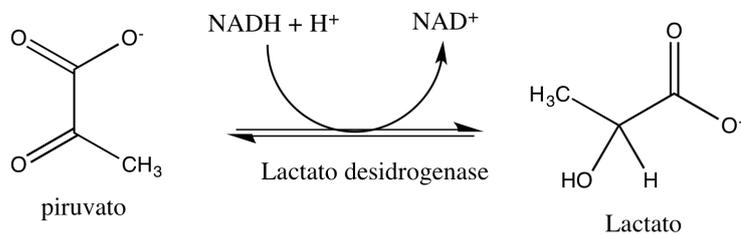


Figura 25. Reações enzimáticas que ocorrem nas células de levedura ou do músculo durante a fermentação e levam à regeneração de NAD^+ .

A eficiência da glicólise expressa em termos de conversão de energia armazenada na forma de glicose para moléculas de ATP é muito baixa. A fermentação alcoólica gera um total de -235 kJ.mol^{-1} de glicose (-196 kJ.mol^{-1} para a fermentação láctica) sendo que aproximadamente 61 kJ.mol^{-1} de energia livre são necessários para a síntese de duas moléculas de ATP. Ou seja, apenas 1/3 da energia liberada pela fermentação é utilizada para a síntese de ATP. O resto é dissipado na forma de calor !

À medida em que as reações da fermentação foram sendo elucidadas, outros bioquímicos voltaram sua atenção ao metabolismo aeróbico em levedura (após 1930). Na presença de oxigênio, as células são capazes de oxidar a glicose completamente a CO_2 e H_2O extraindo muito mais energia e formando um número muito maior de moléculas de ATP a partir de uma única molécula de glicose. Este processo é conhecido por *respiração celular*, e envolve duas vias metabólicas que vamos discutir em detalhes: o **ciclo de Krebs** ou **ciclo do ácido cítrico**, a **cadeia de transporte de elétrons** e a **fosforilação oxidativa**.

Uma das principais diferenças entre a glicólise, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa é que enquanto a primeira via metabólica ocorre no citoplasma da célula, as duas outras ocorrem dentro da mitocôndria. Esta diferença de compartimentos irá auxiliar a regulação das duas vias.

Glicólise exercícios

1. Complete o mapa metabólico mostrado na Figura 14 indicando quais são as enzimas responsáveis por catalisar cada reação, os efetadores alostericos e o número de carbonos de cada metabolito.

2. Responda:

- i) Quais os passos irreversíveis que aparecem no mapa?
- ii) Quantas moléculas de piruvato se formam a partir de uma molécula de glicose?
- iii) Qual hexose da origem a trioses?
- iv) Indicar as reações de oxido-redução que aparecem no mapa.
- v) Sabendo-se que a concentração celular de NAD^+ é da ordem de 10^{-5}M , é possível estimar a quantidade de glicose que pode ser convertida a lactato?
- vi) Verificar no mapa os compostos que apresentam ligações do tipo:
 - a) fosfoenol
 - b) anidrido fosfórico
 - c) éster fosfórico

vii) Identificar no mapa as reações catalisadas pelas seguintes enzimas

- a) quinase
- b) mutase
- c) isomerase
- d) aldolase
- e) desidrogenase

3) Considerando-se o número de moléculas de ATP consumidas e formadas, estabelecer o saldo final de ATP na oxidação de uma molécula de glicose pela via glicolítica

4) Qual a porcentagem de energia que a célula armazena, a partir de um mol de glicose, pela sua degradação através da via glicolítica? Sabe-se que:



5) Citar os compostos que devem ser fornecidos à via glicolítica para:

- a) iniciá-la (haver formação de lactato)
- b) mantê-la em funcionamento

6) Indicar a função da via glicolítica

Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs é uma espécie de ponto de encontro metabólico da célula. Todas as moléculas que podem ser convertidas em um grupo acetil ou em intermediários do ciclo podem ser aproveitadas e oxidadas completamente a CO_2 gerando elétrons (na forma de NADH ou FADH_2) que depois serão transferido ao oxigênio pela fosforilação oxidativa gerando água e promovendo a síntese de ATP (*vide infra*). De forma geral, o ciclo de Krebs oxida o grupo acetil da Acetil-CoA em duas moléculas de CO_2 com a geração concomitante de três NADH s, um FADH_2 e um GTP.

O piruvato gerado pela via glicolítica é transportado para dentro da mitocôndria por um carreador específico. Na matriz mitocondrial, o piruvato será descarboxilado oxidativamente pelo complexo *piruvato desidrogenase* gerando um grupo **acetil**. Este grupo acetil é ativado por esterificação com a **Coenzima-A**, formando o grupo **acetil-CoA**. Este é o ponto de partida para entrada no ciclo de Krebs (**Figura 26**):

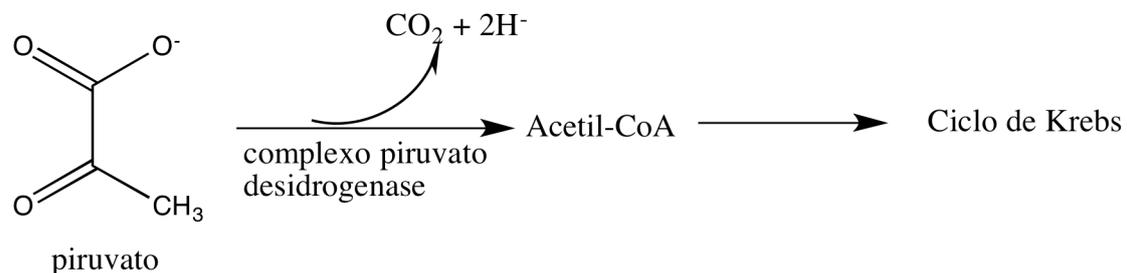
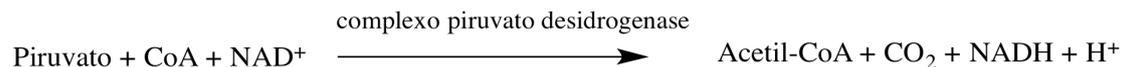


Figura 26. Destino do piruvato que entra na mitocôndria.

A primeira reação do ciclo de Krebs envolve a condensação de um grupo acetil proveniente do piruvato, com oxaloacetato, formando citrato. Para que esta reação possa ocorrer, o grupo acetil precisa ser ativado pela ligação à Coenzima A. A elucidação da estrutura da Coenzima-A e a comprovação de que o grupo acetil precisa ser ativado para reagir com oxaloacetato formando citrato foram fundamentais para a elucidação das reações do ciclo de Krebs. O *complexo piruvato desidrogenase* catalisa a reação de descarboxilação oxidativa do piruvato, transferindo um par de elétrons para o NAD^+ e gerando acetil-CoA (**Figura 27**):



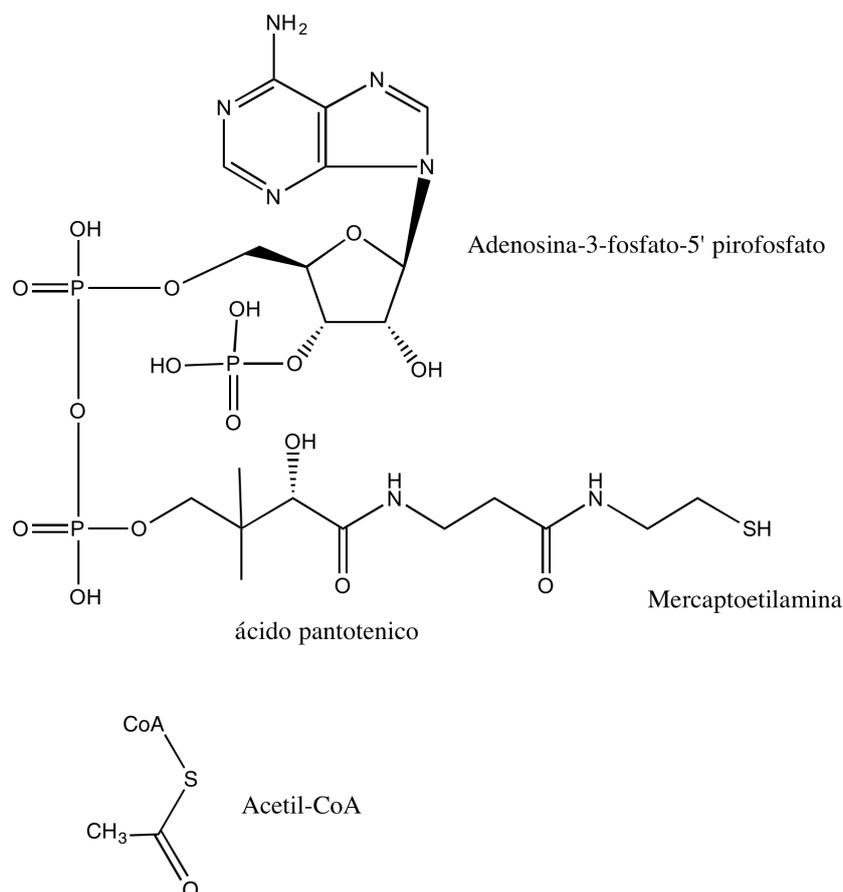


Figura 27. Reação de descarboxilação oxidativa de piruvato formando NADH e um radical acetil ativado através da ligação com a Coenzima A (acima). Estrutura molecular da Coenzima A (abaixo). Esta reação é irreversível como indica a descarboxilação.

O complexo piruvato desidrogenase é formado por três enzimas que promovem a descarboxilação e oxidação do piruvato formando um grupo acetil, e promovem ainda a reação de condensação entre o grupo acetil e o grupo sulfidril da Coenzima-A gerando, através de uma ligação tio-éster, Acetil-CoA (**Figura 28**). Uma das co-enzimas importantes nesse processo chama-se FAD, um grupo prostético associado fortemente a uma das enzimas do complexo piruvato desidrogenase e que aceita um par de elétrons (dois prótons e dois elétrons) assumindo a forma reduzida, FADH₂ (**Figura 29**). As enzimas associadas a um grupo FAD são chamadas de flavoproteínas. Ao contrário do NAD, o FAD associa-se fortemente à enzima e é incapaz de difundir-se livremente em solução.

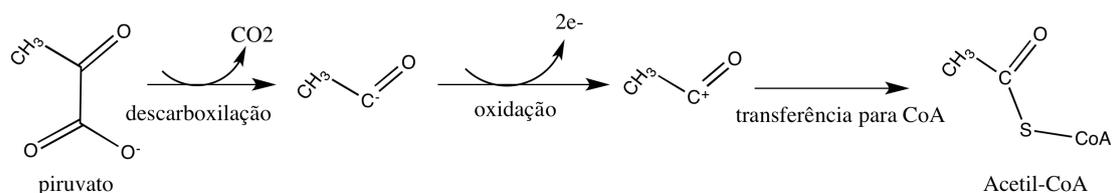


Figura 28. Sequência de reações promovidas pelo complexo piruvato desidrogenase.

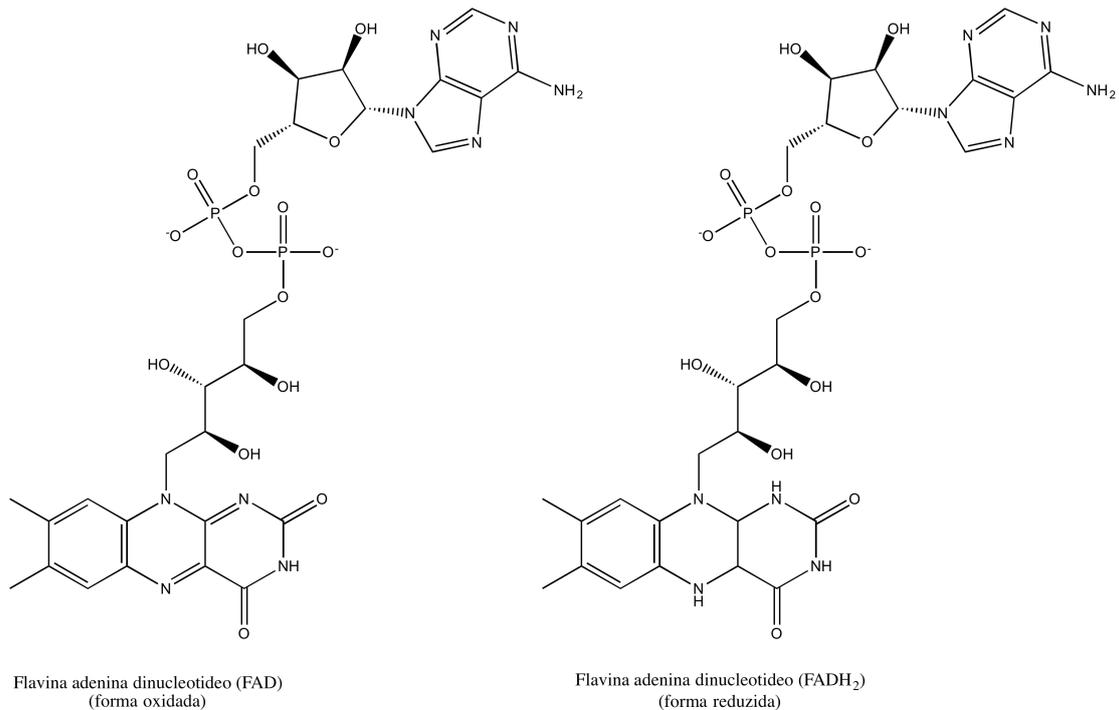


Figura 29. Estrutura do grupo prostético FAD na forma oxidada (esquerda) e na forma reduzida, FADH₂ (direita).

A formação de **Acetil-CoA** é o ponto de partida para a entrada de piruvato no ciclo de Krebs. As reações seguintes envolvem a condensação de Acetil-CoA com **oxaloacetato** formando **citrato**, um composto de 6 átomos de carbono. Essa reação é catalisada pela enzima *citrato sintase* (**Figura 30**). Em seguida, o citrato sofre uma reação de isomerização que altera a posição do radical OH. Essa reação de isomerização que é realizada através de uma desidratação seguida de uma hidratação, é catalisada pela enzima *aconitase* (**Figura 30**). A posição do radical OH no carbono-2 do **isocitrato** permite a próxima reação, que é a descarboxilação oxidativa do isocitrato formando **alfa-cetoglutarato**. Os elétrons do átomo de carbono que é oxidado são transferidos para NAD⁺ formando a coenzima reduzida NADH. Note que nesta reação de descarboxilação, o átomo de carbono que é eliminado na forma de CO₂ não pertence ao grupo Acetil-CoA (**Figura 30**).

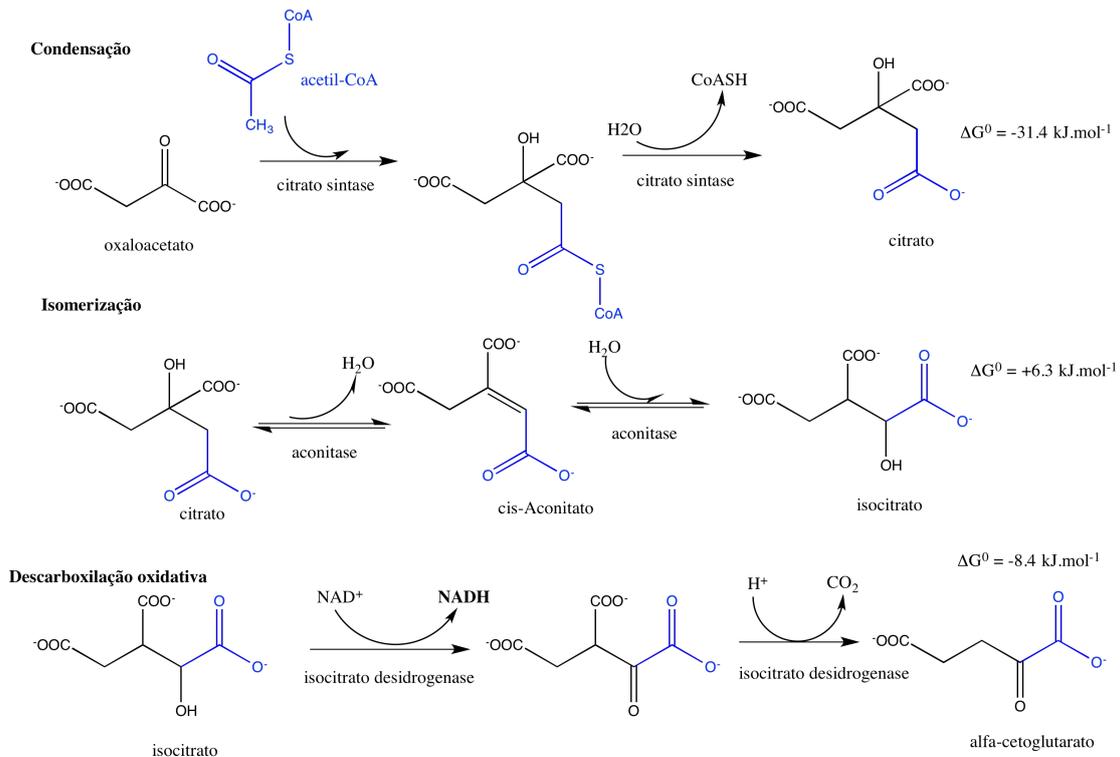


Figura 30. As três primeiras reações do ciclo de Krebs. A entrada de Acetil-CoA no ciclo da-se pela condensação com oxaloacetato (um alfa-ceto ácido) formando citrato. Em seguida o citrato sofre uma isomerização formando isocitrato, que é oxidado e descarboxilado gerando alfa-cetogluturato.

O alfa-cetogluturato sofre uma reação de descarboxilação oxidativa catalisada pelo *complexo alfa-cetogluturato desidrogenase*, gerando succinil-CoA e outra molécula de NADH. Note que succinil-CoA é um composto de 4 átomos de carbono (**Figura 31**). A hidrólise de succinil-CoA a succinato libera uma grande quantidade de energia livre, que é mais do que suficiente para permitir a fosforilação de GDP formando GTP, o único nucleotídeo trifosfato formado pelo ciclo de Krebs (**Figura 31**).

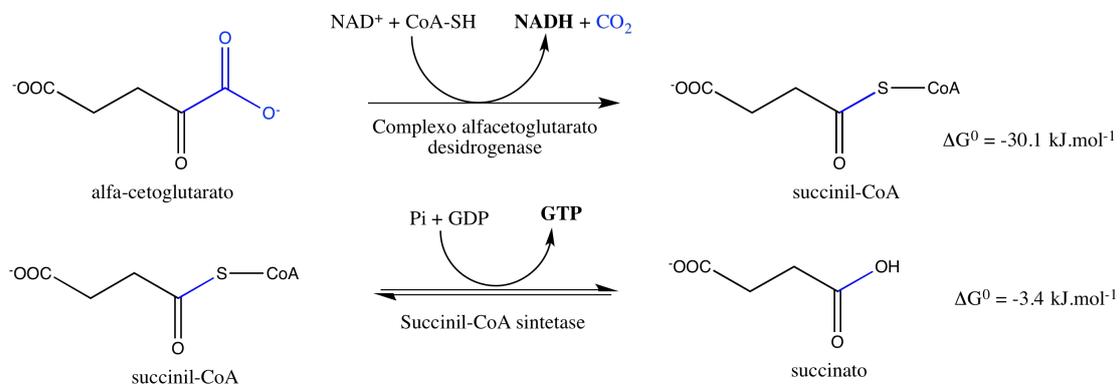


Figura 31. Reações de descaboxilação oxidativa do alfa-cetogluturato formando succinil-CoA, e de hidrólise do succinil-CoA gerando succinato. Esta última reação é acoplada à fosforilação de GDP gerando GTP.

Succinato é um composto de 4 átomos de carbono que deve ser oxidado a **oxaloacetato**. A forma para fazer isso é primeiro oxidar succinato a **fumarato** gerando FADH_2 , seguido de uma reação de hidratação que forma **malato**, este por sua vez pode ser oxidado a **oxaloacetato** completando o ciclo de Krebs e gerando a terceira molécula de NADH (**Figura 32**).

A enzima *succinato desidrogenase* distingue-se das outras enzimas do ciclo de Krebs pois utiliza FAD como grupo aceptor de elétrons, além disso ela está embebida na membrana mitocondrial interna onde ocorrem as reações da cadeia de transporte de elétrons. Dessa forma, a succinato desidrogenase faz o link entre o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa responsável pela formação de ATP .

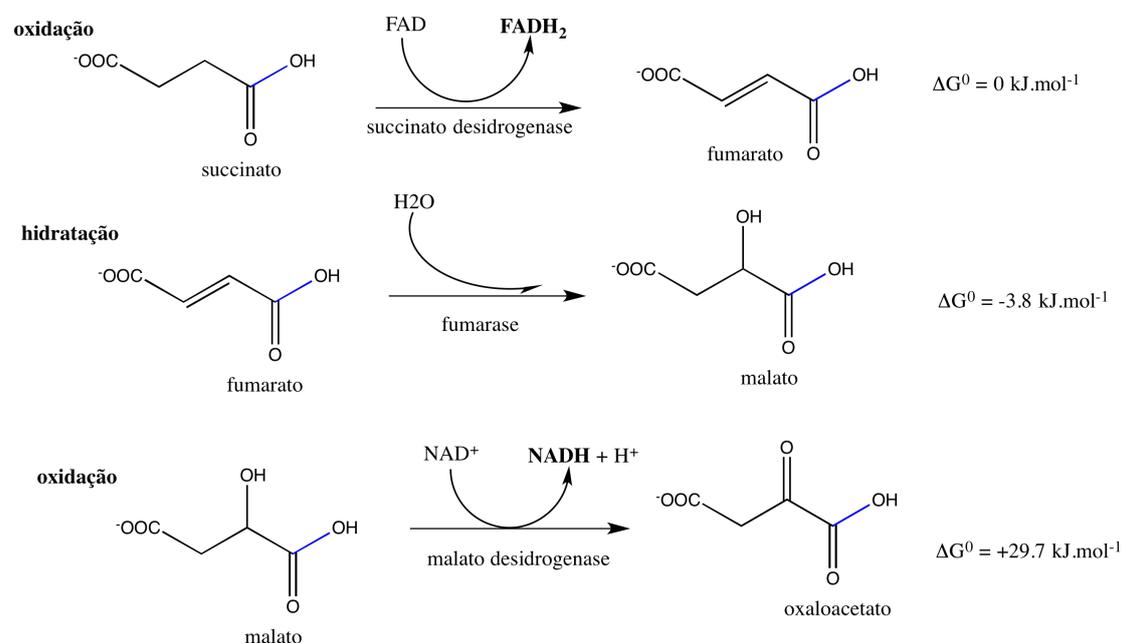


Figura 32. Motivo de três reações necessárias para oxidar succinato a oxaloacetato. Este motivo consiste de uma reação de oxidação catalisada pela enzima *succinato desidrogenase*, seguido de uma reação de hidratação catalisada pela enzima fumarase e outra oxidação que finalmente converte malato em oxaloacetato. Duas coenzimas reduzidas são produzidas neste processo, FADH_2 e NADH .

Olhando estas reações de forma global, vemos que elas perfazem um ciclo em que uma unidade de dois carbonos entra (Acetil-CoA) e sai completamente oxidada na forma de duas moléculas de CO_2 . Note que os átomos de carbono da Acetil-CoA somente irão sair na forma de CO_2 após a quarta volta no ciclo. A cada volta, são formadas coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 (**Figura 33**). Seguramente, o ciclo pode ser alimentado por unidades de Acetil-CoA provenientes da quebra de glicose pela via glicolítica, ou provenientes de outras vias metabólicas como a oxidação de ácidos graxos e a degradação de certos aminoácidos. Subprodutos do metabolismo também podem alimentar o ciclo de Krebs, como succinato ou oxaloacetato provenientes do metabolismo de aminoácidos, assim como o ciclo de Krebs também fornecerá esqueletos de carbono para outras reações biossintéticas.

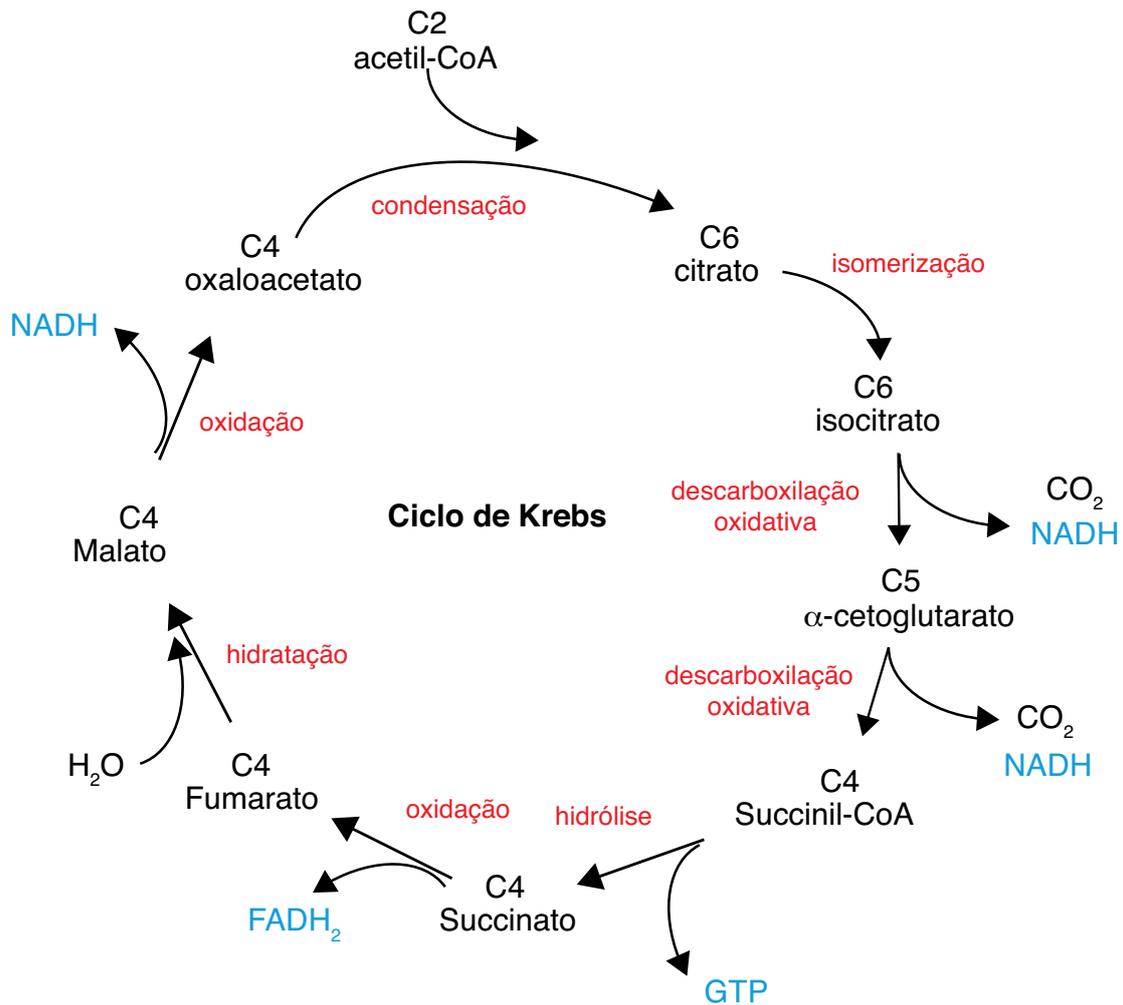
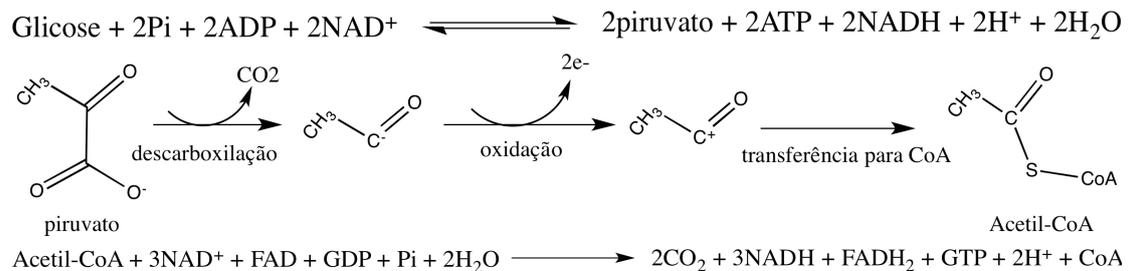


Figura 33. Visão global do ciclo de Krebs. O tipo de cada reação está indicado em vermelho. Os compostos que depois serão úteis para a síntese de ATP estão indicados em azul.

A reação global do ciclo de Krebs é mostrada abaixo. Note que a oxidação completa de uma molécula de glicose a CO₂ pela via glicolítica e pelo ciclo de Krebs leva à formação de duas moléculas de ATP, duas moléculas de GTP, 6 moléculas de NADH e duas moléculas de FADH₂.



Qual é o destino dos elétrons de alta energia contidos em NADH e FADH₂? Esses elétrons serão transferidos para a cadeia de transporte de elétrons e depois finalmente transferidos para uma molécula de oxigênio que será reduzida formando

água. Um gradiente de prótons através da membrana interna da mitocôndria é gerado à medida em que os elétrons são transportados pela cadeia de transporte de elétrons. Esse gradiente será utilizado para promover a síntese de ATP.

Exercícios sobre o ciclo de Krebs

1. Desenhe o ciclo de Krebs, indique as enzimas que catalisam cada reação. Comece a partir de Acetil-CoA
2. Na oxidação de uma molécula de acetil-CoA no ciclo de Krebs, indicar a enzima que catalisa a reação onde há produção ou consumo de:
 - a) CO_2
 - b) GTP
 - c) NADH
 - d) FADH_2
 - e) H_2O
3. Indicar o composto rico em energia do ciclo de Krebs e a reação que o produz
4. Citar as vitaminas que participam do ciclo de Krebs
5. Indicar a localização do ciclo de Krebs
6. Na reação catalisada pela aconitase indicar o composto predominante no equilíbrio
7. Esquematizar a reação catalisada pela piruvato carboxilase e citar o seu efetador alostérico
8. Citar as funções do ciclo de Krebs
9. Mostrar as consequências metabólicas da ativação da piruvato carboxilase por acetil-CoA
10. Descrever a regulação do ciclo de Krebs em função das relações ATP/ADP e NAD^+/NADH
11. Relacionar a velocidade da via glicolítica com a atividade da isocitrato desidrogenase

Fosforilação oxidativa

Glicose é completamente oxidada a CO_2 através das reações da via glicolítica e do ciclo de Krebs. Os elétrons retirados da glicose são utilizados para reduzir O_2 formando H_2O culminando o fim do processo oxidativo. **Fosforilação oxidativa** é o processo pelo qual ATP é formado como resultado de uma série de reações de transferência de elétrons das coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 para O_2 formando H_2O . As moléculas carreadoras de elétrons são proteínas de membrana localizadas na membrana interna da mitocôndria e formam a **cadeia de transporte de elétrons**. O fluxo de elétrons através dos carreadores provoca a saída de prótons da matriz mitocondrial para o espaço inter-membrana. A distribuição desigual de H^+ nos dois lados da membrana interna gera um gradiente de pH e uma diferença de potencial elétrico através da membrana interna. O retorno dos íons H^+ para a membrana interna através de uma proteína transportadora de H^+ (**ATP sintase**) é altamente exergônico ($\Delta G \ll 0$). Essa variação de energia livre será suficiente para tornar termodinamicamente favorável a reação de síntese de várias ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico pelo complexo **ATP-sintase** (**Figura 34**).

A mitocôndria possui duas membranas: membrana interna e membrana externa. O compartimento interno, delimitado pela membrana interna, é chamado de matriz mitocondrial. A matriz contém todas as enzimas do ciclo de Krebs e as enzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos. A membrana interna contém 75% de proteínas em massa. Todas as enzimas envolvidas na cadeia de transporte de elétrons estão localizadas na membrana interna, bem como uma série de proteínas transportadoras para permitir a entrada de metabólitos essenciais na matriz. Entre estes metabólitos encontra-se NADH produzido no citosol durante a glicólise. A membrana interna também contém um transportador de ADP/ATP, de forma que o ATP produzido na matriz possa ser transportado onde ele será utilizado para fornecer energia para outros processos celulares.

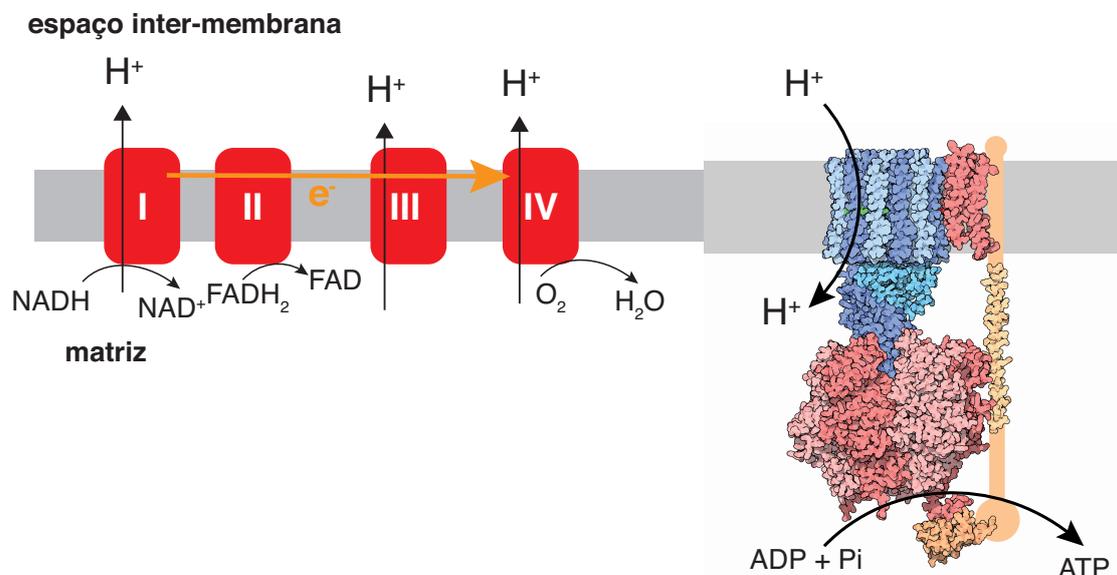


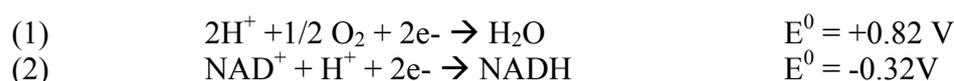
Figura 34. Elétrons provenientes das coenzimas reduzidas NADH e FADH_2 (provenientes do ciclo de Krebs) são transferidos para as proteínas carreadoras da cadeia de transporte de elétrons através de uma série de reações de oxido-redução. Estes elétrons são utilizados para reduzir O_2 formando H_2O . O fluxo de elétrons

através dos carreadores é acoplado ao transporte de prótons através da membrana, gerando uma força próton-motriz que é suficiente para promover a síntese de ATP pela enzima ATP-sintase.

Vamos ver detalhes sobre como funciona a cadeia de transporte de elétrons. A direção do equilíbrio de uma reação química deve ser examinada de acordo com a variação de energia livre envolvida na reação. No caso de reações de oxidoredução, DG depende da diferença de potencial de oxidoredução da seguinte forma:

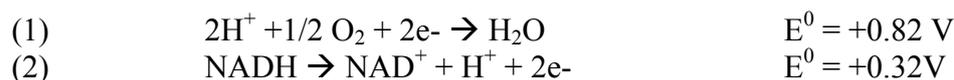
$$\Delta G^0 = -nF\Delta E^0$$

onde DE é proporcional à afinidade por elétrons do substrato oxidado. Por exemplo, considere as duas meias reações de oxidoredução:

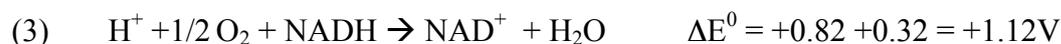


Claramente, como o oxigênio possui maior potencial de redução ele irá oxidar o NADH. Dessa forma, o NADH será doador e o O₂ acceptor de elétrons e a reação global deve ser escrita como:

No caso da transferência de elétrons de NADH e FADH₂ para o O₂, é possível calcular a variação de energia livre através da diferença de potencial de redução envolvida. Por exemplo, os potenciais de redução de oxigênio e NAD⁺ são dados por:



A soma das duas meias reações resulta:



Considerando-se que a variação de energia livre envolvida em uma reação de oxido-redução é dada por:

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E$$

onde *n* é o número de elétrons envolvido, *F* é a constante de Faraday e ΔE é a diferença de potencial de redução, a variação de energia livre envolvida na reação de redução de oxigênio por NADH é:

$$\Delta G^0 = -nF\Delta E = -2(96.48 \text{ kJmol}^{-1}V^{-1})1.12V = -220.1 \text{ kJmol}^{-1}$$

Considerando-se que para sintetizar uma molécula de ATP a partir de ADP e Pi (PO₄⁻³) são necessários 30.5 kJ/mol, se acoplada à síntese de ATP, a oxidação do NADH fornecerá energia suficiente para a síntese de vários mols de ATP. Este acoplamento é realizado pelos componentes da chamada cadeia de transporte de elétrons, centros redox com afinidades crescentes por elétrons, ao invés de transferir os elétrons diretamente para o O₂ (**Figura 34**).

A quantidade de energia livre liberada a partir da transferência de elétrons para o O₂ é inicialmente utilizada para criar um gradiente de H⁺ através da membrana

interna da mitocôndria (**Figura 34**). A fim de calcular qual é a variação de energia livre associada ao transporte de prótons para fora da matriz podemos fazer:

$$\Delta G = RT \ln \frac{[H]_{fora}}{[H]_{matriz}} + nF\Delta E \quad (4)$$

Em condições típicas, o pH no espaço inter-membrana é 1.4 unidades menor do que na matriz mitocondrial, portanto $\log \frac{[H]_{fora}}{[H]_{matriz}} = 1.4$, $\Delta E = 0.14V$ e $Z=+1$ (H^+).

Considerando-se a temperatura como 310K, e substituindo-se os valores na equação acima encontramos que ΔG para mover um H^+ para fora da matriz é 21.8 kJ.mol^{-1} . Portanto a redução de O_2 por uma molécula de NADH produzirá energia suficiente para o transporte de vários íons H^+ para fora da matriz mitocondrial. O retorno de H^+ para dentro da matriz e a síntese de ATP são acoplados pela enzima ATPsintase (**Figura 35**). A oxidação de um NADH resulta em 2.5 ATPs, enquanto que a oxidação de um $FADH_2$ resulta em 1.5 ATP.

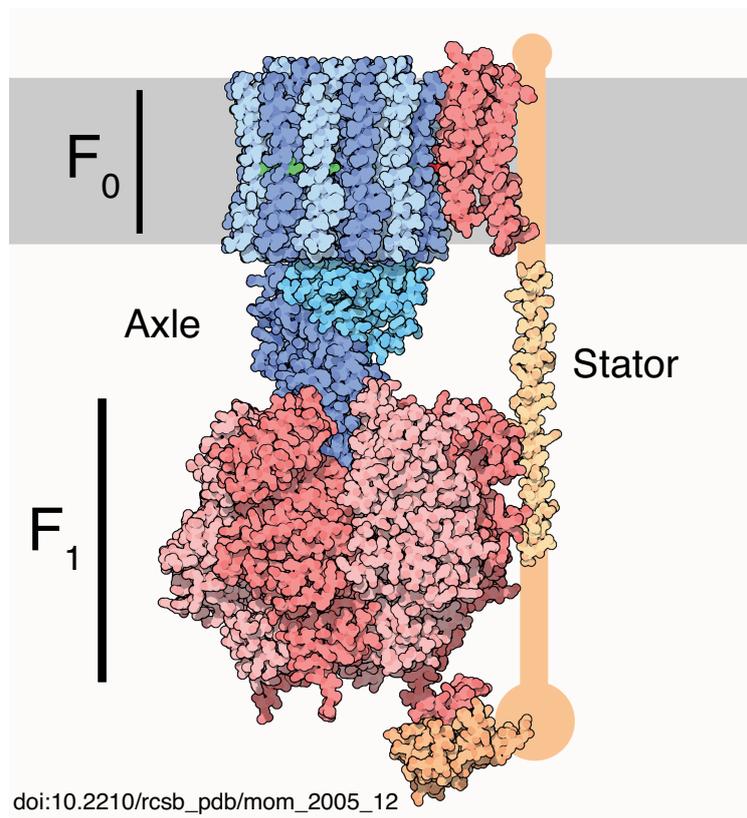


Figura 35. Estrutura da ATP-sintase.

Considerando-se que estes valores estão corretos podemos estimar a quantidade de moléculas de ATP geradas a partir da oxidação completa de uma molécula de glicose a CO_2 e H_2O : $[8NADH/Glicose \text{ (Krebs)} + 2NADH/Glicose \text{ (glicólises)}] \times 2.5 \text{ ATP/NADH} + [2FADH_2/Glicose] \times 1.5 \text{ ATP/FADH}_2 + 2 \text{ ATP/Glicose (Krebs)} + 2 \text{ ATP/Glicose (glicólise)} = 32 \text{ ATP/Glicose}$.

Exercícios sobre fosforilação oxidativa

1. Citar os compostos que fazem parte da cadeia de transporte de elétrons
2. Esquematizar a sequência dos complexos da cadeia, indicando os transportadores de elétrons, os transportadores de prótons e elétrons, bem como o composto doador dos elétrons
3. Citar a localização celular da cadeia de transporte de elétrons
4. Citar 3 inibidores da cadeia de transporte de elétrons, indicando os complexos sobre os quais atuam
5. Os compostos seguintes, localizados na membrana interna da mitocôndria, fazem parte de uma cadeia que transfere elétrons do NADH ($E^{0'} = -0,315 \text{ V}$) para o oxigênio molecular, O_2 ($E^{0'} = +0,815 \text{ V}$):
 Coenzima Q ($E^{0'} = +0,04 \text{ V}$)
 Citocromo a-a3 ($E^{0'} = +0,55 \text{ V}$)
 Citocromo b ($E^{0'} = +0,06 \text{ V}$)
 Citocromo c ($E^{0'} = +0,235 \text{ V}$)
 Citocromo c1 ($E^{0'} = +0,215 \text{ V}$)

Os potenciais de óxido-redução destes compostos dão alguma indicação sobre a sequência que eles se encontram na cadeia de transporte de elétrons?

03. Uma suspensão de mitocôndrias foi incubada em diferentes condições, medindo-se a formação de NAD^+ , o consumo de oxigênio, a produção de ATP, e a diferença de pH entre o interior e o exterior da organela. Os resultados encontrados estão apresentados na tabela abaixo:

Tubo	Condição	NAD^+	Consumo de O_2	Produção de ATP	ΔpH
1	Com NADH	+++	+++	+++	1.4
2	Com NADH e droga A	+++	+++		0
3	Sem NADH				0
4	Com NADH e pH externo mantido constante	+++	+++		0
5	Sem NADH mas mantendo ΔpH			+++	1.4

- a. Verificar se é possível:
- a1. oxidação de NADH sem síntese de ATP.
 - a2. oxidação de NADH sem consumo de oxigênio.
 - a3. consumo de oxigênio sem síntese de ATP.
 - a4. consumo de oxigênio sem formação de gradiente de H^+ .
 - a5. consumo de oxigênio sem oxidação de NADH.