

3. Metabolismo

Abaixo estão notas de aula

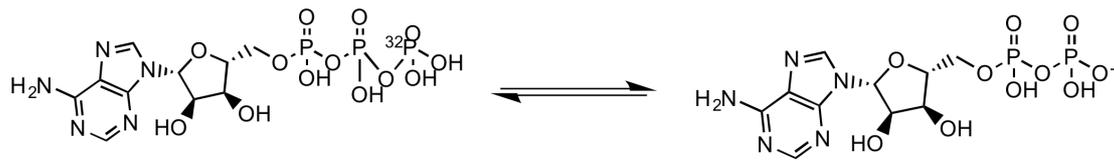
Sugiro visualizar o vídeo disposto neste link:

<http://www.youtube.com/watch?v=O5eMW4b29rg&feature=related>

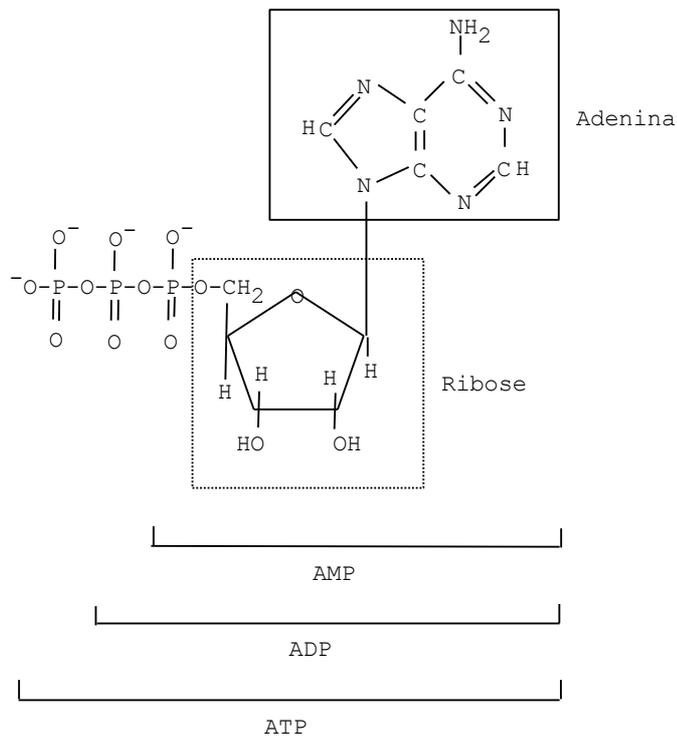
Fermentação alcoólica

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 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.

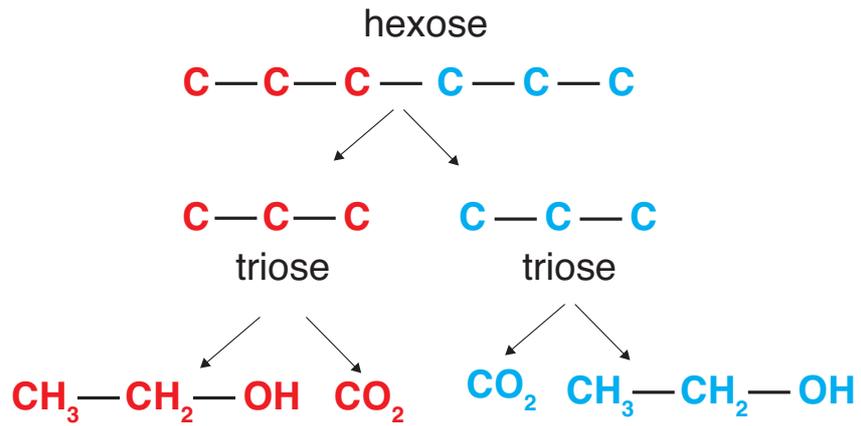


Figura 12. Destino dos átomos de carbono da glicose durante a fermentação em leveduras. Baseado em Barnett (2003) *Yeast* 20: 509-543.

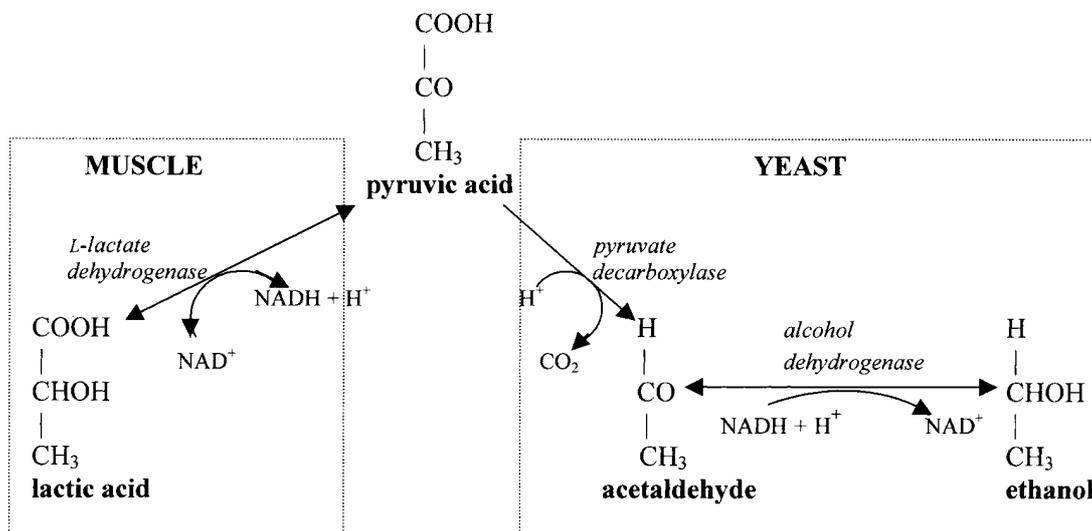


Figura 13. Catabolismo do piruvato a etanol (levedura) ou ácido láctico no músculo em condições anaeróbicas. Retirado de Barnett (2003) *Yeast* 20: 509-543.

GLICÓLISE

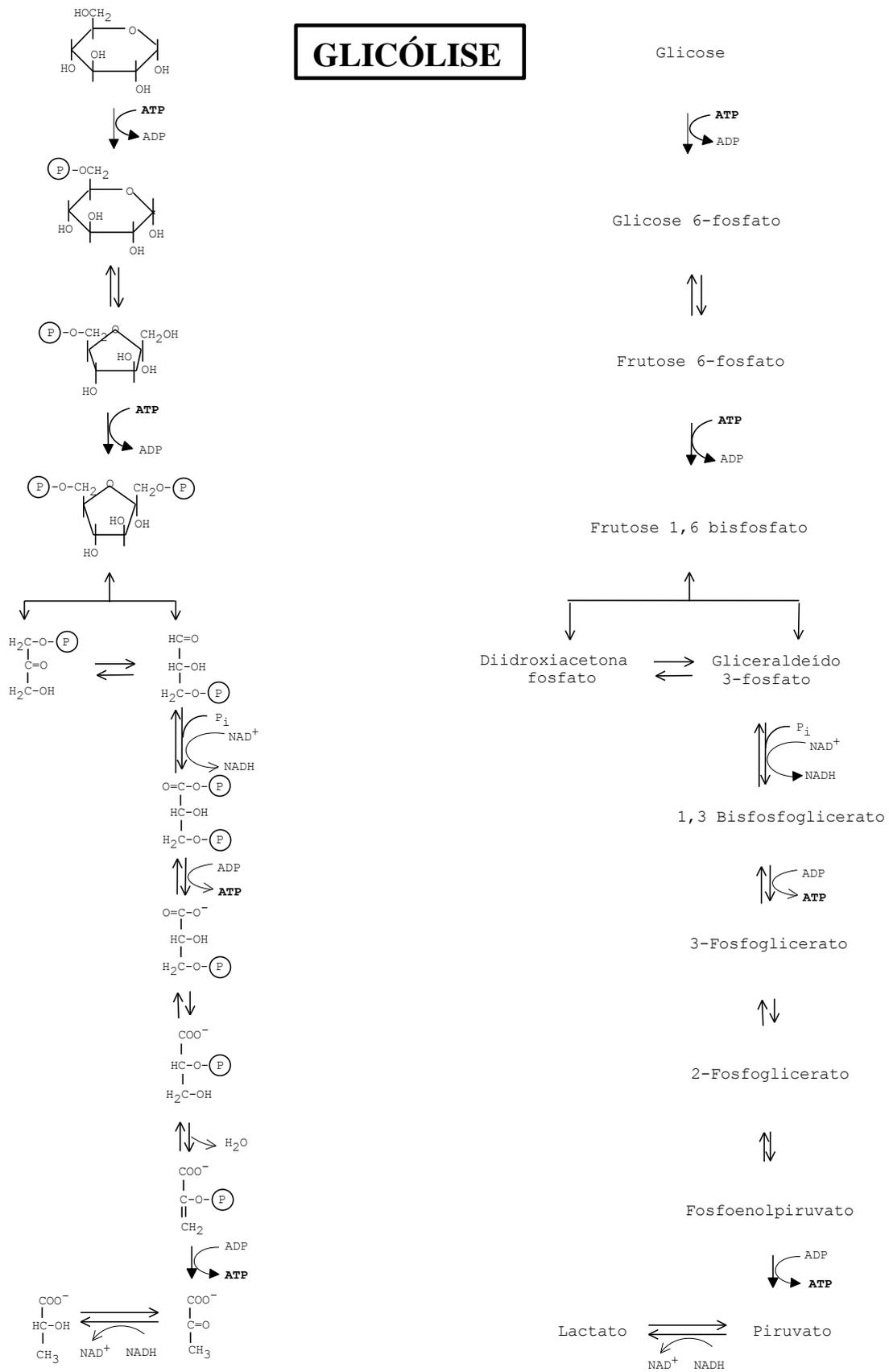


Figura 14. Sequência de reações que compõem a glicólise e a fermentação láctica.

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.

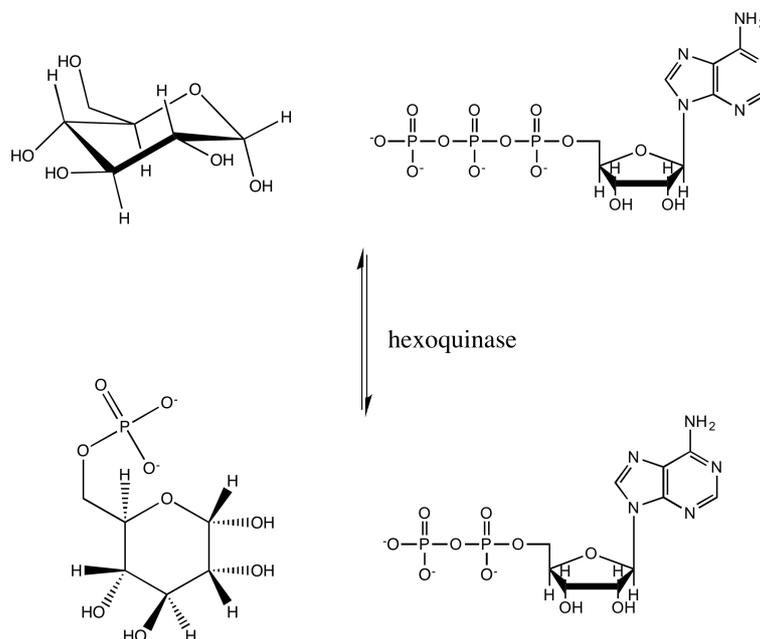


Figura 15. Reação de fosforilação da glicose por ATP formando glicose-6-fosfato e ADP. Essa reação é catalisada pela hexoquinase. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = -16.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

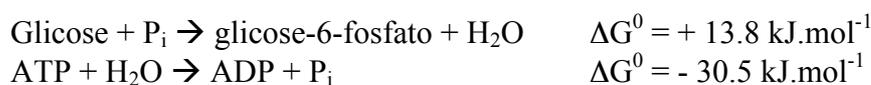
É interessante notar que já no início do século XX era sabido que glicose-6-fosfato (hexose fosfato) não era fermentada ou hidrolisada por leveduras. A explicação para essa observação é que as células não possuem proteínas de membrana transportadores de glicose-6-fosfato (ou frutose 1,6 bifosfato). Portanto,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

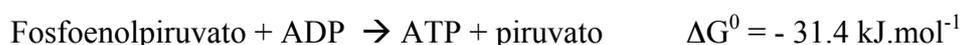
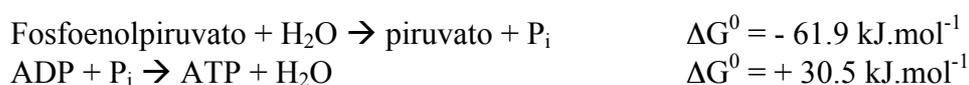
A reação de fosforilação da glicose formando glicose-6-fosfato ilustra um dos aspectos principais do metabolismo: reações endergônicas (que requerem o fornecimento de energia livre para ocorrer) são tornadas espontâneas através do acoplamento com outra reação altamente exergônica (que libera uma grande

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).

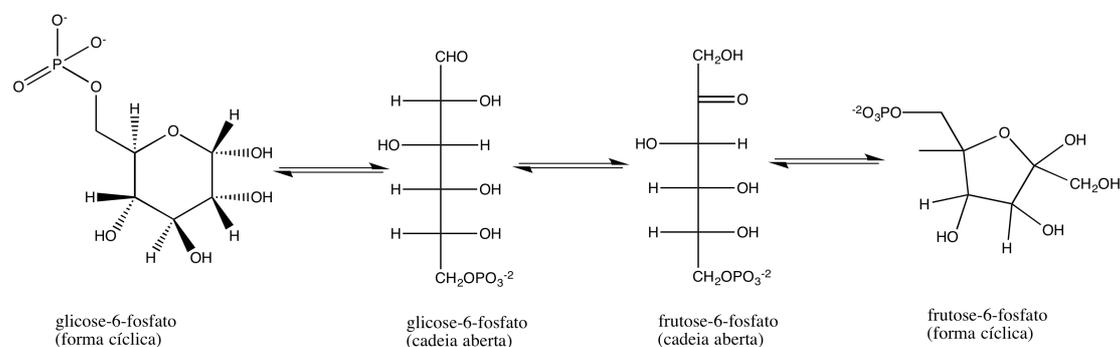


Figura 16. Reação de isomerização de glicose-6-fosfato, uma aldose, em frutose-6-fosfato, uma cetose. Essa reação é catalisada pela enzima *phosphohexose isomerase*. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = +1.7 \text{ kJ.mol}^{-1}$, o que indica que a reação é reversível.

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*).

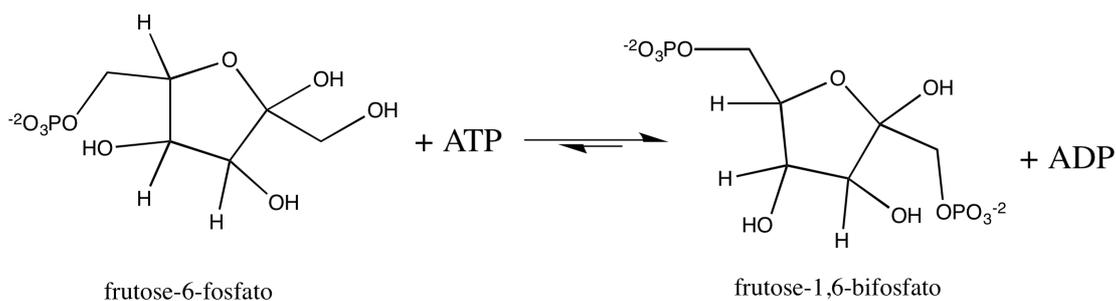


Figura 17. Reação de fosforilação da frutose-6-fosfato catalisada pela enzima fosfofrutoquinase 1 (PFK1) com o consumo de uma molécula de ATP. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = -14.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$.

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.

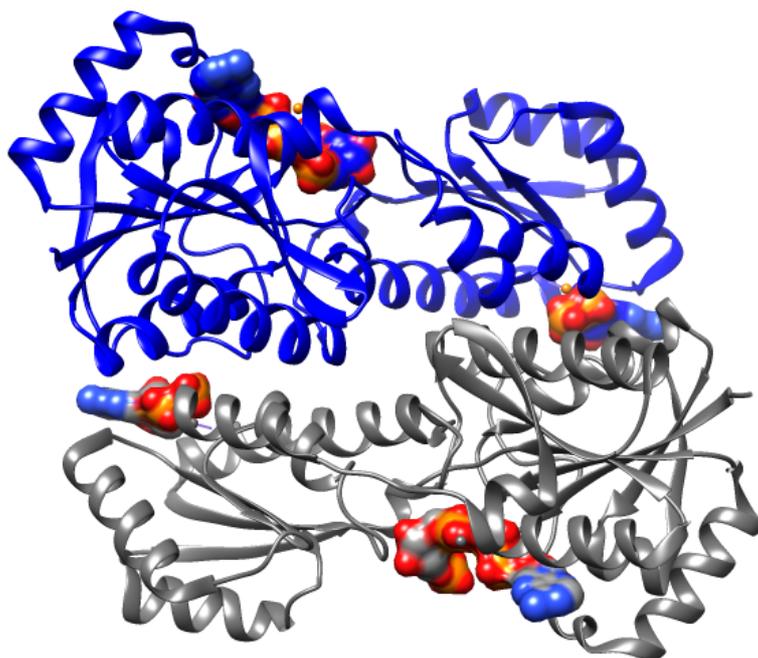


Figura 18. Estrutura tridimensional da PFK1 (PDB PFK1) em complexo com os produtos da reação, frutose 1,6 bifosfato e ADP no sítio ativo, e o ativador alosterico ADP. Esta estrutura mostra duas subunidades da enzima, que é tetramérica.

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**):

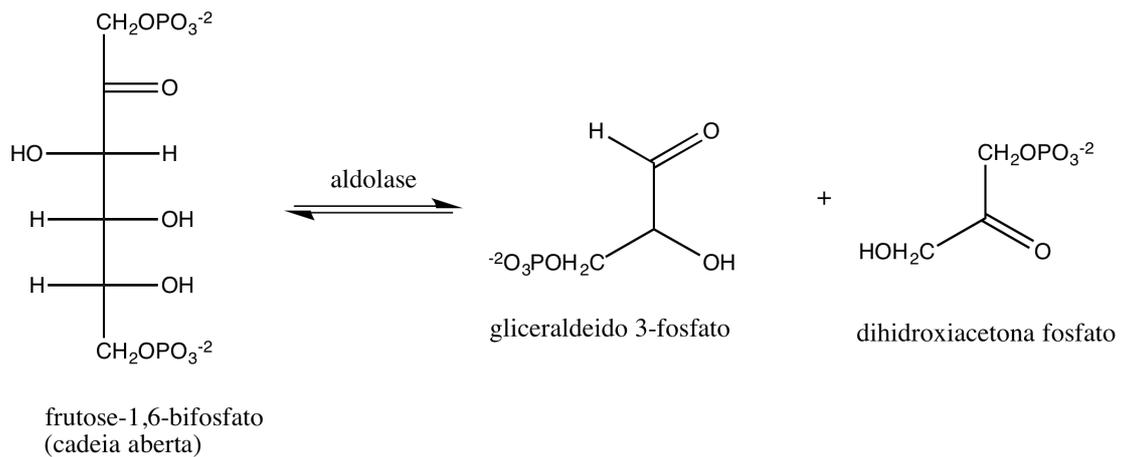


Figura 19. Reação de clivagem da frutose 1,6 bifosfato em dois compostos de 3 átomos de carbono, gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato. Essa reação é catalisada pela enzima aldolase. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = +23.8 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

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**):

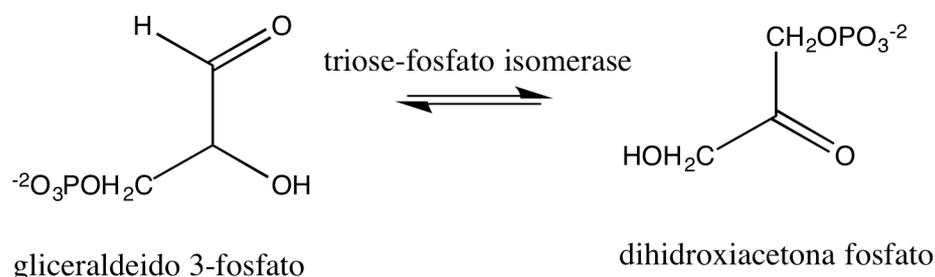


Figura 20. Reação de isomerização entre gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxi-acetona-fosfato. A variação de energia livre envolvida é $\Delta G^0 = +7.5 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

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:

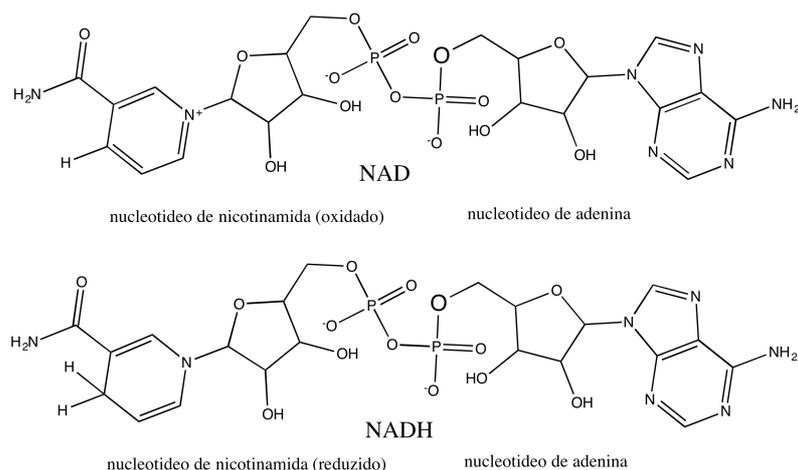


Figura 21. Estrutura da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) nas formas oxidada (NAD) e reduzida (NADH).

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**):

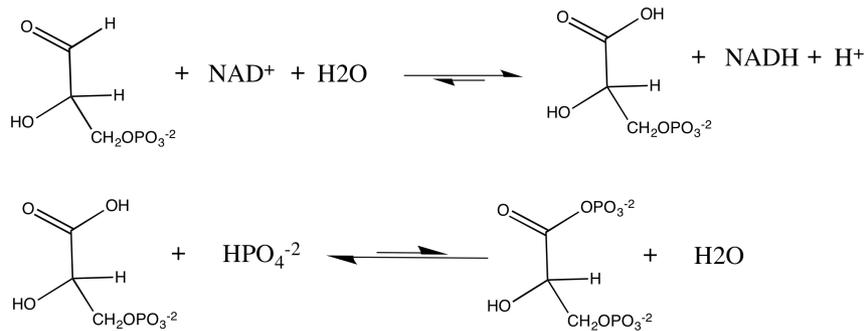
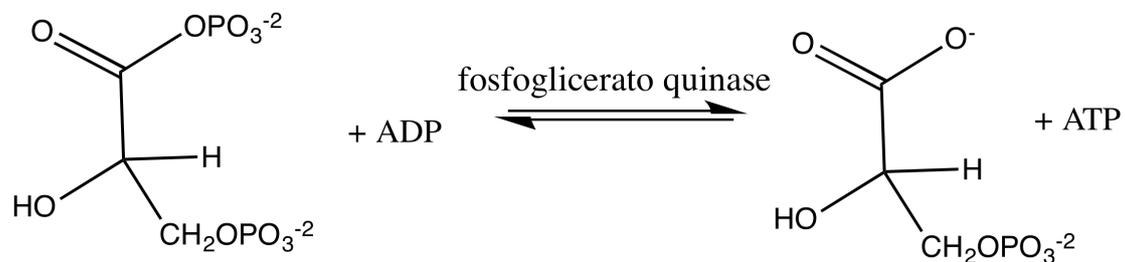


Figura 22. Reação de *oxidação e adição de ortofosfato* catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

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):

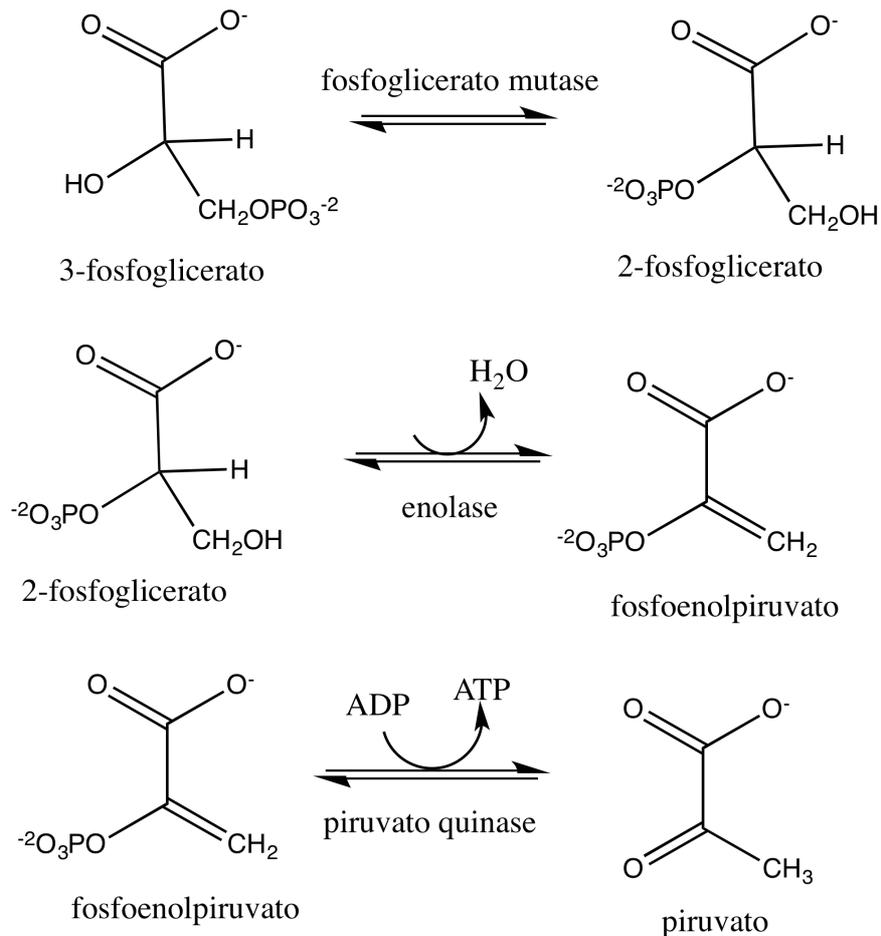


Figura 24. Reações de isomerização de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato ($\Delta G^0 = +4.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); de desidratação de 2-fosfoglicerato formando uma dupla ligação e o composto fosfoenolpiruvato ($\Delta G^0 = +1.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$); e de transferência de um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

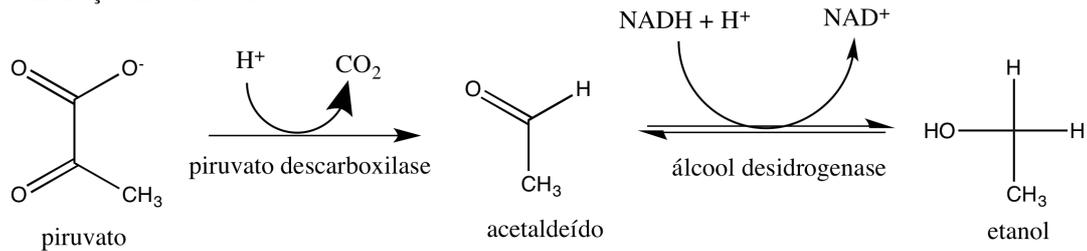
É interessante notar que a reação de transferência do grupo fosforil do fosfoenolpiruvato ao ADP é extremamente favorável. Uma explicação para essa observação é que a forma enólica do piruvato é altamente instável e converte-se espontaneamente para a forma cetônica, piruvato.

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



Esta reação envolve uma variação de energia livre da ordem de $\Delta G^0 = -73.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 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)

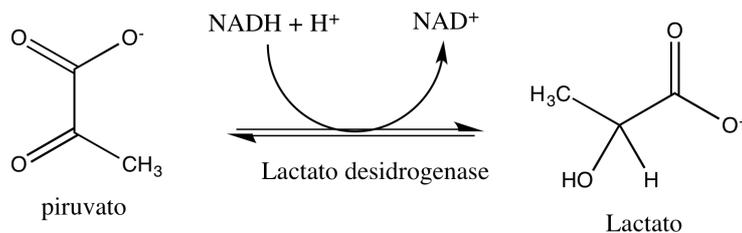


Figura 25. Reações enzimáticas que ocorrem nas células de levedura ou do músculo durante a fermentação e levam à regeneração de NAD^+ .

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 $-235 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ de glicose ($-196 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para a fermentação láctica) sendo que aproximadamente $61 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 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 extraíndo 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