

METABOLISMO BACTERIANO

Metabolismo é o conjunto de reações bioquímicas interconectadas de um ser vivo. A definição é correta, mas incompleta, pois também deveria considerar a função das reações celulares. Podem ser apontadas funções específicas (biossíntese de aminoácidos, degradação de carboidratos, etc.) e funções mais gerais, como a obtenção, armazenamento e utilização de energia. Uma definição abrangente, que engloba processos e funções é: *o metabolismo é a estratégia de sobrevivência de uma espécie*. Conceituar assim o metabolismo inclui a ideia de preservação do indivíduo e a garantia de geração de descendentes. Para tanto, é exigida do ser vivo a capacidade de interagir com o ambiente de forma a obter os elementos necessários para sua manutenção e sua replicação. A reprodução é a situação mais drástica e de maior complexidade em comparação à simples manutenção.

Os seres vivos são peculiares em sua capacidade de reproduzir-se. Ao fazê-lo, parecem contrariar as leis da termodinâmica que estabelecem como tendência de qualquer sistema o aumento do seu grau de desordem - os seres vivos mantêm sua organização ao longo das sucessivas gerações. Para obter esta estabilidade recorrem a transformações internas que aparentam ocorrer no sentido oposto à tendência termodinâmica. É o caso das sínteses em geral e das concentrações intracelulares de íons e de moléculas, maiores do que as encontradas no meio ambiente. Os seres vivos retiram do ambiente a matéria prima, para manter ou mesmo aumentar seu grau de organização, e liberam diferentes substâncias, provocando um aumento da desorganização do meio. Além dos componentes estruturais da nova célula, uma fonte energética é fundamental para manter o processo no sentido contrário àquele considerado termodinamicamente favorável. A conciliação entre a organização dos seres vivos e os princípios da termodinâmica é obtida quando se consideram os indivíduos juntamente com o ambiente. Contabilizando os seres vivos mais o meio ambiente fica claro o aumento da desorganização e, portanto, a subordinação às leis termodinâmicas.

As células necessitam de ATP, 13 compostos precursores e NADPH

Embora alguns processos possam ser realizados utilizando o potencial energético contido em gradientes de prótons ou de outros íons, a maior parte das necessidades

energéticas celulares é suprida pela energia química contida na molécula de adenosina trifosfato, o ATP. Portanto, estudar os mecanismos de obtenção de energia pelos microrganismos significa analisar os processos pelos quais estas células sintetizam ATP. Para esta síntese, duas são as fontes energéticas primárias: a *luz* ou a *oxidação de compostos químicos*. Como grande parte dos compostos químicos a serem oxidados foi produzida à custa da energia solar, vê-se que a maior parte da energia primária usada pelos seres vivos é a luz do sol.

Além de energia, a duplicação de uma célula requer matéria para a duplicação dos seus componentes. *Grosso modo*, as células de todos os seres vivos são quimicamente semelhantes: são constituídas de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídios, etc. Assim, ainda que as estratégias adotadas para a formação de uma nova célula possam ser diferentes conforme o organismo, o desafio a ser superado é semelhante para todos.

O grande número de compostos intermediários presentes nos processos que permitem a manutenção e duplicação de uma célula deixa claro que o metabolismo é uma rede muito complexa de reações químicas. Sua compreensão, entretanto, é facilitada pela análise do metabolismo de bactérias que, como *Escherichia coli*, são capazes de sintetizar todos os componentes necessários à sua replicação a partir apenas de glicose e sais minerais. A partir da glicose, estas células obtêm 13 compostos orgânicos intermediários que servem de precursores para a síntese de todos os outros constituintes celulares, ainda que por vias diferentes, segundo o organismo analisado. Muitas espécies bacterianas, principalmente patogênicas estritas, não apresentam tão completa capacidade metabólica e necessitam obter do meio ambiente diferentes compostos para completar o conjunto de moléculas fundamentais para seu desenvolvimento.

Grande parte dos processos biossintéticos requer, além da utilização de ATP, a redução de compostos intermediários, obtida graças ao emprego de coenzimas reduzidas. A coenzima mais utilizada para estas reduções é a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que, em algumas reações, pode ser substituída pelo seu congênere não fosforilado, a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Por sua função, o NADPH é muitas vezes referido como *poder redutor*.

Há uma diferença importante no papel que exercem as coenzimas (ATP e NADPH) e os 13 precursores nas reações do metabolismo. A soma das concentrações das duas formas possíveis das coenzimas ATP (ATP/ADP) e NADPH (NADPH/NADP⁺) é constante na célula. No caso do ATP, a alternância de formas é mantida por uma fonte de energia exógena que permite a fosforilação de ADP por fosfato, formando ATP; sua

utilização nas reações celulares produz ADP e fosfato. A redução de NADP^+ é provida pela oxidação de compostos químicos também exógenos, formando NADPH que é oxidado nas reações redutoras de biossíntese. A alternância das duas formas reflete o papel destas coenzimas: fornecer energia ou equivalentes redutores para as reações do metabolismo. Os processos cíclicos envolvendo ATP/ADP e NADPH/NADP⁺ representam, portanto, fluxos contínuos de energia e poder redutor, necessários para manter o metabolismo e construir novas células. Quanto aos processos envolvendo os 13 compostos fundamentais, nenhum *turnover* existe e, uma vez que estes compostos são convertidos nas moléculas celulares, há constante necessidade de aporte de carbono e demais macro e micronutrientes a partir do meio ambiente. Nas condições em que o meio disponibiliza algumas das 13 moléculas (ou seus derivados), sua síntese deixa de ser necessária, trazendo economia e eficiência para a duplicação celular. A Figura 3.1 traz as fórmulas das coenzimas ATP e NAD(P)H e a Figura 3.2 a lista dos precursores necessários à biossíntese dos constituintes celulares.

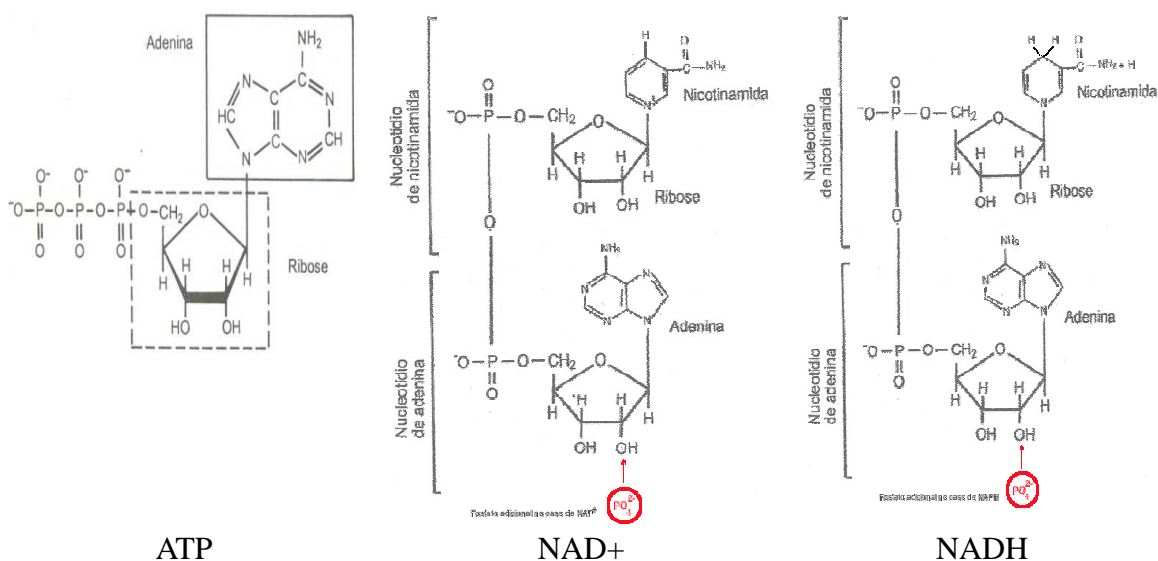


Figura 3.1. Coenzimas ATP e NAD⁺/NADH. O NADP⁺ difere do NAD⁺ por um grupo fosfato ligado à ribose.

Em resumo, a construção de nova célula guarda certa universalidade entre os seres vivos. O metabolismo é constituído por uma série de reações cujo grande desafio é a obtenção de ATP, NADPH e 13 moléculas precursoras, que serão utilizados no processo de biossíntese de todos os constituintes celulares, bem como na manutenção da célula (Figura 3.2). Células que não apresentam esta capacidade completa devem obter do meio

os precursores ou moléculas produzidas a partir destes (blocos de construção – Figura 3.2).

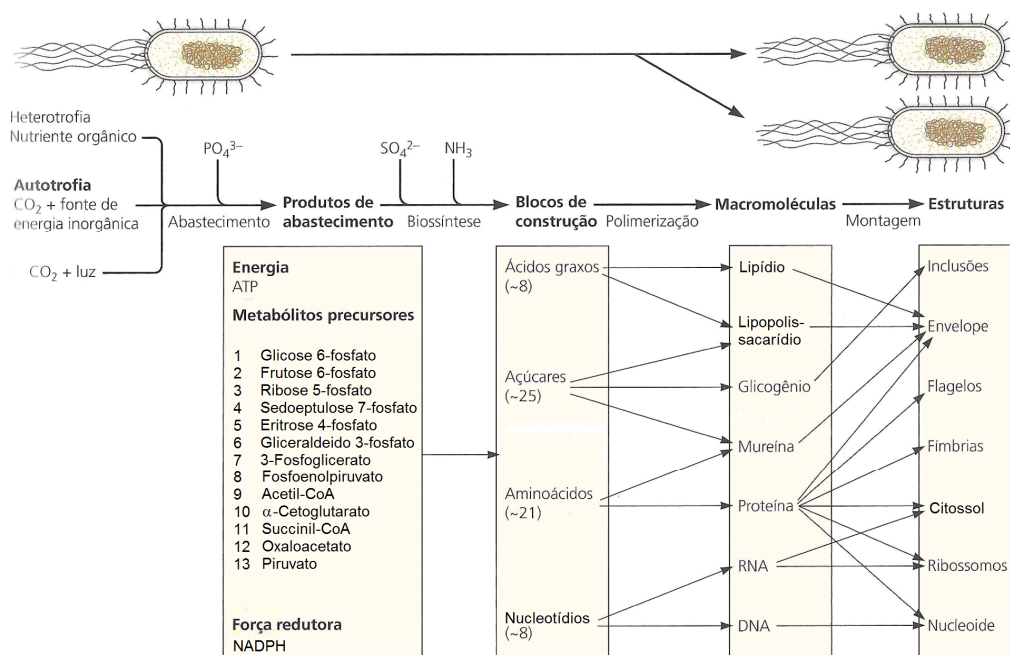


Figura 3.2. Formação de novas células a partir dos nutrientes com a formação dos 13 precursores, NADPH e ATP. (Schaechter et al., 2010).

ATP, os 13 precursores e NADPH podem ser conseguidos por vias diferentes

Do ponto de vista metabólico, as bactérias são os organismos mais versáteis conhecidos. Sua grande diversidade reside na variedade de estratégias adotadas para a obtenção de ATP, NADPH e dos 13 precursores para biossínteses, muito mais ampla do que a encontrada entre os eucariotos, permitindo que esses organismos colonizem os mais diversos ambientes. A Figura 3.3 esquematiza diferentes estratégias de sobrevivência (metabolismo) encontradas em bactérias. Os esquemas apontam os compostos obtidos do meio ambiente e os produtos do metabolismo excretados por bactérias de diferentes tipos metabólicos. A análise dos esquemas permite inferências sobre o habitat dos microrganismos e suas necessidades nutricionais. Algumas das conclusões principais desta análise estão assinaladas a seguir.

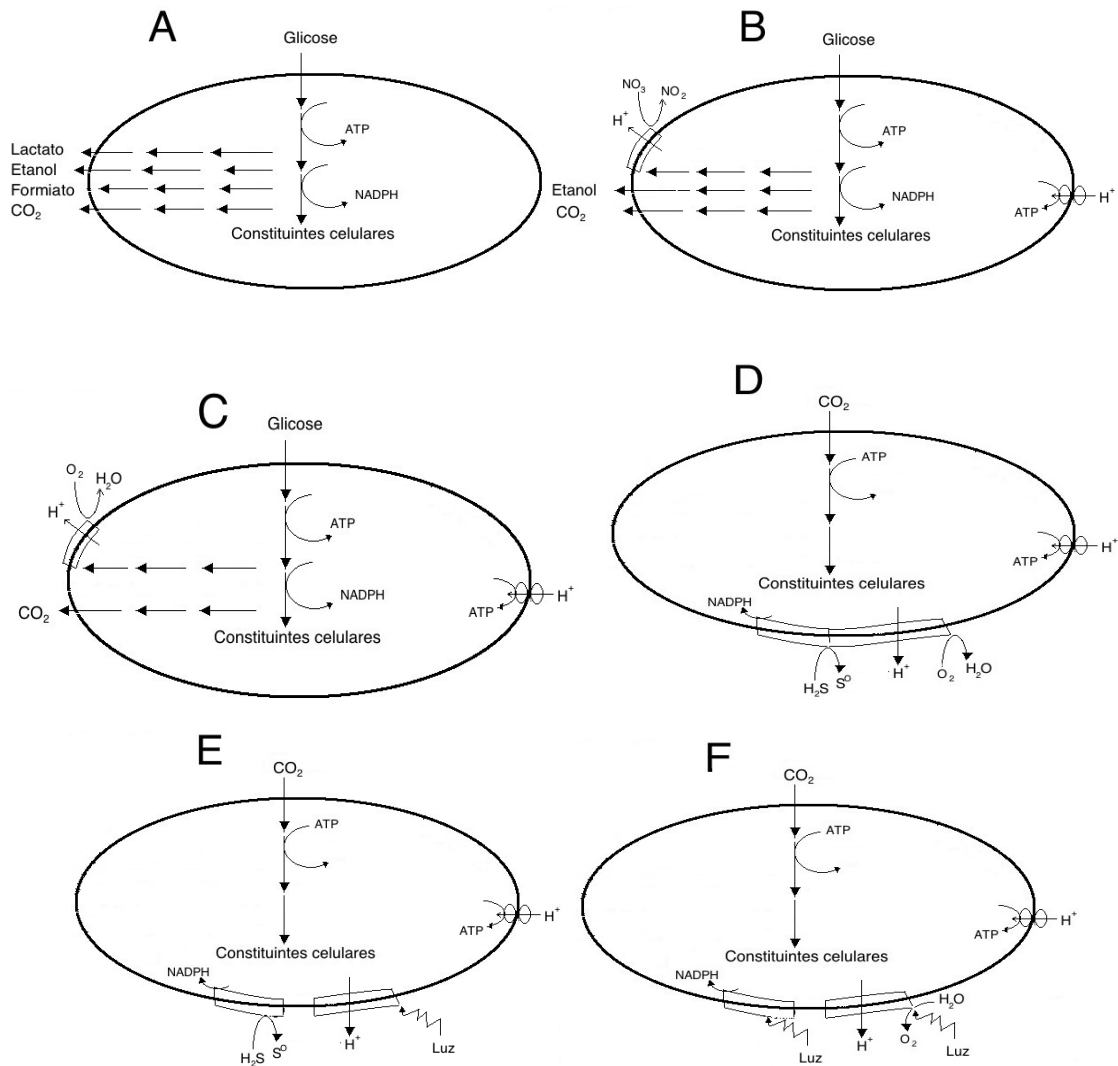


Figura 3.3. Esquemas de diferentes estratégias de sobrevivência em bactérias. A, B e C – metabolismos heterotróficos; D, E e F – metabolismos autotróficos. A, B, C e D – metabolismos quimiotróficos; E e F – metabolismos fototróficos.

1. O ATP pode ser obtido:
 - 1a – por oxidação de compostos orgânicos (esquemas A, B e C) – processo usado por bactérias *quimiorganotróficas*.
 - 1b – por oxidação de compostos inorgânicos (esquema D) - processo usado por bactérias *quimiolitotróficas*.
 - 1c – a partir de energia luminosa sem produção de oxigênio (esquema E) - processo usado por bactérias *fototróficas*.
 - 1d – a partir de energia luminosa com produção de oxigênio (esquema F) - processo também usado por bactérias *fototróficas*.

2. Os esqueletos carbônicos dos 13 precursores podem provir de compostos orgânicos (esquemas A, B e C), caracterizando as bactérias como *heterotróficas*, ou do CO₂ (esquemas D, E e F), definindo-as como *autotróficas*.

3. Um dos processos leva à produção de O₂ (esquema F); outros requerem O₂ (esquemas C e D) e outros ainda ocorrem em anaerobiose (esquemas A, B e E).

4. A redução do NADP⁺ pode ocorrer em vias de oxidação da glicose (A, B e C) ou por vias de transporte de elétrons (D, E e F).

A seguir serão apresentadas as vias metabólicas que permitem a obtenção dos 13 intermediários para a biossíntese de moléculas, de ATP e de NADPH. Serão apresentados os dois grandes tipos de metabolismo, caracterizados pela fonte de carbono utilizada, o *heterotrófico* e o *autotrófico*. Posteriormente, serão abordadas as diferentes estratégias de sobrevivência, ou seja, o conjunto de vias metabólicas que permitem a sobrevivência dos diferentes microrganismos nos ambientes aos quais estão adaptados. Essa análise será baseada em dois grandes momentos da vida na Terra: a vida em anaerobiose e a vida em aerobiose.

A - METABOLISMO HETEROTRÓFICO

3.1 Obtenção dos 13 precursores

Substâncias orgânicas diversas (carboidratos, proteínas, ácidos graxos, etc.) podem suprir as necessidades das células bacterianas, mas certamente a glicose, na sua forma polimerizada como amido ou celulose, é o composto disponível em maior quantidade na natureza. Por esta razão, este açúcar é apresentado como a fonte universal de carbono e conceitua-se o *metabolismo central* como o conjunto de reações que levam à oxidação de glicose a CO₂. A análise de vias metabólicas heterotróficas para obtenção dos 13 precursores, feita a seguir, considerará sempre a glicose como exemplo de matéria orgânica, sem que isto signifique ser esta a única alternativa metabólica para as células. A oxidação da glicose para obtenção dos 13 precursores também leva à produção de ATP e redução de NADP⁺ (Seções 3.2. e 3.3).

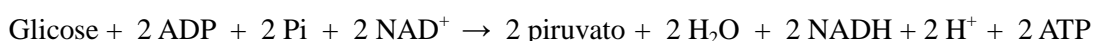
3.1.1 Via de Embden-Meyerhof-Parnas - Glicólise.

A sequência de reações designada *via de Embden-Meyerhof-Parnas*, *glicólise* ou *via glicolítica* é a via mais comum de degradação de glicose (Figura 3.4.). Outros monossacarídeos, como frutose, também são oxidados por esta via.

A via glicolítica inicia-se com a fosforilação da glicose por ATP, produzindo glicose 6-fosfato (reação 1). Esta reação é um recurso para o "aprisionamento" do açúcar nas células, cujas membranas são impermeáveis à hexose fosforilada. Em muitas bactérias, a fosforilação da glicose ocorre em associação ao seu transporte pela membrana celular, por um processo denominado *translocação de grupo*. A estratégia seguida pela via glicolítica na oxidação da glicose 6-fosfato pode ser resumida nas seguintes etapas:

- a. nova fosforilação da hexose, com produção de uma molécula bifosforilada, aproximadamente simétrica (reação 3);
- b. quebra da molécula da hexose bifosforilada (reação 4), produzindo duas trioses monofosforiladas interconvertíveis (reação 5); praticamente, portanto, há produção de duas trioses idênticas;
- c. oxidação da triose fosforilada, por transferência de elétrons ao NAD^+ (reação 6); nesta reação há incorporação de um grupo fosfato inorgânico;
- d. transferência, em reações subsequentes, dos dois grupos fosfato presentes no 1,3 bisfosfoglicerato para o ADP, produzindo ATP (reações 7 e 10).

A equação geral do processo é a seguinte:



Como se depreende da equação acima, a glicólise é uma via de oxidação de glicose a piruvato, capaz de conservar uma parte da energia derivada desta transformação na forma de ATP. De fato, para cada mol de glicose oxidada a piruvato, são produzidos dois mols de ATP. Deve-se notar ainda que a via glicolítica inclui uma reação de oxirredução, a oxidação de gliceraldeído 3-fosfato a 1,3 bisfosfoglicerato com redução de NAD^+ a NADH (Figura 3.4, reação 6).

A glicólise também gera 6 das 13 moléculas precursoras para biossíntese de constituintes celulares: **glicose 6-fosfato**, **frutose 6-fosfato**, **gliceraldeído 3-fosfato**, **3-fosfoglicerato**, **fosfoenolpiruvato** e **piruvato** (Figura 3.2).

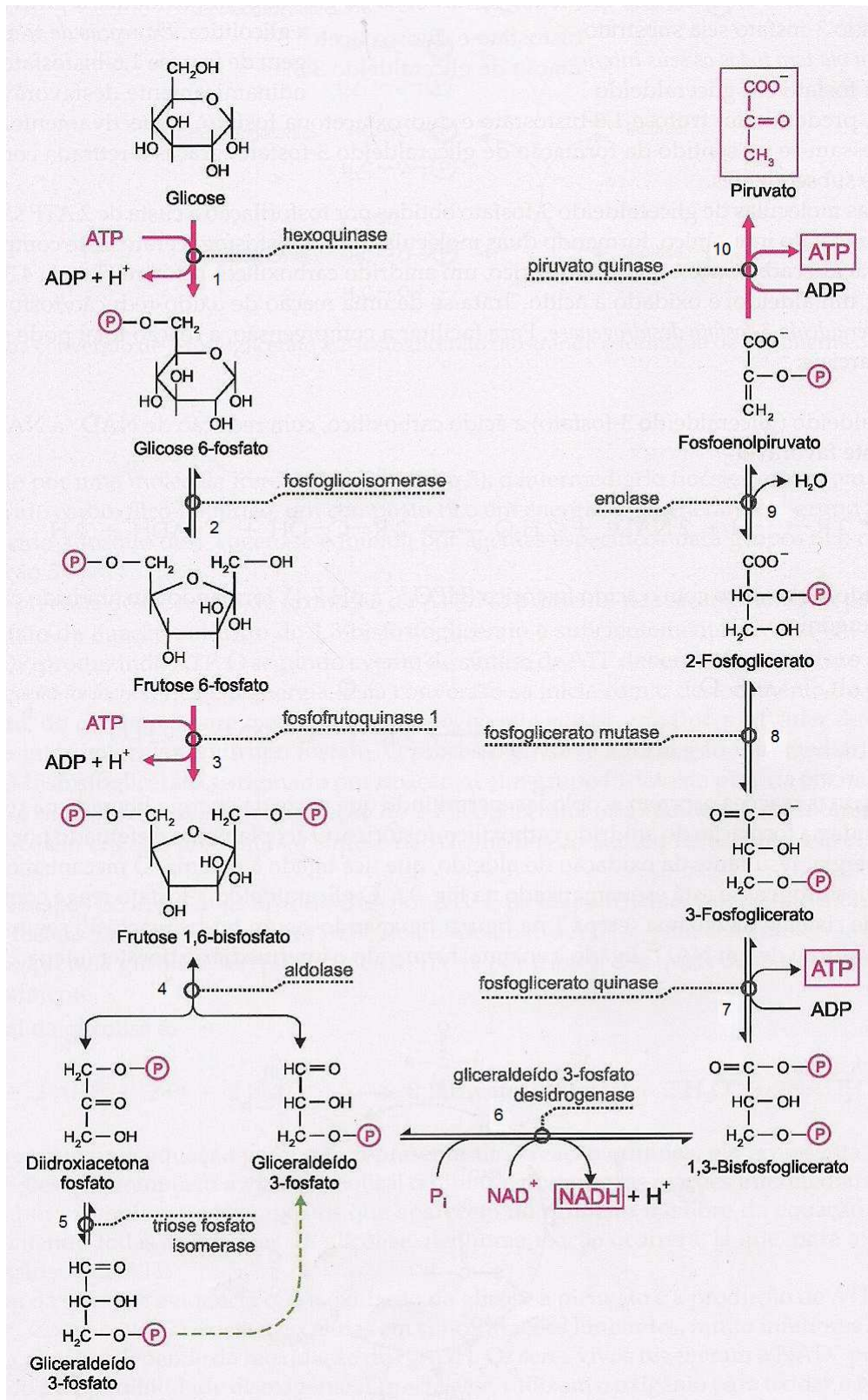
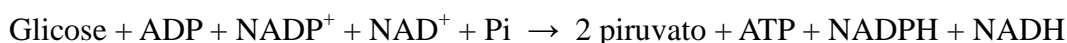


Figura 3.4. Via de Embden-Meyerhoff-Parnas

3.1.2 Via de Entner-Doudoroff

A via de Entner-Doudoroff (Figura 3.5), descrita apenas em microrganismos, é uma alternativa para o metabolismo de glicose e apresenta apenas duas reações específicas, as de números 3 e 4; as demais são encontradas também na via de Embden-Meyerhof-Parnas (Seção 3.1.1) ou na via das pentoses (Seção 3.1.3). As vias de Entner-Doudoroff e de Embden-Meyerhof-Parnas têm características comuns: ambas envolvem a fosforilação de açúcares de 6 carbonos e sua clivagem em compostos de 3 carbonos. A distinção entre as duas vias está no composto de 6 carbonos utilizado como substrato para clivagem: frutose 1,6-bisfosfato na via de Embden-Meyerhof-Parnas e 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato na via de Entner-Doudoroff. A frutose 1,6-bisfosfato é clivada a gliceraldeído 3-fosfato e di-hidroxiacetona fosfato e o 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato, a piruvato e gliceraldeído 3-fosfato. O resultado líquido da degradação da glicose por esta via é representado pela equação seguinte.



A via de Entner-Doudoroff também é capaz de conservar uma parte da energia sob a forma de ATP: para cada mol de glicose oxidada a piruvato, é produzido um mol de ATP. As vias de Entner-Doudoroff e de Embden-Meyerhof-Parnas têm a mesma reação de redução de NAD^+ . Na via de Entner-Doudoroff são produzidos um mol de NADH e um mol de NADPH por mol de glicose oxidada. A via de Entner-Doudoroff produz 5 das 13 moléculas precursoras para biossíntese de constituintes celulares: **glicose 6-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e piruvato** (Figura 3.2).

A via de Entner-Doudoroff é a principal via de degradação de glicose em diversas bactérias Gram-negativas: *Pseudomonas*, *Zymomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* etc. Embora a glicose seja degradada pela via de Embden-Meyerhof-Parnas em diversas bactérias, a via de Entner-Doudoroff é utilizada para a degradação de outros substratos e está presente em microrganismos que vivem em ambientes com disponibilidade de gliconato, como o solo. A Tabela 3.1 apresenta a distribuição das vias Embden-Meyerhof-Parnas e Entner-Doudoroff em diferentes bactérias.

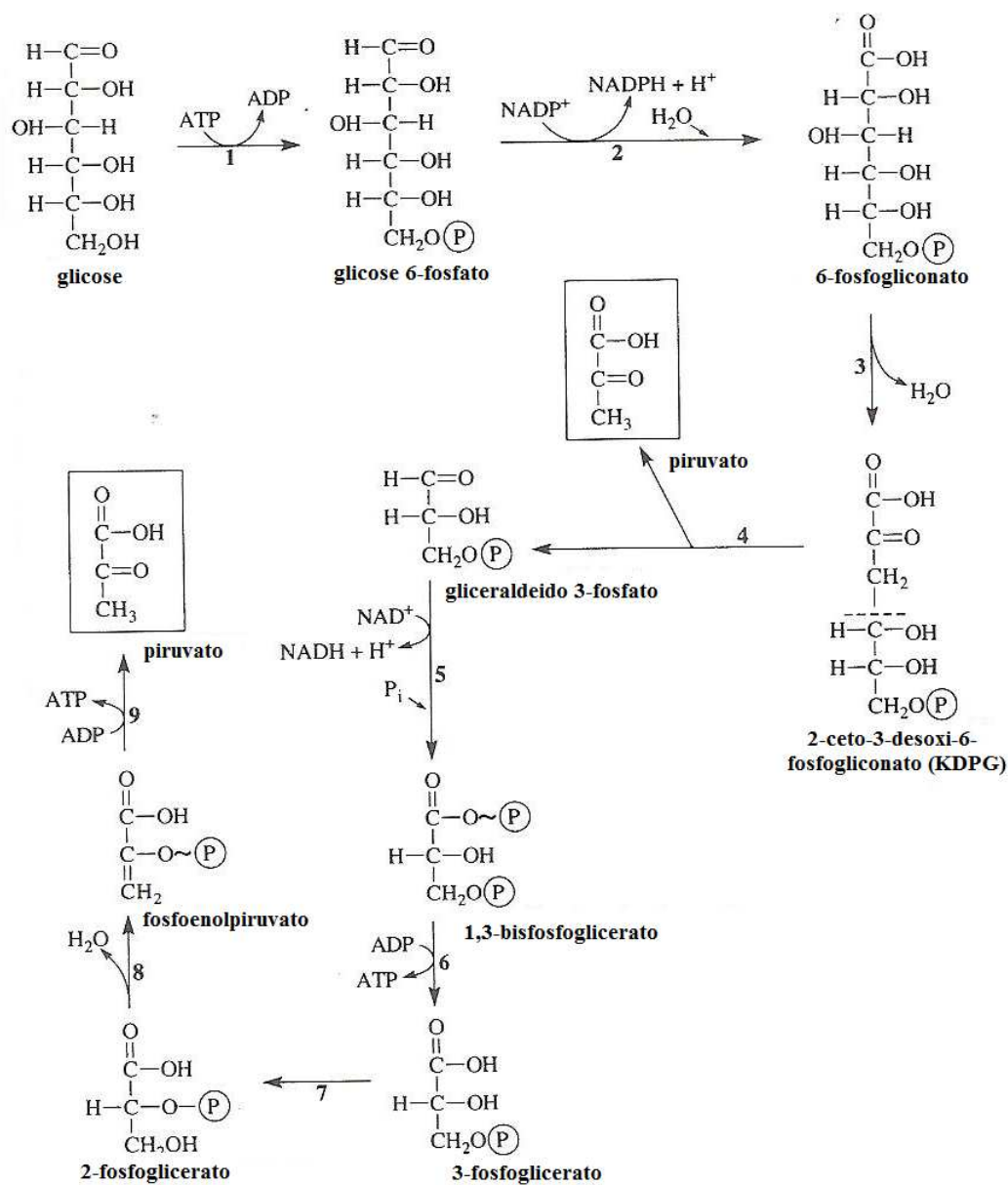


Figura 3.5. Via de Entner-Doudoroff.

Tabela 3.1. Presença das vias Embden-Meyerhof-Parnas e Entner-Doudoroff em algumas bactérias

Organismo	EMP	ED
<i>Ralstonia eutropha</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+
<i>Pseudomonas saccharophila</i>	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	-/+*
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	-	+
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	-	+
<i>Azotobacter choococcum</i>	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-
<i>Arthrobacter sp</i>	+	-

**E. coli* somente expressa as enzimas de Entner-Doudoroff quando cresce em gliconato.

3.1.3 Via das Pentoses

A via das pentoses (Figura 3.6), outra via de degradação de glicose, pode ser dividida em três etapas:

1. *fase oxidativa*, na qual reações de oxidação de glicose 6-fosfato e de 6-fosfogliconato dão origem a NADPH e a reação de descarboxilação do 6-fosfogliconato produz CO₂ (reações 1 a 3).

2. *fase das reações de isomerização* – a ribulose 5-fosfato, formada na fase anterior, pode ser transformada em xilulose 5-fosfato ou em ribose 5-fosfato (reações 4 e 5), por ação de enzimas diferentes; a ribose 5-fosfato é precursora para a síntese de ribonucleotídeos de purinas e de pirimidinas e para a biossíntese de aminoácidos aromáticos.

3. *fase das reações de rearranjo de açúcares* - tais rearranjos ocorrem em reações catalisadas por transaldolases e transcetolases, que transferem, respectivamente, grupos de dois ou três carbonos para aldoses receptoras (reações 6 a 8).

O resultado líquido da oxidação parcial da glicose pela via das pentoses é representado pela equação seguinte.



A via das pentoses leva à redução de NADP⁺ a NADPH, a principal fonte de elétrons para as reações de biossínteses redutivas. Assim, a via das pentoses conserva a energia de oxidação do açúcar apenas na forma de NADPH e não produz ATP. Além de NADPH, a via das pentoses produz 6 dos 13 precursores para biossíntese de constituintes celulares: **glicose 6-fosfato, ribose 5-fosfato, sedoheptulose 7-fosfato, eritrose 4-fosfato, frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato** (Figura 3.2).

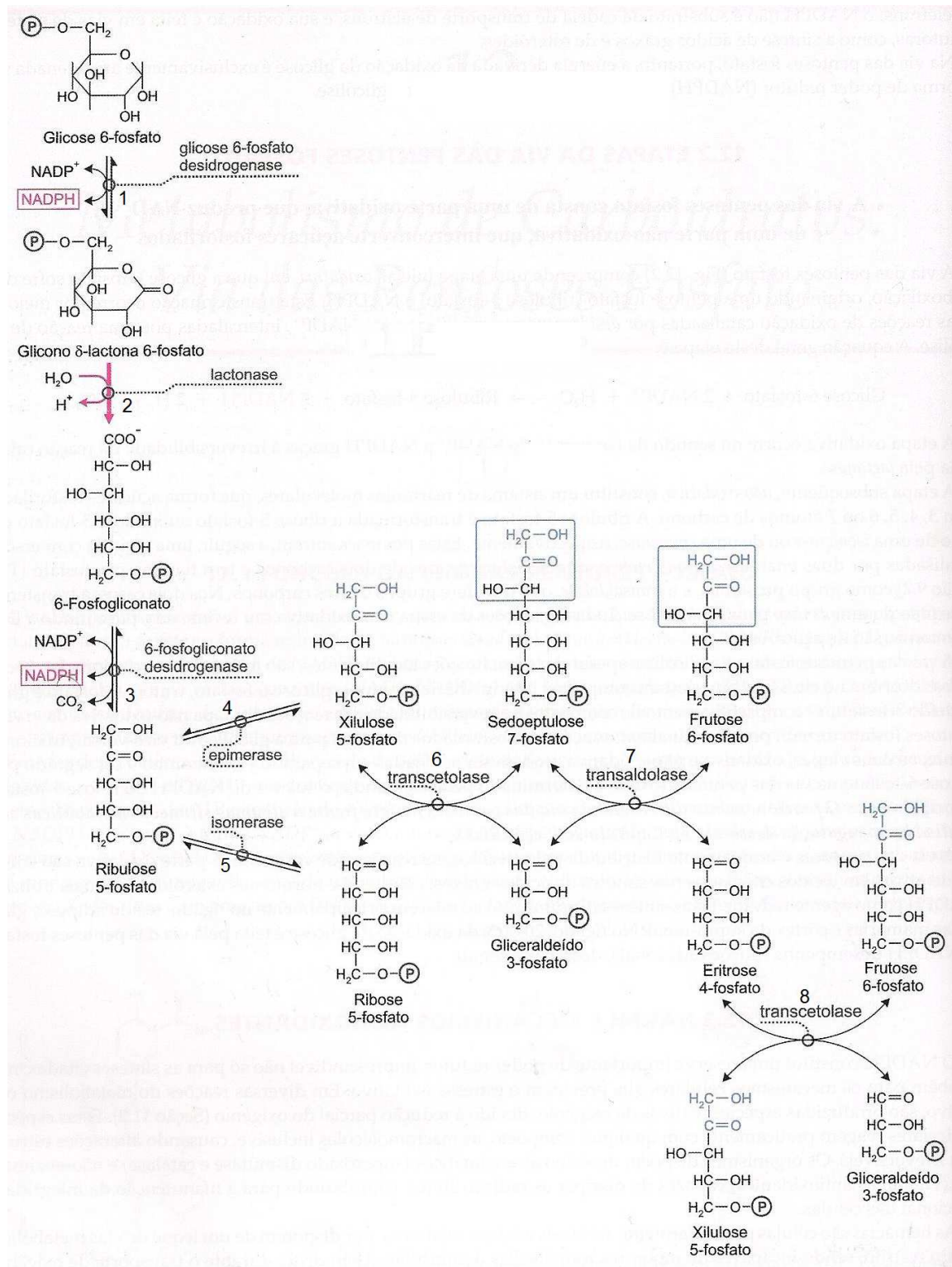


Figura 3.6. Via das pentoses

3.1.4 Via da fosfocetolase (hexose monofosfato)

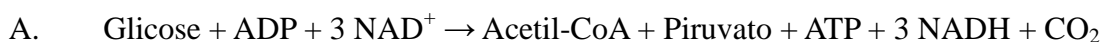
Bactérias láticas heterofermentadoras, bem como bifidobactérias, fazem a oxidação de carboidratos por uma via denominada *via da fosfocetolase*. Esta enzima cliva cetoses fosforiladas por introdução de fosfato inorgânico.

A oxidação de glicose por *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 3.7A) ocorre inicialmente pela conversão de glicose 6-fosfato a xilulose 5-fosfato em reações correspondentes àquelas da via das pentoses. Em seguida, xilulose 5-fosfato é clivada em gliceraldeído 3-fosfato e acetilfosfato por ação da fosfocetolase. O gliceraldeído 3-fosfato é convertido a piruvato e o acetilfosfato, a acetil-CoA.

Bifidobacterium bifidum apresenta duas fosfocetolases: uma ativa com frutose 6-fosfato e outra com xilose 5-fosfato. Inicialmente, glicose é convertida a frutose 6-fosfato, em reações correspondentes às da via de Embden-Meyerhof-Parnas. Pela ação da fosfocetolase, frutose 6-fosfato é clivada a eritrose 4-fosfato e acetilfosfato. Eritrose 4-fosfato e outra molécula de frutose 6-fosfato sofrerão rearranjos em reações da via das pentoses para formar duas moléculas de xilulose 5-fosfato. As moléculas de xilulose 5-fosfato sofrem a ação da outra fosfocetolase (semelhante àquela encontrada em *L. mesenteroides*), e formam gliceraldeído 3-fosfato e acetilfosfato (Figura 3.7B).

As vias da fosfocetolase permitem a obtenção de 10 dos 13 precursores: **glicose 6-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato, acetil-CoA, frutose 6-fosfato, ribose 5-fosfato, eritrose 4-fosfato e sedoheptulose 7-fosfato** (Figura 3.2).

As equações globais da oxidação parcial da glicose pelas vias das fosfocetolases são:



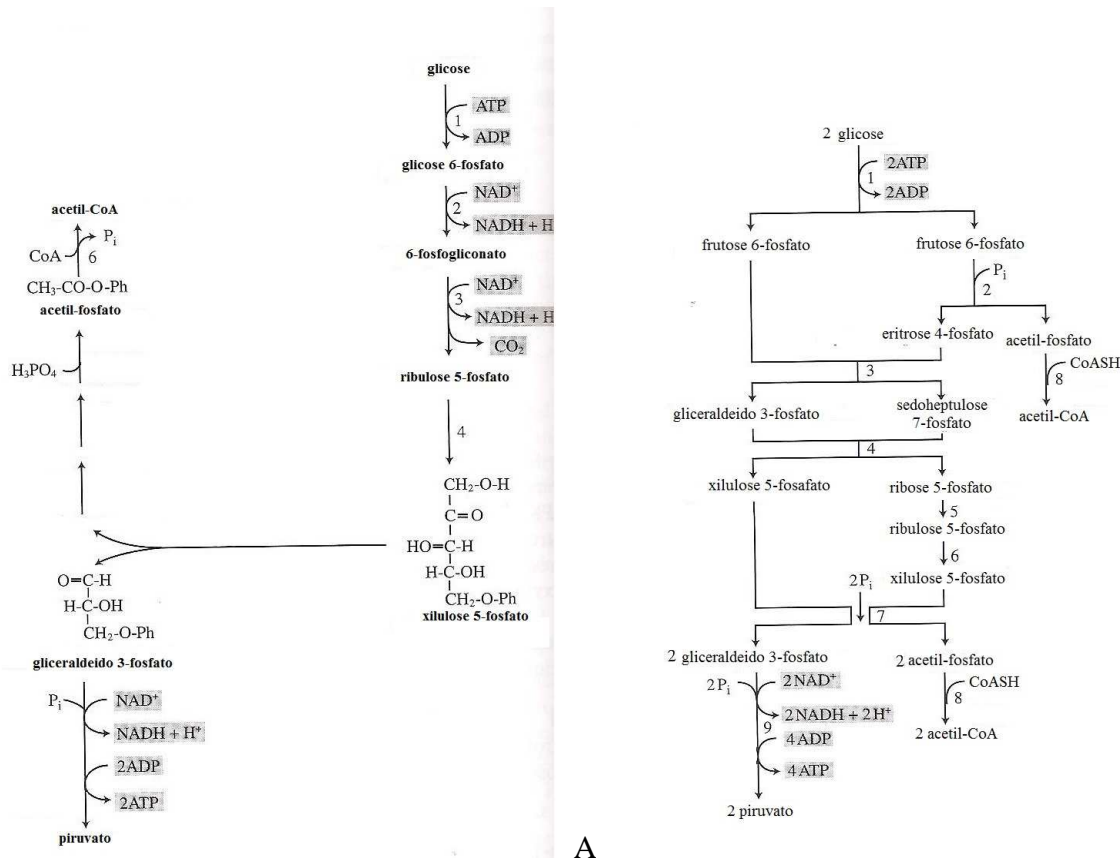


Figura 3.7. Via da fosfoacetolase. A. Em *Leuconostoc*. B. Em *Bifidobacterium*.

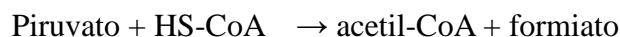
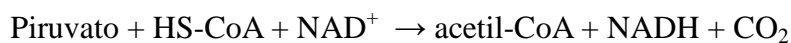
3.1.5. Os destinos do piruvato

Piruvato é o produto comum da oxidação de carboidratos pelas principais vias catabólicas de açúcares, como pode ser verificado nas equações globais das vias de Entner-Doudoroff e de Embden-Meyerhof-Parnas. Embora não seja o produto final da via das pentoses, o piruvato poderá ser formado a partir do gliceraldeído 3-fosfato produzido nesta via.

Há várias alternativas metabólicas para o piruvato, dependendo das condições celulares e ambientais e da espécie considerada (Figura 3.8).

No processo de fermentação (Seção C-3.1.1.), não há aceptores **exógenos** de elétrons. O piruvato ou substâncias dele derivadas são reduzidos por NADH, restaurando a forma oxidada da coenzima (NAD⁺). A oxidação do NADH permite que esta coenzima participe de novas oxidações do substrato.

O piruvato pode ser convertido a acetil-CoA, por oxidação catalisada pelo *complexo piruvato desidrogenase* ou por reação catalisada pela *piruvato-formiato liase*. As reações de conversão são as seguintes:



Note-se que, no primeiro caso, há redução de NAD^+ e produção de CO_2 .

Nas enterobactérias em anaerobiose, a piruvato-formiato liase é ativada e o complexo piruvato desidrogenase, inativado. Esta adaptação não deve ser generalizada, pois em outras bactérias, como *Pseudomonas*, o complexo piruvato desidrogenase pode estar ativo mesmo em anaerobiose.

Além das alternativas descritas, o piruvato é precursor para muitas sínteses, incluindo a de aminoácidos.

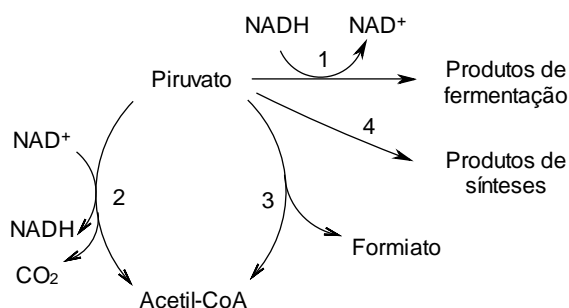
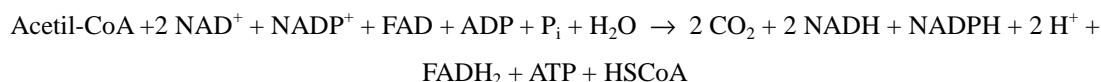


Figura 3.8. Diferentes destinos do piruvato. 1. Fermentações. 2. Descarboxilação oxidativa pelo complexo piruvato desidrogenase 3. Conversão a acetil-CoA pela piruvato-formiato liase. 4. Sínteses.

3.1.6 Ciclo de Krebs - Ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

O ciclo de Krebs, ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Figura 3.9), é a via que promove a oxidação completa dos átomos de carbono presentes na acetil-CoA. Constitui, portanto, a etapa final de oxidação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, já que o metabolismo degradativo destes compostos converge para a formação de acetil-CoA. A equação geral do ciclo de Krebs é a seguinte:



Na equação geral não aparece o oxaloacetato, substrato da primeira reação do ciclo (reação 1), regenerado na última reação (reação 8). Não há, portanto, gasto efetivo

de oxaloacetato; este composto cumpre um papel catalítico e o ciclo está apto, teoricamente, a oxidar qualquer quantidade de acetil-CoA sem consumo de oxaloacetato.

Como se nota pela equação geral, a oxidação de um mol de acetil-CoA está associada à produção de 2 mols de NADH, 1 mol de NADPH e de 1 mol de FADH₂ (Figura 3.9). Destaca-se que na maioria das bactérias, ao contrário dos organismos eucarióticos, a coenzima da isocitrato desidrogenase é NADP⁺ e não NAD⁺.

A redução de coenzimas não é a única função do ciclo de Krebs: 1 mol de ADP é fosforilado e três compostos intermediários do ciclo são precursores em vias biossintéticas: **α-cetogluturato**, **oxaloacetato** e **succinil-CoA**.

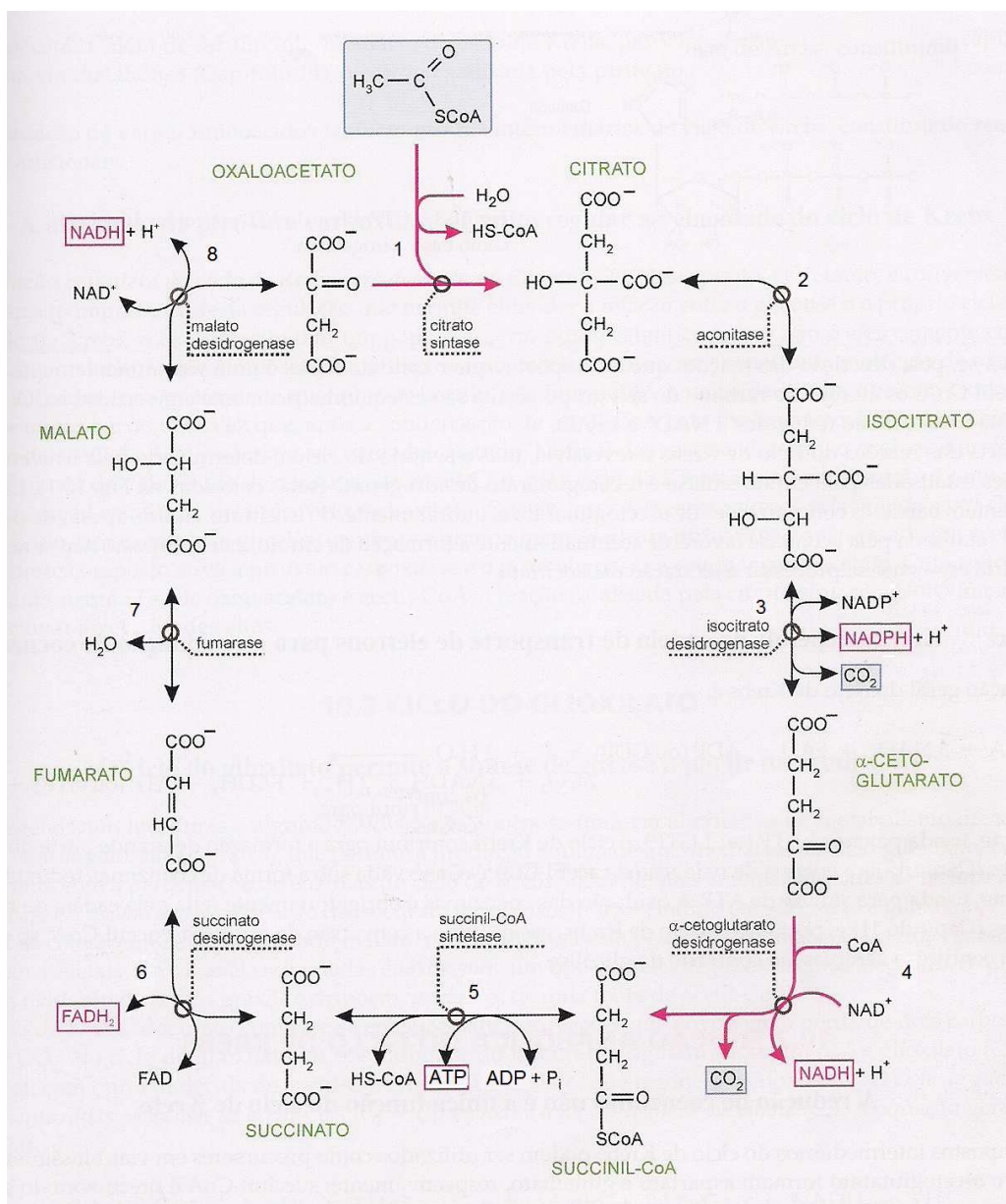


Figura 3.9. Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs).

3.1.7 Ramos oxidativo e redutor

Em algumas condições, o complexo α -cetogluturato desidrogenase não está presente ou está inativado. Sem o complexo, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos não pode operar plenamente, mas ainda assim, é possível a síntese de oxaloacetato, α -cetogluturato e succinil-CoA por partes do ciclo, que são referidas como ramos *oxidativo* e *redutor* (Figura 3.10).

No ramo redutor, o oxaloacetato é reduzido a succinil-CoA, promovendo a *oxidação* de coenzimas. No ramo oxidativo, o oxaloacetato condensa-se com acetil-CoA, formando citrato, que é oxidado a α -cetogluturato, levando à *redução* de coenzimas. Para suprir os dois ramos e mantê-los em funcionamento, é necessário o contínuo aporte de oxaloacetato, formado pela carboxilação de piruvato ou de fosfoenolpiruvato.

Apesar de haver uma só reação de oxidação de coenzimas no ramo oxidativo e duas reações de redução no ramo redutor, a estequiometria entre os dois ramos pode ser estabelecida quando o ramo oxidativo for acionado em dobro em relação ao ramo redutor, equilibrando as concentrações de coenzimas reduzidas e oxidadas.

Comparando os ramos oxidativo e redutor com o ciclo de Krebs verifica-se que os ramos cumprem a função de suprir precursores para biossínteses, enquanto o ciclo, além desta função, oxida acetil-CoA a CO_2 . Esta oxidação está associada à redução de coenzimas que doam elétrons para a cadeia de transporte de elétrons. Assim, o ciclo também contribui para a produção de ATP (Seção 3.2.2), o que não ocorre quando os ramos são acionados.

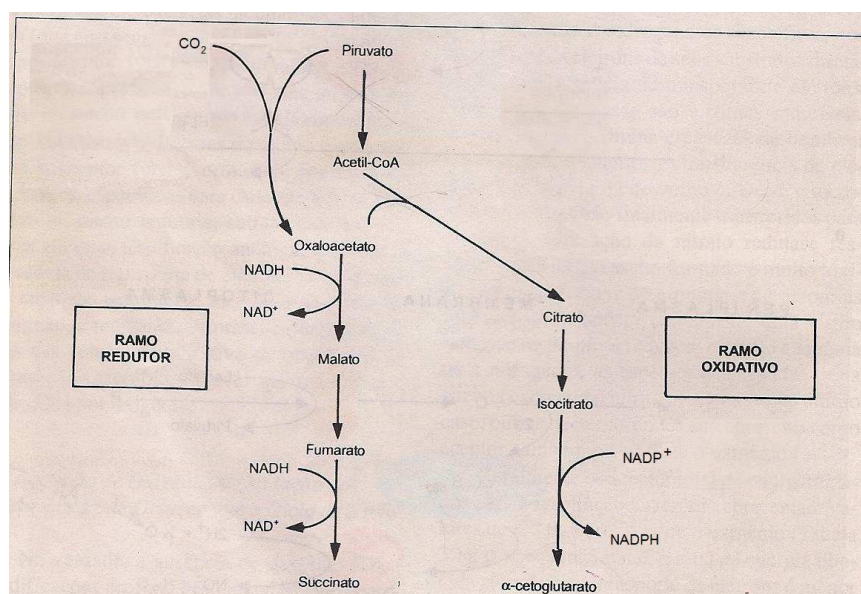


Figura 3.10. Ramos Oxidativo e Redutor.

Ciclo do glioxilato

Bactérias com capacidade de crescer em acetato ou ácidos graxos devem esta possibilidade à presença de duas enzimas, *isocitrato liase* e *malato sintase*, que atuando em conjunto com enzimas do ciclo de Krebs, permitem a síntese de oxaloacetato a partir de acetil-CoA. Esta via é designada *ciclo do glioxilato*. Neste ciclo, citrato e isocitrato são produzidos com reações comuns ao ciclo de Krebs. O isocitrato é clivado em succinato e glioxilato pela ação da enzima *isocitrato liase*. O succinato, convertido a oxaloacetato, repõe aquele utilizado para síntese do citrato. O glioxilato condensa-se com acetil-CoA, formando malato, em uma reação catalisada pela *malato sintase*. O malato origina um oxaloacetato “extra” que, estequiometricamente, pode ser admitido como tendo sido formado a partir de duas moléculas de acetil-CoA, como mostra a equação geral do ciclo:

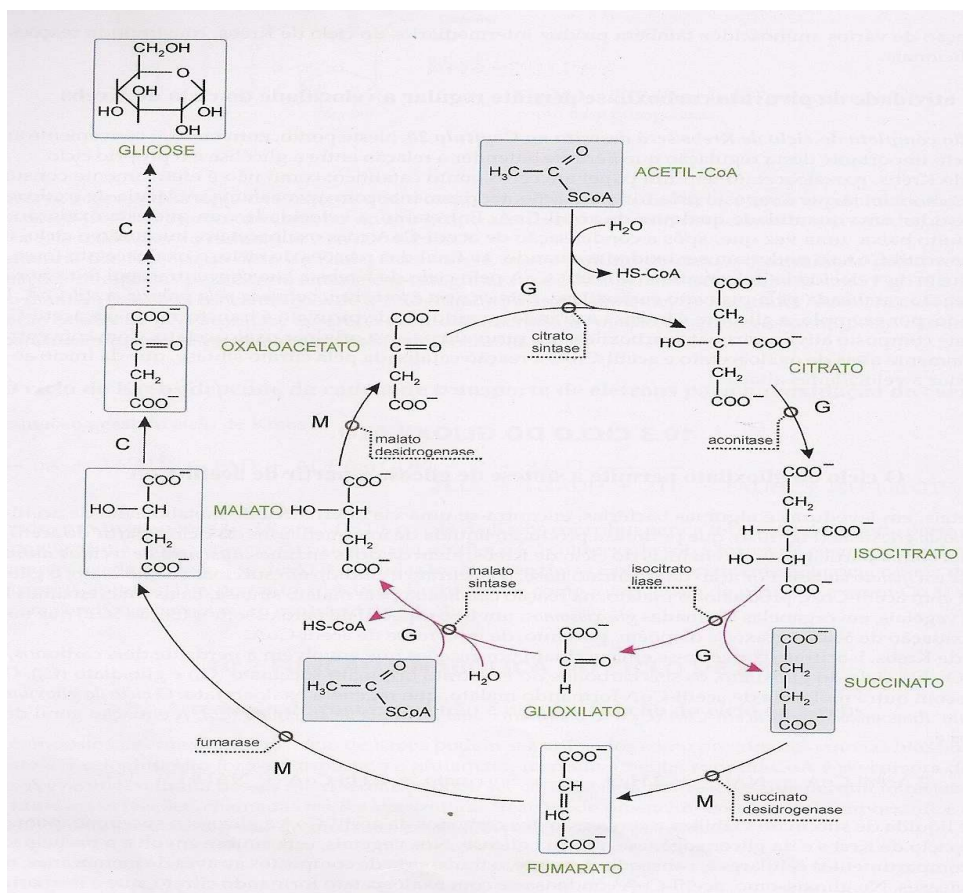


Figura 3.11. Ciclo do glioxilato.

A Tabela 3.2, que lista os precursores obtidos nas vias metabólicas até o momento analisadas, evidencia uma importante constatação: *uma única via metabólica não é capaz de fornecer elementos suficientes para que a célula bacteriana possa crescer e multiplicar-se*. São necessárias pelo menos três delas para que todos os 13 precursores de biossíntese sejam obtidos. Também é importante ressaltar que nem todas as bactérias são capazes de sintetizar todos os precursores, pois carecem de vias que os produzam, necessitando para tanto, obtê-los do meio de cultura, como precursores ou já como seu produto final.

Tabela 3.2. Moléculas Precursoras e Vias e Reações que as produzem

Precursosores	Vias produtoras						
	Via Glicolítica	Entner Doudorof	Via das Pentoses	Fosfo-cetolase	Ramos Oxid. Red.	Ciclo de Krebs	CPD ou PFL
Glicose 6-fosfato	+	+	+	+	-	-	-
Frutose 6-fosfato	+	-	+	+/-	-	-	-
Ribose 5-fosfato	-	-	+	+/-	-	-	-
Eritrose 4-fosfato	-	-	+	+/-	-	-	-
Sedoheptulose 7-fosfato	-	-	+	+/-	-	-	-
Gliceraldeído 3-fosfato	+	+	+	+	-	-	-
3-fosfoglicerato	+	+	-	+	-	-	-
Fosfoenolpiruvato	+	+	-	+	-	-	-
Piruvato	+	+	-	+	-	-	+
Acetil-CoA	-	-	-	+	-	-	+
α -cetoglutarato	-	-	-	-	+	+	-
Oxaloacetato	-	-	-	-	+	+	-
Succinil-CoA	-	-	-	-	+	+	-

CPD – Complexo Piruvato Desidrogenase PFL – Piruvato-Formiato Liase

3.1.9 Gliconeogênese

É comum o uso, por bactérias, de aminoácidos, ácidos graxos, lactato e glicerol como fonte de carbono e energia. Para tanto, as células devem desenvolver vias adequadas para sua utilização. Os aminoácidos podem ser desaminados, transformando-se em intermediários do ciclo de Krebs (Figura 3.12.), piruvato, acetoacetil-CoA ou acetil-CoA. Ácidos graxos também dão origem a acetil-CoA. O desafio para o crescimento nessas fontes de carbono consiste em obter os outros precursores de biossíntese.

A partir de piruvato pode ser acionada uma via denominada *gliconeogênese* (Figura 3.13), que consiste na conversão desse composto a carboidratos, compreendendo, assim, o inverso da via glicolítica. A maioria das reações da via de Embden-Meyerhof-Parnas é reversível, mas duas são irreversíveis e devem ser transpostas: as reações catalisadas pela piruvato quinase (fosfoenolpiruvato \rightarrow piruvato) e pela fosfofrutoquinase 1 (frutose 6-fosfato \rightarrow frutose 1,6 bisfosfato). Em bactérias, piruvato pode ser convertido diretamente em fosfoenolpiruvato. Em vários organismos, fosfoenolpiruvato é formado a partir de oxaloacetato. Todas estas reações requerem ATP.

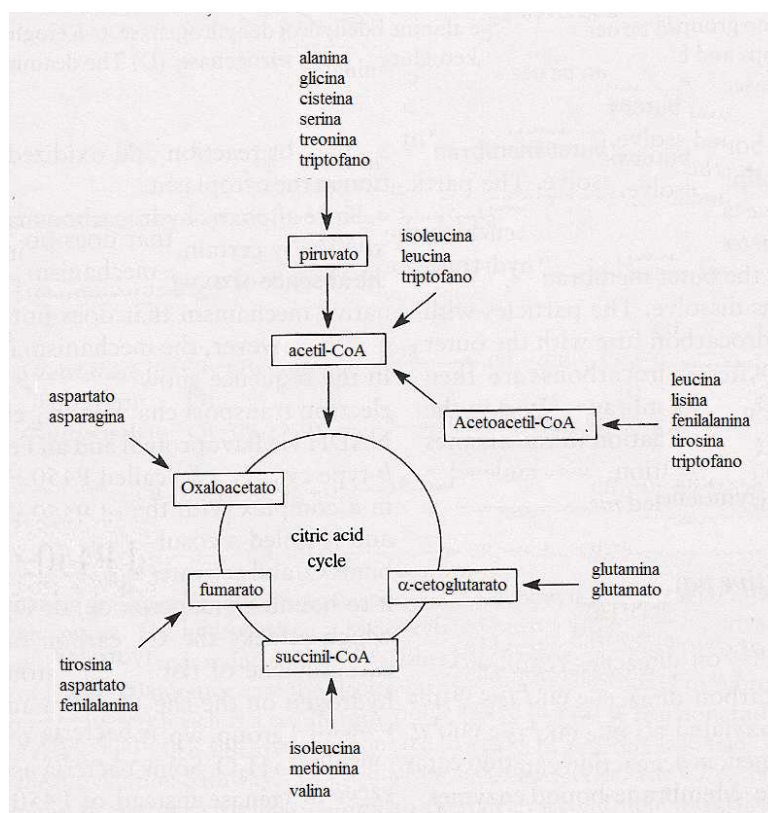


Figura 3.12. Degradação de aminoácidos a intermediários das vias centrais do metabolismo.

O fosfoenolpiruvato é transformado em frutose 1,6-bisfosfato pelas mesmas enzimas que participam da via de Embden-Meyerhof-Parnas catalisando reações reversíveis. A desfosforilação de frutose 1,6-bisfosfato por hidrólise do grupo fosfato, catalisada pela frutose 1,6-bisfosfatase, contorna a irreversibilidade da reação catalisada pela fosfofrutoquinase.

A partir de frutose 6-fosfato podem ser gerados glicose 6-fosfato e outros intermediários da via das pentoses.

Com o concurso da gliconeogênese, determinados microrganismos são capazes de crescer exclusivamente em aminoácidos e obter precursores para as biossínteses. A gliconeogênese proporciona os mesmos precursores fornecidos pela Via Embden-Meyerhof-Parnas (Tabela 3.2).

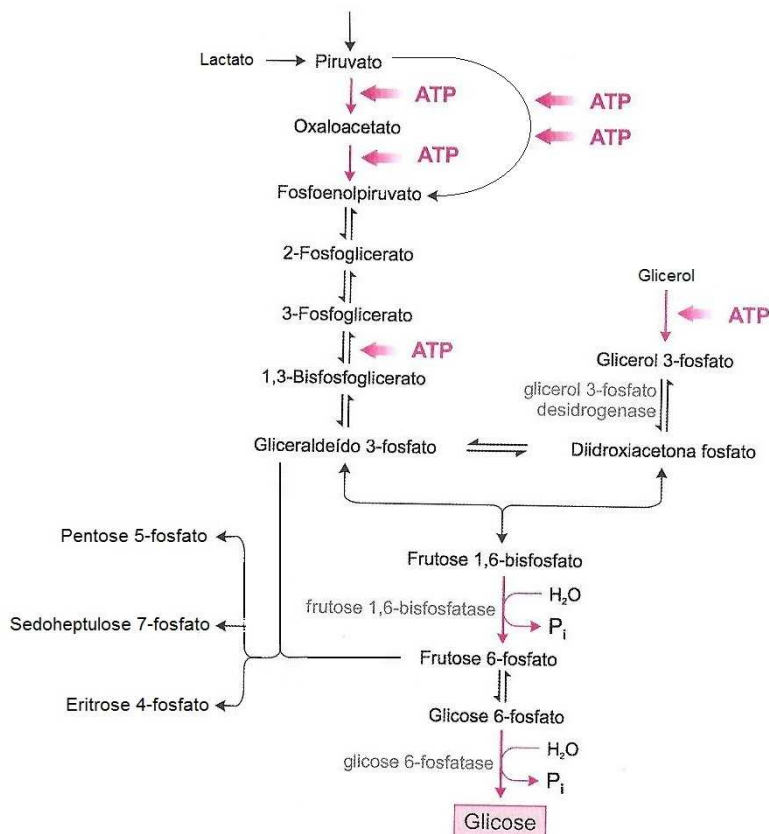


Figura 3.13. Gliconeogênese.

3.2 Obtenção de ATP

A obtenção de ATP por oxidação de compostos orgânicos por bactérias heterotróficas é cumprida de duas maneiras: *fosforilação no nível do substrato* e fosforilação associada à cadeia de transporte de elétrons, a *fosforilação oxidativa*.

3.2.1 Fosforilação no nível do substrato

A fosforilação no nível do substrato é o processo mais simples e com menor rendimento. Em determinadas vias metabólicas ocorrem reações que permitem a incorporação de um íon fosfato a uma molécula orgânica; em reação subsequente, o grupo fosfato pode ser transferido para o ADP (Figura 3.4), caracterizando a fosforilação

no nível do substrato. Uma parcela dos microrganismos sobrevive utilizando apenas este mecanismo de síntese de ATP. É o que ocorre com bactérias fermentativas, que obtêm ATP exclusivamente pela via de Embden-Meyerhof-Parnas, à semelhança do que ocorre com as hemácias de mamíferos.

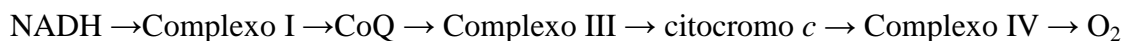
3.2.2 Fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é um processo muito mais complexo porque a síntese de ATP, a partir de ADP e fosfato, aproveita e depende da energia de um gradiente de prótons, formado pelo funcionamento da *cadeia de transporte de elétrons*. Esta cadeia oxida substratos, e transfere os elétrons até um acceptor final, com passagens intermediárias pelos compostos que compõem a cadeia. Concomitante à transferência de elétrons do doador inicial até o acceptor final da cadeia, ocorre a extrusão de prótons do citoplasma para o exterior. Como consequência, o citoplasma fica com pH maior do que o exterior, formando-se o gradiente de prótons (químico e elétrico). A membrana celular é, em sua maior extensão, impermeável a prótons, que só podem retornar ao interior da célula através de uma proteína específica, localizada na membrana, denominada *ATP sintase*. À ATP sintase estão ligados ADP e fosfato, que reagem formando ATP quando do retorno dos prótons. Este tipo de fosforilação é chamada *oxidativa* por iniciar-se com a oxidação de coenzimas ou de outros compostos reduzidos. É o processo responsável pela maior parte da produção de ATP nas células aeróbias, encontrado também na fotossíntese e na respiração anaeróbia.

3.2.2.1 Cadeia de transporte de elétrons.

A cadeia de transporte de elétrons aeróbia de bactérias heterotróficas, como a mitocondrial, é formada por um conjunto de compostos que incluem flavoproteínas, proteínas ferro-enxofre, quinonas e citocromos.

Nas mitocôndrias, estes componentes estão agrupados em quatro complexos, I, II, III e IV, tendo a coenzima Q e o citocromo *c* como elementos móveis conectando, respectivamente, os complexos I e II ao III e o complexo III ao IV. O doador de elétrons inicial é a coenzima reduzida NADH, que inicia a transferência de elétrons doando-os ao complexo I, de onde são transferidos até o oxigênio, ligado ao complexo IV. Os complexos I, III e IV são bombas de prótons.



Faz parte da cadeia de transporte de elétrons um tipo especial de proteínas com capacidade de receber e doar elétrons, designadas *proteínas ferro-enxofre* ou ferredoxinas. Como seu nome sugere, este tipo de proteína contém grupos de átomos de ferro e enxofre, em diferentes arranjos: pode-se encontrar, por exemplo, $\text{Fe}_2.\text{S}_2$, $\text{Fe}_4.\text{S}_4$ ou outros arranjos, dependendo da proteína e da espécie de microrganismo considerado. É também ao ferro que as proteínas ferro-enxofre devem suas propriedades oxidorreduzoras, pois podem apresentar-se com o ferro na forma Fe^{3+} , quando oxidado, e, Fe^{2+} , quando recebem um elétron. Apesar da semelhança funcional, o íon de ferro das proteínas ferro-enxofre não faz parte de um grupo heme, como acontece no caso dos citocromos. Estas proteínas são, por isto, muitas vezes referidas como possuindo ferro não hêmico. As proteínas ferro-enxofre encontram-se associadas às desidrogenases ligadas à membrana e também ao complexo de citocromos *b-c1*.

Nas bactérias, as cadeias de transporte de elétrons estão dispostas na membrana citoplasmática e são mais variadas, por haver diferentes:

- doadores iniciais de elétrons,
- transportadores intermediários e
- aceptores finais.

Em virtude da diversidade de substratos doadores de elétrons (Figura 3.14), os elétrons podem entrar na cadeia de transporte de elétrons em três níveis: pelas desidrogenases, pelas quinonas ou pelos citocromos. O ponto de entrada depende, naturalmente, dos potenciais de redução padrão dos componentes da cadeia respiratória e dos doadores de elétrons (Tabela 3.3). As bactérias usam diferentes cadeias de transporte de elétrons, muitas vezes simultaneamente. As cadeias de transporte de elétrons podem conter desde uma até três bombas de prótons (como nas mitocôndrias).

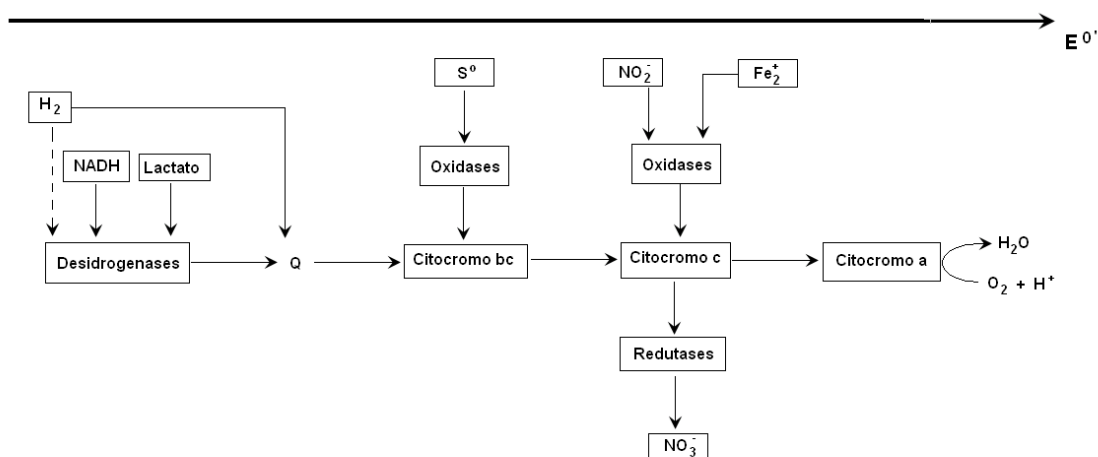


Figura 3.14. Exemplos da diversidade de doadores de elétrons e aceptores da cadeia respiratória, com a indicação do ponto de entrada e de saída dos elétrons. A seta maior indica o sentido dos potenciais de redução padrão crescentes dos compostos referidos no esquema.

Tabela 3.3. Potenciais de redução padrão em pH 7,0

Par redox	E'_0 (V)
CO_2 /formiato	-0,432
H^+/H_2	-0,410
Fd_{ox}/Fd_{red} (<i>Clostridium</i>)	-0,410
NAD^+/NAD	-0,320
Lipoico/diidrolipofílico	-0,290
S^0/H_2S	-0,270
$FAD/FADH_2$	-0,220
acetaldeido/etanol	-0,197
$FMN/FMNH_2$	-0,190
Piruvato/lactato	-0,185
Oxaloacetato/malato	-0,170
Menaquinona (ox/red)	-0,074
$cyt\ b_{558}$ (ox/red)	-0,075 a -0,043
Fumarato/succinato	+0,033
Ubiquinona (ox/red)	+0,100
$cyt\ b_{556}$ (ox/red)	+0,046 a +0,129
$cyt\ b_{562}$ (ox/red)	+0,125 a +0,260
$cyt\ d$ (ox/red)	+0,260 a +0,280
$cyt\ c$ (ox/red)	+0,250
$cyt\ a$ (ox/red)	+0,290
$cyt\ c_{555}$ (ox/red)	+0,355
NO_3^-/NO_2^-	+0,421
Fe^{3+}/Fe^{2+}	+0,771
O_2 (1 atm)/ H_2O	+0,815

As características principais dos componentes da cadeia de transporte de elétrons bacteriana estão descritas a seguir.

Desidrogenases

Além da entrada de elétrons feita por ação da *NADH desidrogenase* e *succinato desidrogenase*, nas bactérias há entradas alternativas, oferecidas por outras desidrogenases. Todas estão ligadas à membrana e contêm flavina adenina dinucleotídio (FAD) ou flavina mononucleotídio (FMN) como coenzimas. Diferem, neste aspecto, das desidrogenases citossólicas correspondentes, que geralmente usam NAD^+ como coenzima. As desidrogenases mais importantes são:

NADH desidrogenase (NADH-ubiquinona óxido-redutase)- Em bactérias aeróbias, heterotróficas é, frequentemente, a primeira enzima da cadeia de transporte de elétrons. É componente do complexo I, constituído por um domínio integrado à membrana e um domínio que se projeta para o interior da célula. O NADH doa elétrons e um próton a FMN que se reduz formando FMNH_2 usando também um próton do citoplasma. Os elétrons do FNM são transferidos para centros Fe-S. Os prótons, por sua vez, são liberados para o espaço extracelular contribuindo para o gradiente químico e elétrico. Além de FMN, bactérias podem apresentar FAD como coenzima. A maior parte do NADH produzido pelo metabolismo é oxidada pela cadeia de transporte de elétrons.

Succinato desidrogenase - Contém FAD como grupo prostético e ao transferir os elétrons provenientes da oxidação do succinato para a cadeia de transporte de elétrons, produz fumarato.

Glicerol 3-fosfato desidrogenase – Difere da enzima citossólica por apresentar FAD como coenzima. Na membrana, catalisa a mesma reação, ou seja, a oxidação de glicerol 3-fosfato a di-hidroxiacetona fosfato.

Lactato desidrogenase - Pela ação da lactato desidrogenase de membrana, os elétrons originados da oxidação do lactato a piruvato podem ser oferecidos diretamente à cadeia de transporte de elétrons. Existe outra lactato desidrogenase, de localização citoplasmática, que catalisa a redução de piruvato a lactato na fermentação.

Além destas desidrogenases, existem diversas outras, refletindo a diversidade de substratos utilizados pelas bactérias: H_2 desidrogenases, formiato desidrogenase, metanol desidrogenase, metilamina desidrogenase e outras.

Quinonas

As quinonas, por serem compostos hidrofóbicos, apresentam uma mobilidade lateral relativamente grande na membrana de que fazem parte. Como membros da cadeia de transporte de elétrons, podem receber prótons e elétrons ao se reduzirem e doá-los ao se oxidarem. As quinonas recebem os elétrons coletados dos substratos pelas desidrogenases, sendo, assim, um composto de convergência de elétrons de várias procedências, que serão a seguir transferidos para os citocromos (Figura 3.14). Este papel coletor pode explicar sua alta concentração: em membranas de *E. coli*, por exemplo, sua concentração molar é cerca de 10 vezes maior do que a dos citocromos.

As membranas de bactérias contêm dois tipos principais de quinonas: *ubiquinona* e *menaquinona* (Figura 3.15). Em *E. coli*, a ubiquinona é a forma predominante em condições aeróbias, enquanto a menaquinona prevalece sob condições anaeróbias.

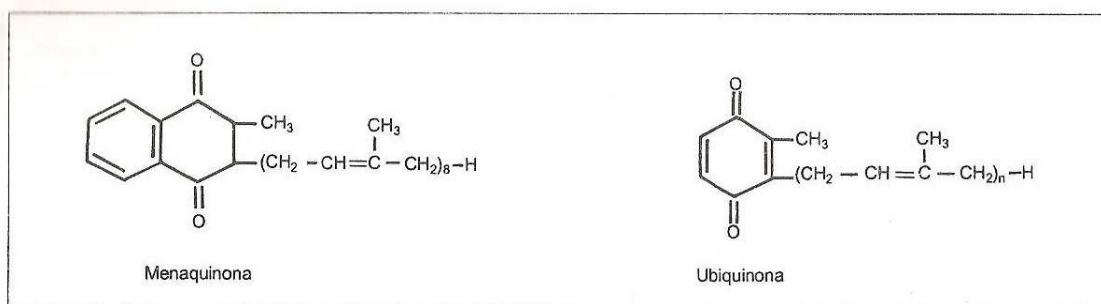


Figura 3.15. Estruturas de menaquinona e ubiquinona presentes em bactérias.

Redutases

Na respiração anaeróbia, as bactérias utilizam aceptores finais de elétrons diferentes do oxigênio: nitrato, sulfato, fumarato, etc. Os complexos enzimáticos que reduzem aceptores finais de elétrons diferentes do oxigênio são chamados *redutases*. Dependendo da fonte de elétrons e do aceptor, as bactérias podem sintetizar e substituir um complexo desidrogenase por outro, ou complexos redutases por complexos oxidases. Por exemplo, quando cresce anaerobiamente, *E. coli* produz os complexos redutases em vez dos complexos oxidases, reprime a síntese de algumas desidrogenases e estimula a síntese de outras. Por essa razão, os complexos transportadores de elétrons bacterianos às

vezes são referidos como módulos, uma vez que podem ser sintetizados e "conectados" à cadeia respiratória em resposta às condições ambientais.

Oxidases (citocromos)

Citocromos são carreadores de elétrons que possuem um heme como grupo prostético. Existem 5 classes de grupos heme que distinguem os citocromos bacterianos: hemes a, b, c, d e o. Os citocromos podem ter um ou mais grupos heme em sua constituição e essa composição é utilizada para denominar os diferentes citocromos (citocromo b, d, c, o, bo, bd, etc).

Citocromos são oxidases que retiram um elétron do componente da cadeia que o antecede transferindo-o para seu grupo heme. Alguns citocromos transferem o seu elétron para o O₂, reduzindo a H₂O e são denominados oxidases terminais. As bactérias apresentam diferentes oxidases terminais e com frequência, duas ou três podem estar presentes na mesma bactéria. Ao contrário, a mitocôndria tem a apenas uma citocromo c oxidase (citocromo aa₃).

São encontrados dois tipos básicos de oxidases terminais bacterianas:

1. *citocromo c oxidase* - Transfere elétrons do citocromo c para o oxigênio; pode ser análoga à oxidase mitocondrial

2. *quinol oxidase* - Este tipo de oxidase terminal transfere elétrons da ubiquinona diretamente para o oxigênio, sem passagem intermediária pelos citocromos do tipo c.

As diferentes oxidases terminais apresentam muitos subtipos, estabelecidos a partir do número e do tipo de citocromos (hemes) presentes. Além de encontrar-se diversidade dentro de gêneros e espécies, uma mesma célula pode apresentar mais de um tipo, dependendo do meio e das condições em que está sendo cultivada. *E. coli*, por exemplo, apresenta duas quinol oxidases (citocromo o e d), mas não possui citocromo c oxidases. Citocromo o tem baixa afinidade pelo O₂, enquanto o citocromo d tem maior afinidade. Assim, *E. coli* é capaz de respirar mesmo sob baixas concentrações de O₂, passando a expressar o citocromo d, embora a quantidade de ATP produzido é menor. Assim como a "escolha" da fonte de carbono a ser utilizada para oxidação é controlada por repressão catabólica, a "escolha" da via respiratória também está sujeita a controle global.

3.2.2.2 Gradiente de prótons

Os componentes da cadeia de transporte de elétrons estão dispostos ao longo da membrana plasmática de acordo com seus potenciais de redução padrão (E°), cujos valores estão mostrados na Tabela 3.3. Os elétrons partem do doador reduzido, que tem E° menor que os componentes da cadeia de transporte de elétrons, e percorrem uma sequência de transportadores com E° crescentes, até atingirem o acceptor final, que tem o maior E° . As transferências de elétrons entre estes compostos são, portanto, termodinamicamente favoráveis e facilitadas pelo fato de tais compostos estarem organizados em membranas, com posições definidas, de modo a situar cada componente exatamente entre aquele que lhe fornecerá elétrons e aquele ao qual seus elétrons serão doados.

O rendimento energético das transferências varia grandemente, dependendo do substrato oxidável inicial e do acceptor final. Em bactérias, a variação é muito maior que em mitocôndrias, uma vez que um maior número de doadores e de aceptores pode ser utilizado. O total de energia disponível para a formação do gradiente de prótons e, por consequência, para a síntese de ATP, depende da diferença entre os valores dos potenciais de redução padrão (E°) do doador de elétrons e do acceptor final, segundo a equação:

$$\Delta G^{\circ} = -n \mathcal{F} \Delta E^{\circ}$$

onde,

ΔG° = variação de energia livre padrão

n = número de elétrons transferidos

\mathcal{F} = constante de Faraday ($96.500 \text{ J.V}^{-1}.\text{Mol}^{-1}$)

ΔE° = diferença entre os valores de potencial de redução padrão do acceptor e do doador de elétrons.

3.2.2.3 Força próton motriz

O acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons é explicado pela *hipótese quimiosmótica*, proposta por Mitchell. Segundo a hipótese, a energia do transporte de elétrons é primariamente utilizada para que prótons sejam liberados, contra gradiente, no exterior da membrana plasmática. Sítios na cadeia nos quais as reações

redox ocorrem acopladas à extrusão de prótons são chamados sítios de acoplamento. Como consequência produz-se um *gradiente de prótons*, isto é, uma concentração diferente de prótons dentro e fora da célula (Figura 3.16). No máximo 10 prótons liberados para cada NADH oxidado utilizando O_2 comoceptor final. A face interna da membrana fica ainda mais negativa e a diferença de carga elétrica (*gradiente elétrico*) gera um potencial de membrana, da ordem de 0,1 a 0,2 V. A energia conservada nesse gradiente eletroquímico é chamada *força próton motriz* e é constituída por dois componentes: o gradiente de pH (concentração de prótons maior na face externa da membrana) e o gradiente elétrico (a face interna da membrana é negativa em relação à face externa). O retorno dos prótons ao interior da célula é um processo espontâneo, a favor do gradiente eletroquímico, capaz de levar à síntese de ATP. Como a membrana é impermeável a prótons, estes só podem voltar ao citoplasma e desfazer o gradiente através do complexo sintetizador de ATP, a *ATP sintase* (Figura 3.17).

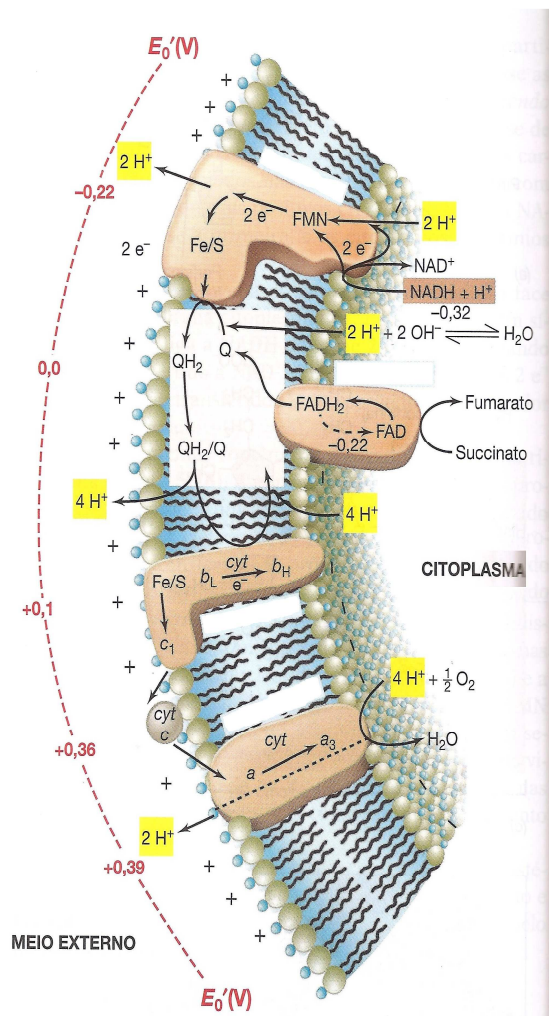


Figura 3.16. Esquema geral de uma cadeia de transporte de elétrons bacteriana localizada na membrana plasmática, evidenciando o transporte de elétrons e o bombeamento de prótons. O exterior da membrana fica com maior concentração de prótons e o gradiente elétrico forma-se na membrana.

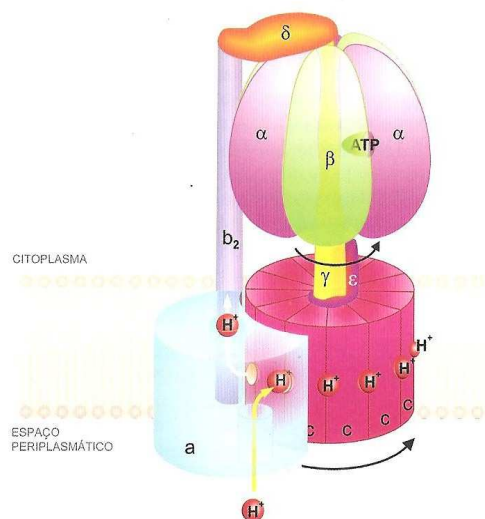


Figura 3.17. Modelo de ATP sintase de *Escherichia coli*.

O exato mecanismo do bombeamento de prótons ainda é objeto de controvérsia. Uma possibilidade consistente é baseada no fato de alguns transportadores de elétrons, ao serem reduzidos, captarem prótons do citoplasma e, ao transferirem elétrons para o composto seguinte da cadeia, liberarem prótons fora da membrana. Esta alternativa só se aplica às transferências de elétrons associadas à captação/expulsão de prótons. Nos casos em que isto não ocorre, ou seja, há transferência apenas de elétrons, o bombeamento de prótons é explicado pela diferença de conformação dos transportadores nos estados oxidado e reduzido. Estas diferenças de conformação provocariam alteração no valor de pKa de alguns grupos ionizáveis da cadeia lateral de aminoácidos, que ficariam expostos na face externa da membrana, liberando prótons para o exterior.

3.3 - Obtenção de NADPH

Há duas vias metabólicas heterotróficas capazes de promover a redução de NADP^+ , gerando NADPH: a via das pentoses e via de Entner-Doudoroff. Além disso, a reação catalisada pela isocitrato desidrogenase (do ciclo de Krebs ou do ramo oxidativo) bacteriana também pode originar NADPH.

B - METABOLISMO AUTOTRÓFICO

Microrganismos autotróficos são aqueles capazes utilizar CO_2 como **única** fonte de carbono. Como a fonte de carbono está totalmente oxidada, energia e poder redutor devem ser providos pela luz ou pela oxidação de compostos inorgânicos.

3.1 Obtenção de ATP

3.1.1. Obtenção de ATP por oxidação de compostos inorgânicos

As bactérias podem obter ATP pela oxidação de compostos inorgânicos exógenos, incluindo monóxido de carbono, hidrogênio, compostos reduzidos de enxofre e de nitrogênio, e íons bivalentes, como Fe^{2+} e Mn^{2+} . Os microrganismos com este tipo de metabolismo são denominados *quimiolitotróficos*. Para que as oxidações ocorram, a célula apresenta uma cadeia de transporte de elétrons cujo acceptor final é o oxigênio

(aeróbios), nitrato, nitrito, sulfato ou bicarbonato (anaeróbios). A Tabela 3.4 apresenta as reações globais realizadas por quimiolitotróficos dos diferentes grupos citados.

Tabela 3.4. Bactérias quimiolitotróficas, respectivos substratos e valor do $\Delta G^{0'}$ da reação de oxidação

Bactéria	Reação	$\Delta G^{0'}$ (mV/mol)
<i>Nitrosomonas europaea</i>	$2 \text{NH}_4^+ + 3 \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_2^- + 2 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{H}^+$	-551,2
<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	$2 \text{NO}_2^- + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{NO}_3^-$	-74,3
<i>Cupriavidus necator</i>	$2 \text{H}_2 + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$	-472,5
<i>Pseudomonas carboxydovorans</i>	$2 \text{CO} + \text{O}_2 \rightarrow 2 \text{CO}_2$	-504,9
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	$2 \text{S}^0 + 3 \text{O}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{SO}_4^{2-} + 4 \text{H}^+$	-588,2
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	$4 \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2 + 4 \text{H}^+ \rightarrow 4 \text{Fe}^{3+} + 2 \text{H}_2\text{O}$	-17,7
<i>Leptothrix</i> spp.	$2 \text{Mn}^{2+} + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{MnO}_2 + 4 \text{H}^+$	-77,6
<i>Paracoccus denitrificans</i>	$5 \text{H}_2 + 2 \text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow 6 \text{H}_2\text{O} + \text{N}_2$	-958,8
<i>Desulfobivrio desulfuricans</i>	$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{S} + 4 \text{H}_2\text{O}$	-154,4
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$	-138,6

Como uma adaptação para a utilização de grande variedade de substratos, com valores diferentes de potenciais de redução, as cadeias de transporte de elétrons dos organismos quimiolitotróficos têm composição muito variada. A cadeia de transporte de elétrons de bactérias que oxida H_2 (quimiolitotrófica), por exemplo, tem aproximadamente a mesma organização e funcionamento da cadeia de transporte de elétrons de *E. coli* (quimiorganotrófica) em aerobiose, ou de mamíferos, porque os doadores de elétrons (H_2 e NADH) têm potencial de redução semelhante e mesmo acceptor final (O_2) (Tabela 3.3). Nestes casos, a variação de energia livre entre doador e acceptor de elétrons é similar. Em bactérias pertencentes ao gênero *Acidithiobacillus*, a cadeia de transporte de elétrons pode ser acionada a partir de diferentes transportadores, dependendo da forma de enxofre utilizado como substrato, resultando em diferentes rendimentos energéticos. Em *Nitrobacter*, a cadeia de transporte de elétrons é formada por poucos componentes, uma vez que o alto potencial de redução do doador inicial de elétrons, o nitrito, impõe a transferência de elétrons diretamente para um citocromo (Figura 3.18). Uma consequência importante da pequena diferença dos potenciais de redução entre o doador inicial e o acceptor final de elétrons é a pequena variação de energia livre associada à transferência de elétrons (Tabela 3.4) e, portanto, a pequena produção de ATP em relação ao total de substrato oxidado. Devido ao baixo rendimento

em ATP, uma grande quantidade do substrato deve ser oxidado e o crescimento destas bactérias é lento.

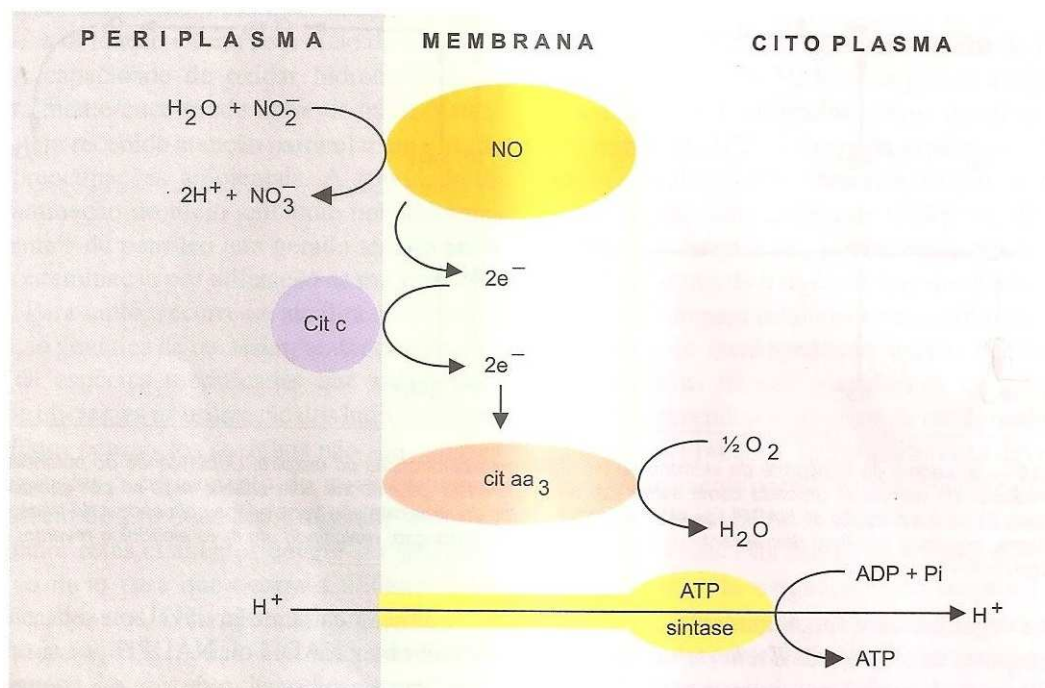


Figura 3.18. Cadeia de transporte de elétrons produtora de ATP em *Nitrobacter*.

3.1.2 Obtenção de ATP por fotofosforilação

Um processo biológico fundamental, do qual todos os outros dependem, é a fotossíntese, que consiste na transformação da energia luminosa em energia química. Os organismos atuais capazes de realizá-la são alguns grupos de bactérias, as algas e as plantas. Os outros seres vivos usam a energia química contida em compostos direta ou indiretamente derivados da fotossíntese; portanto, em última análise, toda a energia consumida pelos sistemas biológicos provém originalmente da energia solar.

Fotofosforilação é o processo de obtenção de ATP a partir da energia luminosa. Neste processo, a energia luminosa é captada por pigmentos especiais e transferida a outros pigmentos capazes de emitir elétrons. O elétron emitido é captado por um aceptor e transferido por uma cadeia de transporte de elétrons até um receptor final. As transferências de elétrons estão associadas à formação de um gradiente de prótons que permite a síntese de ATP a partir de ADP e fosfato. Dependendo do aceptor final, o tipo de fotossíntese é cíclico ou não cíclico.

Os pigmentos e as estruturas que os contêm variam com as espécies

A fotossíntese das bactérias não segue um padrão, apresentando grandes variações quanto à forma e aos componentes que dela participam. O processo é caracterizado pela participação de pigmentos fotossensíveis: *clorofila a* e *feofitinas*, encontradas apenas nas cianobactérias e *bacterioclorofilas* e *bacteriofeofitinas*, encontradas nas bactérias (Figura 3.19). Existem diferentes tipos de bacterioclorofilas, que se caracterizam por apresentar picos de absorção luminosa em comprimentos de onda; a presença de diferentes pigmentos aumenta a amplitude do espectro luminoso aproveitado e contribui para a distribuição destes organismos por diferentes ambientes.

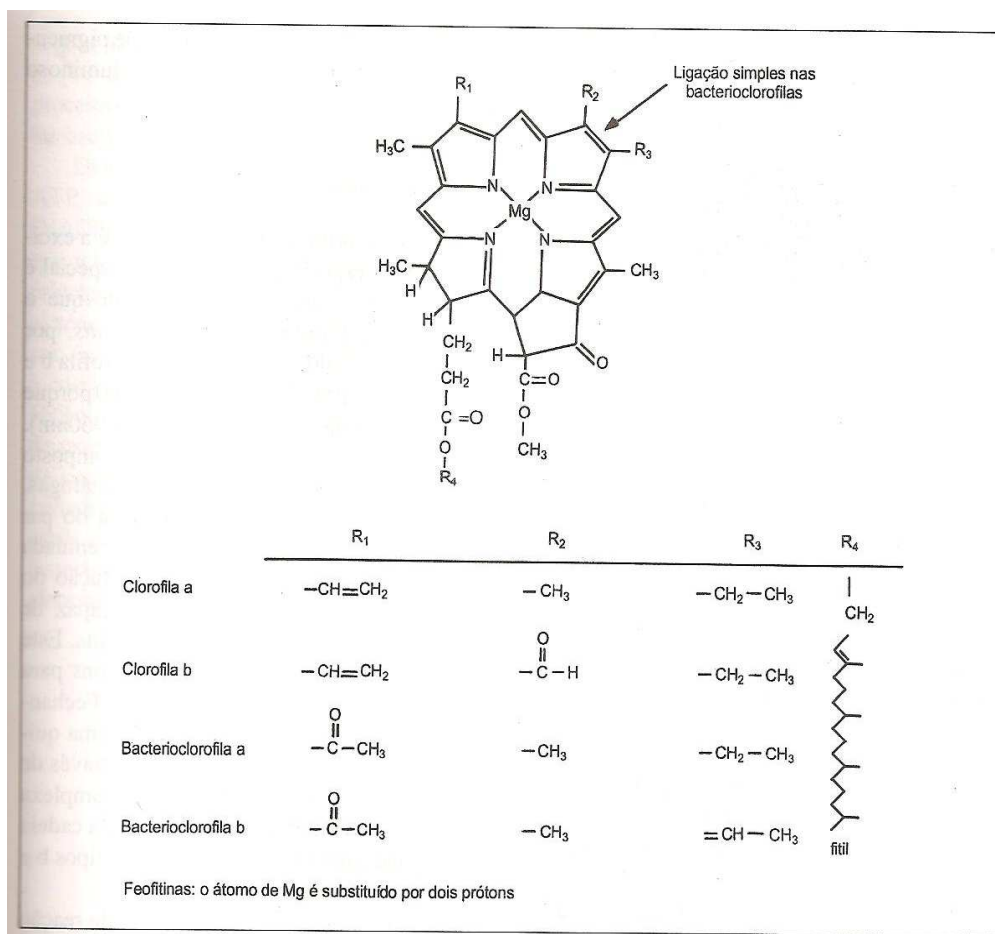


Figura 3.19. Estruturas das clorofilas, bacterioclorofilas, feofitinas e bacteriofeofitinas. O longo e hidrofóbico radical fitil, presente em todas estas moléculas, possivelmente auxilia a solubilidade em meio apolar.

As estruturas que contêm os pigmentos fotossensíveis também variam nos diferentes grupos bacterianos, sendo diferentes da organela correspondente das plantas

superiores, os cloroplastos. Nas bactérias púrpuras, o aparelho fotoquímico está localizado em invaginações da membrana citoplasmática, formando túbulos. Nas bactérias verdes, há vesículas envoltas por uma monocamada membranosa, chamadas *clorossomos*, que se justapõem às membranas. Os clorossomos abrigam bacterioclorofila *c*, *d* e *e*, estando a cadeia de transporte de elétrons e bacterioclorofila a localizadas na membrana plasmática. Nas cianobactérias, o sistema fotossintetizante é mais complexo, formado por lamelas membranosas, dispostas em várias camadas, os *tilacoides*, semelhantes aos dos cloroplastos.

Nos centros de reações há emissão de elétrons

O mecanismo de conversão de luz em energia química envolve moléculas capazes de absorver energia luminosa. A absorção de um quantum de energia luminosa por uma molécula sensível à luz eleva um elétron a um nível de energia maior. A energia inerente na molécula excitada pode seguir quatro destinos diferentes: ser dissipada na forma de calor; levar à emissão de luz; transferir a excitação para outra molécula e emitir o elétron, reduzindo outro composto (Figura 3.20).

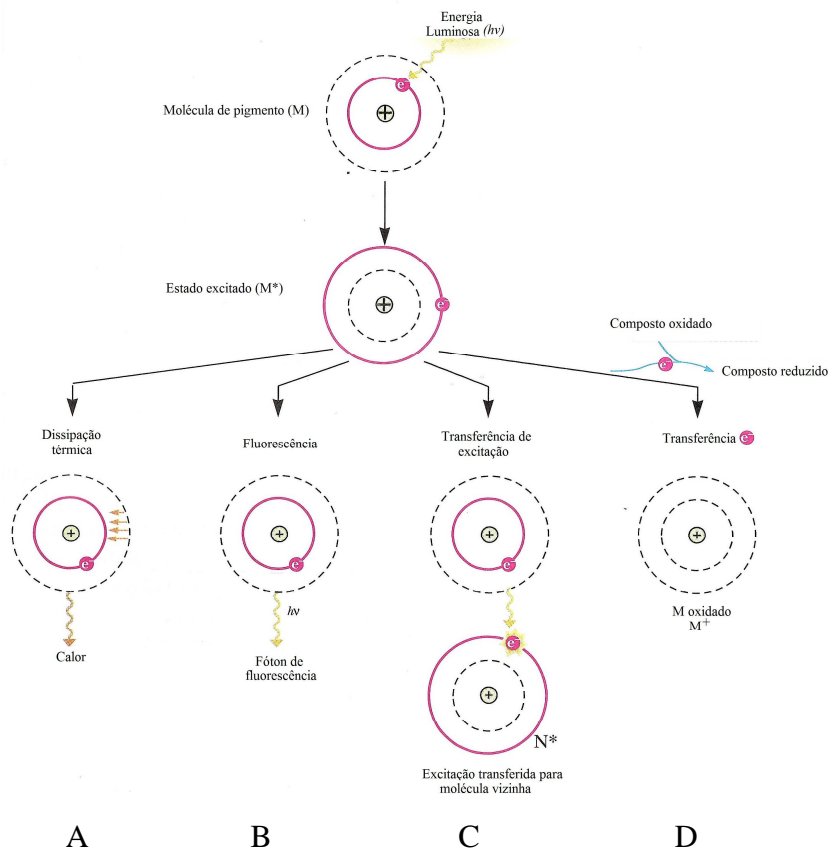


Figura 3.20 – Formas de dissipação de energia de um composto excitado para a volta ao estado fundamental.

Os pigmentos fotossintéticos são divididos em duas categorias: *pigmentos captadores de luz* (carotenoides, ficobilinas e bacterioclorofilas) e *pigmentos do centro de reação* (bacterioclorofilas). Os pigmentos captadores de luz, *pigmentos acessórios* ou *pigmentos antena*, constituem a maioria dos pigmentos fotossintéticos. Desempenham um papel crítico na fotossíntese porque são capazes de absorver luz em diferentes comprimentos de onda. A energia por eles absorvida é transferida de uma molécula para outra, até o centro de reação, onde excitam moléculas de bacterioclorofila (Figura 3.20C) chamadas *par especial*. Estas moléculas têm a propriedade especial de emitir elétrons (Figura 3.20D). A natureza dos pigmentos captadores de luz varia conforme o microrganismo, mas todos absorvem luz em comprimentos de onda diferentes da bacterioclorofila do centro de reação e, por apresentarem amplos limites de absorção, tornam o processo mais eficiente.

3.1.2.1 Fotossíntese cíclica

Na fotofosforilação cíclica (Figura 3.21), os elétrons emitidos pelo centro de reação a ele retornam depois de percorrer uma cadeia de transportadores de elétrons.

As bactérias púrpuras do enxofre, um tipo de bactéria fotossintetizante anaeróbia, apresentam uma bacterioclorofila com o pico de absorção da luz no comprimento de onda de 870 nm. Os pigmentos acessórios absorvem energia e transferem a excitação para o par especial, a bacterioclorofila P₈₇₀, localizada no centro de reação. Esta bacterioclorofila, quando excitada, passa a apresentar um potencial de redução muito baixo, capaz de emitir um elétron. A emissão do elétron eleva o potencial de redução, convertendo a bacterioclorofila em forte oxidante. O elétron emitido é captado por uma bacteriofeofitina e segue para duas ubiquinonas no centro de reação. Uma das ubiquinonas reduzidas capta prótons. As quinonas são hidrofóbicas, podem se movimentar pela membrana e transferem elétrons para o citocromo *bc₁*. Este citocromo transfere os elétrons para o citocromo *c₂* que os devolve para a bacterioclorofila P₈₇₀, fechando o ciclo. No nível do citocromo *bc₁*, há translocação de prótons para o exterior da célula, gerando um gradiente de prótons. A presença da ATP sintase na membrana torna possível a síntese de ATP, a partir de ADP e fosfato, com o retorno dos prótons ao interior da célula. Como não há despreendimento de oxigênio, este tipo de fotossíntese é chamada *não oxigênica*, ou *anoxigênica*, que tem por finalidade a formação de ATP.

3.1.2.2 Fotossíntese não cíclica

A fotossíntese de cianobactérias, semelhante à das algas e das plantas verdes, é chamada *fotossíntese não cíclica* porque os elétrons emitidos pelo centro de reação têm trajetória linear (Figura 3.22) e não retornam ao composto de origem.

A fotossíntese não cíclica diferencia-se da cíclica por

- desenvolver-se nos tilacoides.
- ter a participação de dois fotossistemas.
- levar à redução de NADP^+ , além da formação de ATP.
- acumular prótons no interior dos tilacoides.
- envolver *ficobilissomas*, que são arranjos formados por ficobiliproteínas ancoradas à membrana do tilacoide, constituindo o sistema antena das cianobactérias
- apresentar clorofilas diferentes, que absorvem em comprimentos de onda distintos

A fotofosforilação não cíclica inicia-se pela absorção de luz pelos ficobilissomas que transferem energia ao fotossistema II. O fluxo de elétrons envolve duas reações fotoquímicas interligadas, que ocorrem nos fotossistemas I e II (Figuras 3.21 A e B). O fotossistema I é também designado P_{700} , porque absorve comprimento de onda de 700 nm e, por razões análogas, o fotossistema II é chamado P_{680} . Os fotossistemas também diferem quanto aos valores dos seus potenciais de redução: + 0,5 e + 1,0 volts, para P_{700} e P_{680} , respectivamente. A diminuição do potencial de redução do fotossistema II (P_{680}) possibilita a transferência de um elétron da clorofila *a* para a feofitina. O elétron é, a seguir, transferido por uma cadeia que inclui plastoquinonas, citocromos, proteínas ferro-enxofre, complexo citocromos *b-f* e plastocianina, chegando finalmente ao fotossistema I (P_{700}). Ao longo destas passagens há bombeamento de prótons. O elétron emitido por P_{680} é repostado por elétrons originados da água: uma proteína contendo manganês é capaz de cindir a molécula de água, retirando-lhe elétrons que são transferidos para P_{680} . Os prótons são bombeados para o interior dos tilacoides, promovendo a formação de um gradiente de prótons que, igualmente à fotofosforilação cíclica e ao transporte de elétrons na respiração, promove a síntese de ATP. O oxigênio da molécula de água é liberado como O_2 e, por isto, este tipo de fotossíntese é chamada *oxigênica*.

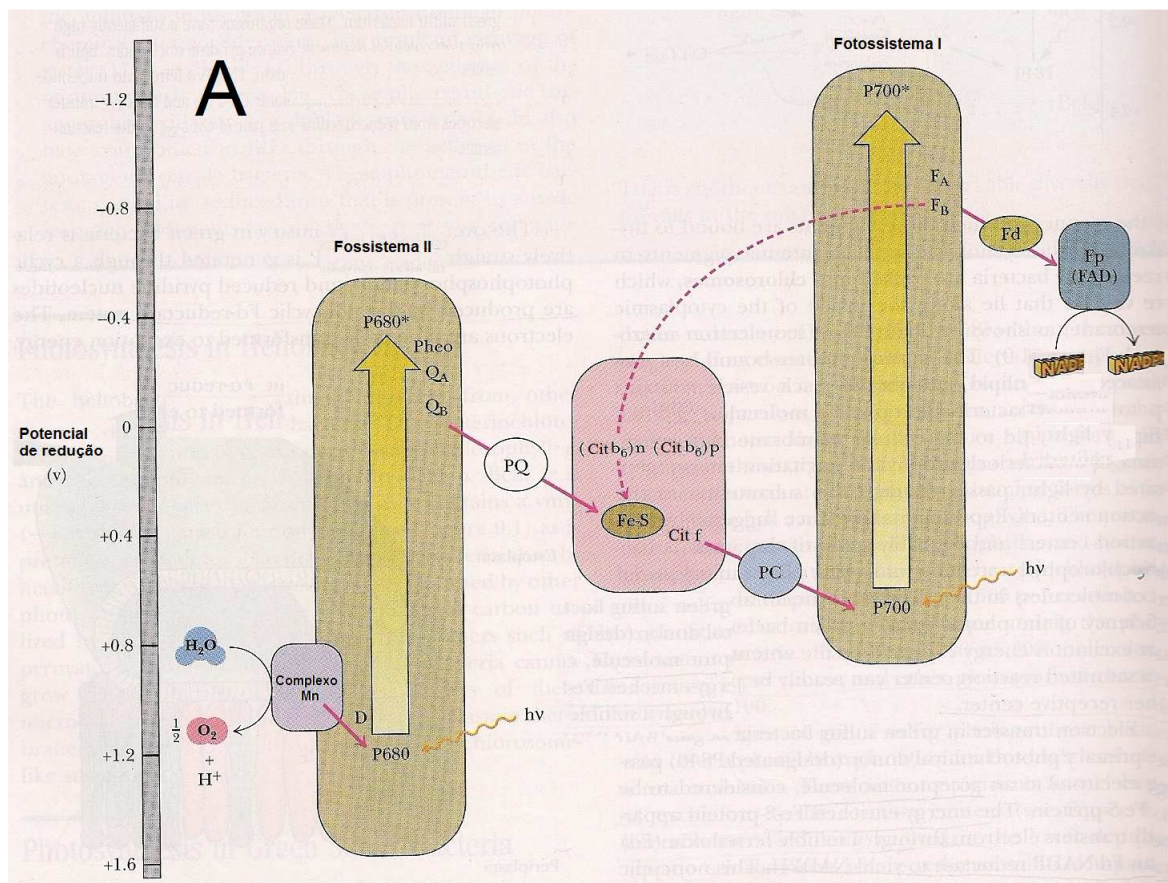


Figura 3.22. Fotossíntese não cíclica. A. Esquema de transferência de elétrons considerando os potenciais de redução. B. Disposição na membrana plasmática de componentes da cadeia de transporte de elétrons.

Concomitantemente, a excitação luminosa do centro de reação do fotossistema I (P_{700}) também provoca a emissão de elétron, captado por outra molécula de clorofila *a* e,

a seguir, transferido por quinonas e proteínas ferro-enxofre para a ferredoxina. Pela ação da ferredoxina:NADP⁺ oxidoredutase, é feita a transferência final para o NADP⁺, gerando NADPH. O resultado líquido da fotofosforilação não cíclica é, portanto, a produção de ATP, NADPH e O₂.

Uma alternativa para os elétrons emitidos por P₇₀₀ é retornar ao P₇₀₀, via complexo *b-f*, em vez de serem dirigidos ao NADP⁺. Neste caso, não se produz NADPH mas gera-se ATP, pois, no nível do complexo *b-f* são bombeados prótons. Controlando o fluxo de elétrons em cada uma das vias, a célula pode balancear as produções de ATP e NADPH, coenzimas que são utilizadas na chamada *fase escura* da fotossíntese. Esta fase é composta de reações que se processam independentemente do estímulo luminoso e consistem, em última análise, na incorporação de CO₂ em compostos orgânicos levando à síntese dos 13 precursores e demais moléculas necessárias.

3.2 Obtenção de NADPH

Assim como as bactérias heterotróficas, as autotróficas necessitam ATP e NADPH para as biossínteses. Adicionalmente, também dependem dessas coenzimas para promover a redução do CO₂ a compostos orgânicos, processo denominado *fixação de CO₂*. Organismos autotróficos estritos suprem esta necessidade a partir de uma fonte de elétrons independente da fonte de carbono. Isto torna estes microrganismos capazes de sintetizar matéria orgânica, utilizando-se exclusivamente de matéria inorgânica, energia e de NADPH. Os procaríotos autotróficos que realizam fotossíntese cíclica e os quimiolitotróficos obtêm poder redutor, o NADPH, por redução de NADP⁺ envolvendo uma cadeia de transporte de elétrons reversa.

A cadeia de transporte de elétrons reversa promove a redução de NADP⁺

No metabolismo quimiolitotrófico autotrófico, o mesmo substrato reduzido é doador de elétrons para produção de ATP e para a redução de NADP⁺. Não existem outros substratos para exercer esta função. Como o doador de elétrons é exógeno, a enzima que o oxida está localizada na membrana celular e faz parte da cadeia de transporte de elétrons. Os elétrons têm dois destinos: seguem a via termodinamicamente favorável, sendo recebidos por componentes da cadeia com maior potencial de redução, produzindo um gradiente de prótons e formando ATP ou são transferidos para

componentes da cadeia de transporte de elétrons com menor potencial de redução até o NADP^+ . Os compostos inorgânicos levam à liberação de elétrons para intermediários da cadeia de transporte de elétrons com potencial de redução superior ao do $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (Figura 3.23).

Em bactérias que oxidam compostos de enxofre, os elétrons deles derivados são liberados no nível dos citocromos, em razão dos valores de seus potenciais de redução. A redução do NADP^+ processa-se por um mecanismo que requer energia, porque os elétrons fluem no sentido dos menores potenciais de redução padrão. Esse mecanismo é conhecido como *cadeia de transporte de elétrons reversa* (Figura 3.22). Para exemplificar: os elétrons derivados do tiosulfato seguem dois sentidos. O primeiro, no sentido termodinamicamente favorável da cadeia de transporte de elétrons, gera força próton motriz, e o segundo no sentido contrário, gera coenzimas reduzidas. O fluxo reverso de elétrons, por processar-se no sentido dos *menores* potenciais de redução, demanda energia. A explicação para o fluxo reverso baseia-se no fato de algumas das reações redox na cadeia de transporte de elétrons estarem em equilíbrio com a força próton motriz. Assim como o transporte de elétrons no sentido termodinamicamente favorável leva à formação do gradiente de prótons, a força próton motriz pode ser utilizada para promover o fluxo dos elétrons no sentido dos menores potenciais de redução. Uma evidência experimental para este fato é a inibição da cadeia de transporte de elétrons reversa provocada por ionóforos, que provocam o colapso do gradiente de prótons.

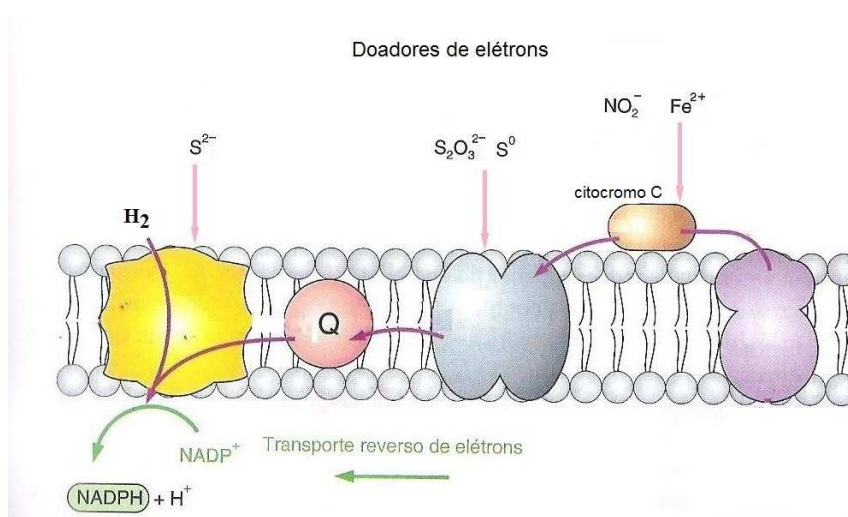


Figura 3.23. Redução de NADP pela Cadeia de transporte de elétrons reversa

No caso das bactérias fotossintéticas púrpuras do enxofre, assim como em outras bactérias que fazem fotossíntese anoxigênica, a redução das coenzimas é obtida à custa

de compostos externos reduzidos, como H₂S ou compostos orgânicos. O mecanismo é similar ao descrito para bactérias quimioautotróficas, ou seja, transporte eletrônico reverso, no qual o NADP⁺ é o aceptor final dos elétrons.

3.1.3 Obtenção dos 13 precursores

Embora haja diferentes vias metabólicas bacterianas que promovem a fixação biológica do CO₂ (incorporação do CO₂ em moléculas orgânicas), este texto se restringe a analisar o ciclo de Calvin-Benson, a via de fixação mais frequente.

3.1.3.1 Ciclo de Calvin-Benson.

Como a única fonte de carbono dos autótrofos é o CO₂, molécula totalmente oxidada, para sua redução, as células devem investir ATP e NADPH, produzidos pelas vias apropriadas de processos fotossintéticos ou quimiossintéticos litotróficos. Neste caso, a obtenção dos 13 precursores ocorre no sentido oposto ao dos heterotróficos nos quais a oxidação do substrato orgânico garante a produção de ATP e de NADPH.

Para a fixação do CO₂ há necessidade de duas enzimas chave: a *ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco)* e a *fosforribuloquinase*. A primeira é tida como a enzima mais abundante da biosfera, ausente de células animais. Outras reações do ciclo são catalisadas por enzimas que participam de outras vias metabólicas. O ciclo de Calvin-Benson é encontrado em Archaea, cianobactérias, bactérias púrpuras, na maioria das bactérias quimiolitotróficas e plantas superiores. A primeira reação do ciclo (Figura 3.24), catalisada pela rubisco constitui a etapa fundamental da incorporação do CO₂ em uma molécula orgânica. Nesta reação, uma molécula de CO₂ é ligada à ribulose 1,5-bisfosfato e gera um composto muito instável que rapidamente é convertido em duas moléculas de 3-fosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica. A fosforilação do 3-fosfoglicerato, à custa de ATP, produz 1,3-bisfosfoglicerato; em seguida, sua redução a gliceraldeído 3-fosfato, é a mesma reação que ocorre na gliconeogênese, entretanto, com o gasto de NADPH. Parte das moléculas de gliceraldeído 3-fosfato é convertida em di-hidroxiacetona fosfato, que se combina com gliceraldeído 3-fosfato formando frutose 1,6-bisfosfato. Esta é convertida em frutose 6-fosfato, que pode ser isomerizada a glicose 6-fosfato. Até este ponto, ocorreram os eventos principais do processo: a incorporação do

CO₂ e o gasto de ATP e de coenzimas reduzidas. O destino metabólico do CO₂ incorporado varia muito e a formação de glicose é apenas uma das alternativas.

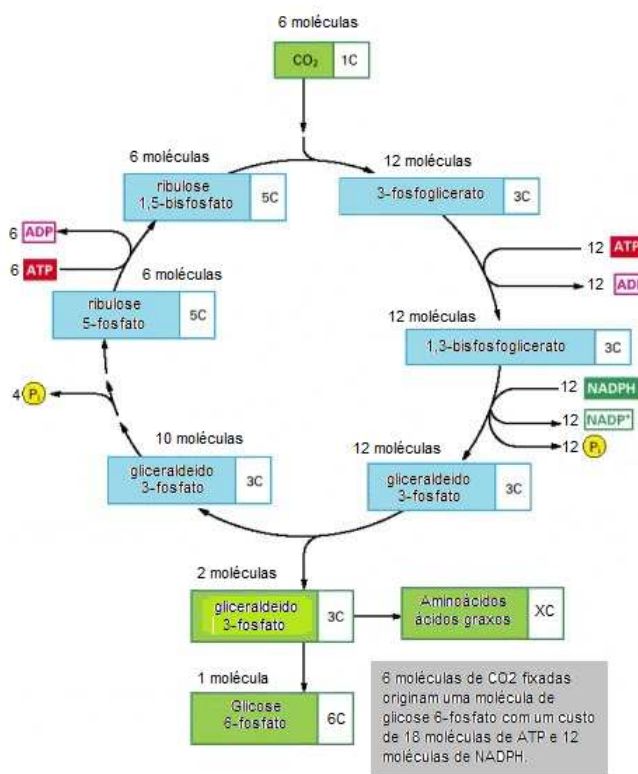


Figura 3.24. Fixação de CO₂ pelo Ciclo de Calvin

As reações seguintes são semelhantes a algumas da via das pentoses, levando à formação de ribulose 1,5-bisfosfato, que permite o reinício do ciclo.

A equação geral do ciclo de Calvin-Benson é:



Se o ciclo for iniciado com 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato e 6 moléculas de CO₂, haverá produção líquida de uma molécula de glicose 6-fosfato e a regeneração das 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato. Para efetuar estas conversões há gasto de 18 ATP e 12 NADPH, o que corresponde ao dispêndio energético para a síntese de uma molécula de glicose.

Em bactérias, o Ciclo de Calvin-Benson supre os seguintes precursores de biossíntese: **ribose 5-fosfato**, **sedoheptulose 7-fosfato**, **eritrose 4-fosfato**, **3-fosfoglicerato**, **gliceraldeído 3-fosfato**, **frutose 6-fosfato** e a **glicose 6-fosfato**.

Como nesta via formam-se apenas 7 dos 13 precursores necessários para a biossíntese dos constituintes celulares, é impossível à célula multiplicar-se utilizando apenas o ciclo de Calvin-Benson. O **fosfoenolpiruvato** e o **piruvato** poderão ser sintetizados a partir de 3-fosfoglicerato em reações semelhantes às encontradas na via glicolítica. Em seguida, **acetil-CoA** seria formada a partir de piruvato por ação do complexo piruvato desidrogenase ou pela piruvato-formiato liase. Finalmente, os demais precursores podem ser obtidos nos ramos oxidativo e redutor, uma vez que o propósito, neste caso, é apenas biossintético e não tem por finalidade obter energia.

C - ESTRATÉGIAS DE SOBREVIVÊNCIA

Até este ponto, foram descritas neste capítulo as potencialidades dos microrganismos, observadas nos dias atuais, em obter energia (ATP), precursores de esqueleto carbônico para biossíntese de constituintes celulares e poder redutor (NADPH). As vias aqui apresentadas são utilizadas conforme o microrganismo. Para a compreensão da diversificação de estratégias metabólicas empregadas, deve-se considerar principalmente o meio ambiente no qual vivem as distintas bactérias.

Para especular sobre a evolução que proporcionou os diferentes tipos metabólicos bacterianos, deve-se considerar o início da vida, as condições então prevalentes e suas alterações bruscas ou gradativas ao longo do tempo. Grande parte desta análise, embora especulativa, baseia-se nas formas de vida atuais e suas estratégias de sobrevivência. É impossível reconstituir o processo de diversificação metabólica ocorrido nos organismos procarióticos desde a origem da vida, mas uma abordagem que considere a evolução metabólica contribui para uma melhor compreensão do metabolismo. As estratégias metabólicas serão divididas em dois grandes períodos da evolução dos metabolismos. O primeiro corresponde à vida em anaerobiose e tratará do metabolismo nas condições supostamente mais primitivas da Terra. A sucessão de estratégias de sobrevivência que ocorreram neste período provocaram mudanças no ambiente que, por sua vez, exerceram forte pressão seletiva e profundos ajustes nas estratégias até então existentes. O marco mais importante de mudanças nas condições prevalentes no planeta Terra foi o surgimento do O₂, criando condições para o surgimento de estratégias metabólicas mais eficientes e relegando a nichos específicos aquelas pré-existentes.

3.1. A VIDA EM ANAEROBIOSE

3.1.1. Oxidação de matéria orgânica.

Os primeiros seres vivos eram anaeróbios. Acredita-se que se nutriam e metabolizavam matéria orgânica originada por processos abióticos. Esta hipótese pressupõe a disponibilidade de diferentes moléculas orgânicas já prontas para a absorção e incorporação para a síntese de macromoléculas, de modo que as células primitivas não necessitariam apresentar todas as atividades biossintéticas. Apesar de ainda existirem bactérias com estas características, há, em contraposição, bactérias capazes de crescer em meios de cultura compostos apenas de sais minerais e uma única fonte orgânica de carbono e energia (como a glicose). Estas células são, portanto, capazes de sintetizar todos os constituintes celulares a partir de um único tipo de molécula orgânica.

Dois processos metabólicos atuais são baseados na oxidação anaeróbia de compostos orgânicos: *fermentação* e *respiração anaeróbia*.

3.1.1.1 Fermentações de açúcares

Supõe-se que os primeiros organismos eram heterotróficos e apresentavam uma estrutura celular simples, com uma membrana plasmática sem complexidade, constituída de poucas proteínas funcionais. Não deveriam existir, nestas células, os componentes de cadeia de transporte de elétrons, nem aparatos fotossintéticos, localizados nas membranas. Sem proteínas de membrana exclusivas que permitissem às células utilizar um aceptor final de elétrons exógeno, os microrganismos passaram a oxidar compostos orgânicos por um processo denominado *fermentação*. Neste tipo de metabolismo, as reações de oxirredução ocorrem no citossol e o ATP é produzido por fosforilação no nível de substrato. O NADH é oxidado por compostos produzidos pelo próprio metabolismo e as substâncias reduzidas não são utilizadas pelas células, sendo eliminadas no meio. Por esta razão, as fermentações caracterizam-se pela excreção de grandes quantidades de compostos orgânicos, como álcoois e ácidos orgânicos. A forma de reoxidar a coenzima na fermentação acarreta consequências importantes para o processo de obtenção de energia:

- a. a produção de ATP fica restrita às reações de fosforilação no nível do substrato.

b. a oxidação do substrato inicial é incompleta e os produtos finais da fermentação, excretados no meio, por serem moléculas orgânicas apenas parcialmente oxidadas, podem ser utilizadas como substrato oxidável por outros organismos.

As fermentações são denominadas de acordo com os principais produtos finais que geram. Embora os microrganismos sejam capazes de fazer diversos tipos de fermentação, alguns autores as classificam em seis grandes classes: láctica, alcoólica, butírica, ácido mista, propiônica e homoacética.

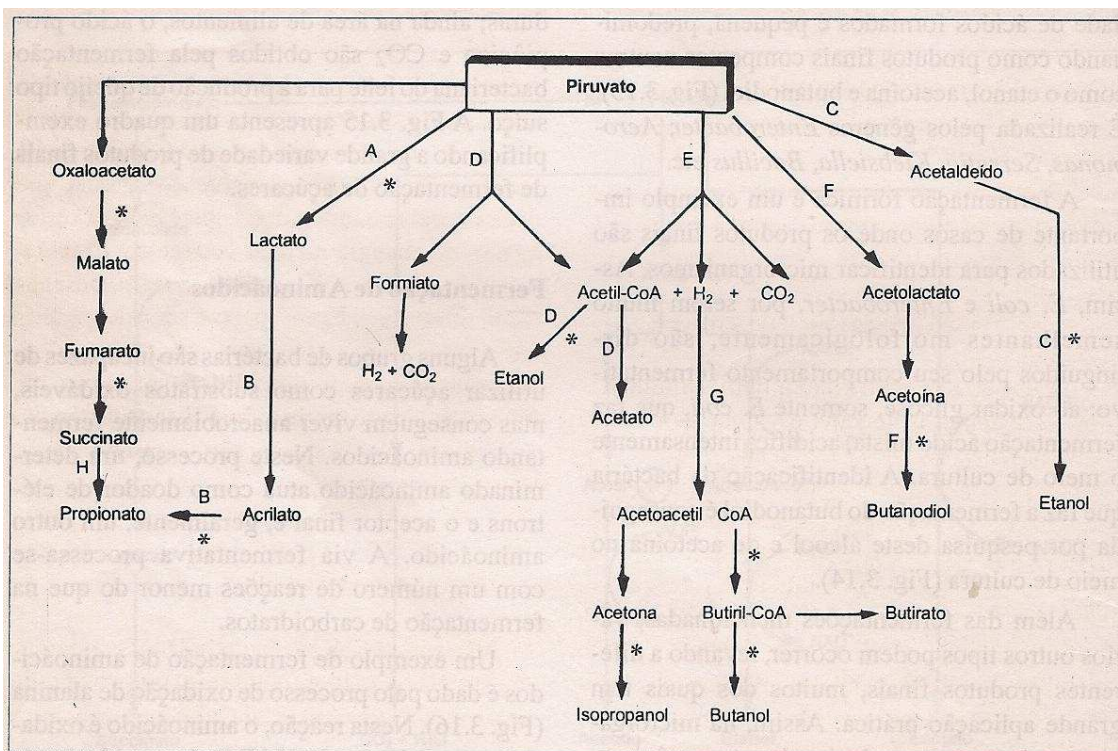


Figura 3.25 – Quadro geral das fermentações de açúcares. Os gêneros mais comuns a realizar cada um dos tipos de fermentação são *Streptococcus*, *Lactobacillus* (A), *Clostridium propionicum* (B), *Zymomonas* e leveduras (C), Enterobacteriaceae (D), Clostridia (E), *Klebsiella* e leveduras (F), Clostridia (G), bactérias do ácido propiônico (H). As reações assinaladas com asterisco são as que promovem a reoxidação de coenzimas.

A maior parte das fermentações bacterianas de açúcares tem o piruvato como intermediário chave uma vez que a oxidação do NADH ocorre por transferência de seus elétrons ao piruvato ou a substâncias dele derivadas (Figura 3.25). No caso das vias das fosfoctolases, além do piruvato é gerado acetil-fosfato. Substâncias dele derivadas serão os aceptores endógenos de elétrons. Os aceptores dos elétrons são endógenos e variáveis, gerando diversos tipos de fermentação com distintos produtos finais. O tipo de fermentação é função do meio em que a bactéria vive. Bactérias que vivem em meios capazes de tamponar o pH (como ocorre com o leite, tamponado pelas proteínas que

contém) podem fermentar com produção de ácidos apenas; bactérias que vivem em ambientes sem tamponamento apresentam um tipo de fermentação em que outros produtos não ácidos são liberados, tornando a acidificação menos intensa não inibindo o crescimento bacteriano.

Fermentação láctica

Quando o NADH produzido pela oxidação da glicose reduz o piruvato a lactato, a fermentação é chamada *láctica*. Este tipo de fermentação é encontrado em bactérias que fazem parte da microbiota da pele de animais e do trato gastrointestinal, incluindo boca e faringe. Há dois tipos de fermentação láctica, a *homoláctica* e a *heteroláctica*. Na primeira, forma-se lactato como principal produto (característica de *Lactobacillus* e *Streptococcus*), e na segunda, forma-se lactato, etanol, CO₂, acetato, etc. (*Leuconostoc* e *Bifidobacterium*) (Figura 3.25 A).

Bactérias homo e heteroláticas podem ser distinguidas por usar ou não a via da fosfoctolase. As homoláticas metabolizam carboidratos pela via de Embden-Meyerhof-Parnas. Os dois mols de piruvato geram lactato ou são utilizados como precursores de biossíntese. As heteroláticas produzem simultaneamente piruvato e acetilfosfato a partir da oxidação da glicose pela via da fosfoctolase. O piruvato pode ser convertido a lactato e o acetilfosfato em acetato e/ou etanol (Figura 3.7A), originando vários produtos de fermentação.

Fermentação propiônica

A fermentação de glicose ou outros substratos, formando propionato, acetato e CO₂ como principais produtos caracteriza esta fermentação (Figura 3.25). A produção de propionato pode ocorrer por duas vias diferentes: uma envolve a conversão de lactato a acrilato, que é reduzido a propionato, permitindo a oxidação de um NADH (Fig.3.25 item B); a outra é realizada a partir de succinato, que é isomerizado a metilmalonato e este descarboxilado a propionato (Figura 3.25 item H).

Fermentação fórmica

Neste processo, a via de oxidação do NADH varia dependendo do tipo de microrganismo considerado, originando diferentes produtos finais. Formiato é sempre formado, podendo ser cindido a CO_2 e H_2 . De acordo com os demais produtos finais formados, a fermentação fórmica é subdividida em *ácido mista* e do *butanodiol*.

a. *Fermentação ácido mista* - as oxidações dos NADH são obtidas em diferentes etapas:

- (1) pela redução de uma molécula de piruvato a lactato;
- (2) outra molécula de piruvato origina acetil-CoA que é reduzida a acetaldeído,
- (3) e este, novamente reduzido a etanol.

(4) e na conversão de oxaloacetato (a partir de fosfoenolpiruvato ou piruvato) a succinato. Outra possibilidade é a acetil-CoA ser fosforilada a acetilfosfato, dando origem a um ATP ao ser convertida a acetato (Figura 3.26). Fermentação deste tipo é realizada principalmente por *Escherichia coli* e pelos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Vibrio* e *Yersinia*.

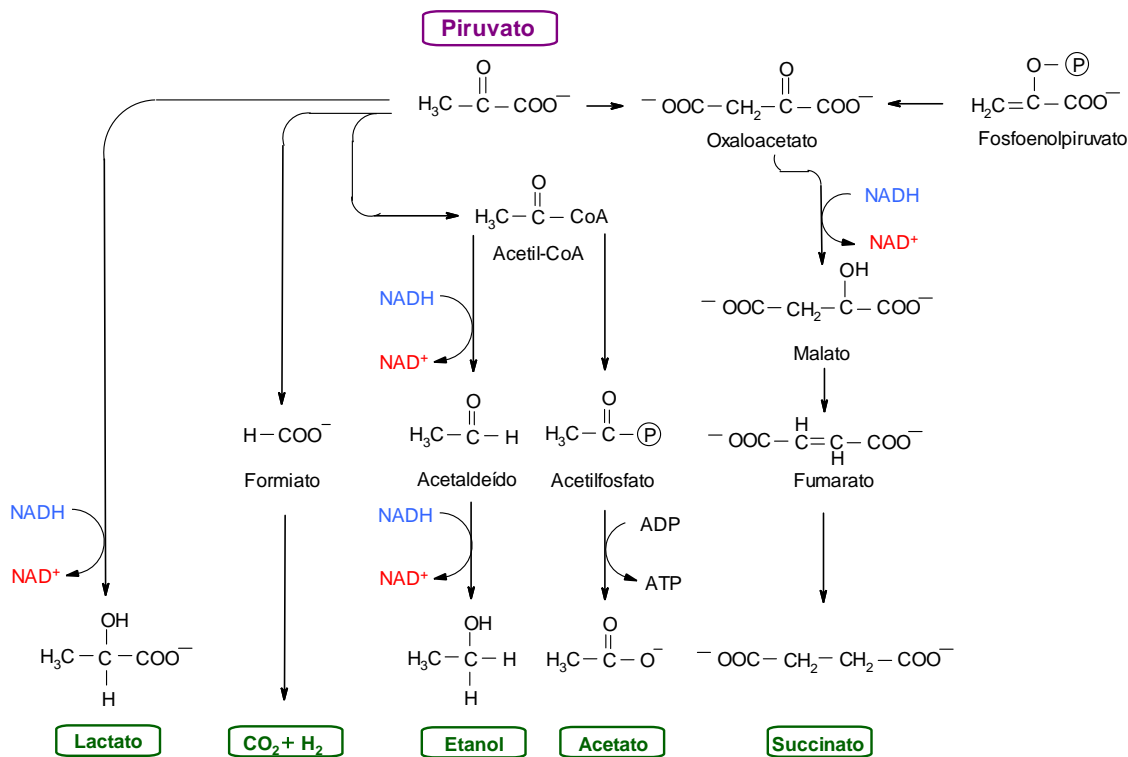


Figura 3.26 – Fermentação ácido mista. As coenzimas reduzidas são oxidadas pela conversão de piruvato a vários compostos, entre os quais os ácidos aparecem em maior concentração.

b. *Fermentação do butanodiol* - a quantidade de ácidos formados é pequena, predominando como produtos finais compostos neutros como o etanol, acetoina e butanodiol (Figura 3.27). É realizada pelos gêneros *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, etc.

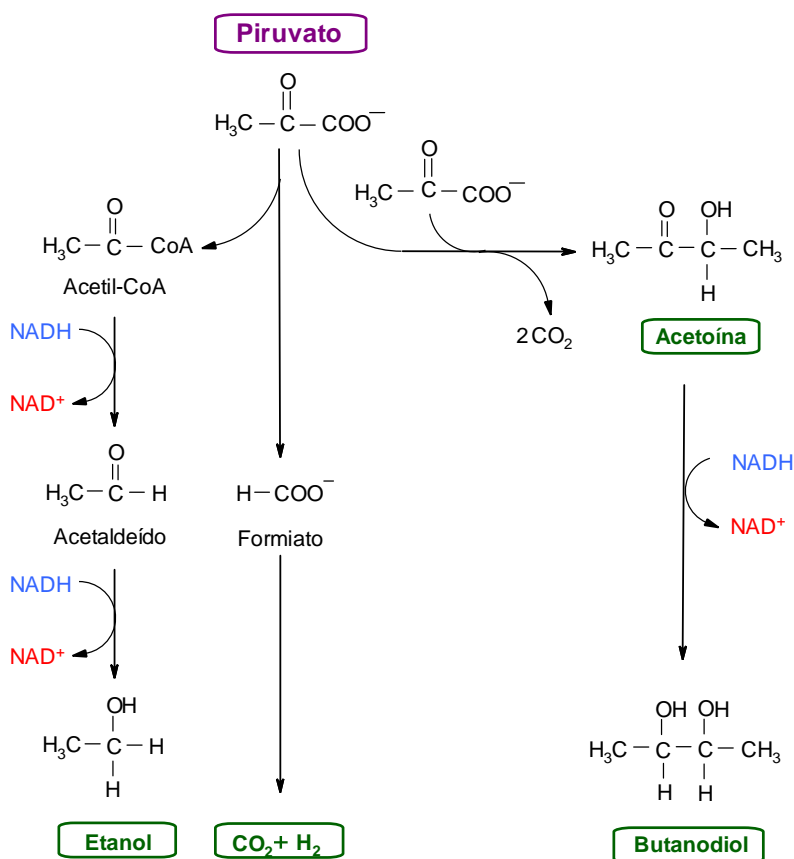


Figura 3.27 – Fermentação do butanodiol. Os produtos finais estão indicados em verde.

Fermentação alcoólica

A fermentação com formação de etanol pode ocorrer por duas vias diferentes:

(1) piruvato é descarboxilado a acetaldeído que é reduzido a etanol com a oxidação de NADH ou

(2) piruvato é convertido a acetil-CoA e formiato; acetil-CoA é reduzida a acetaldeído com a oxidação de NADH e finalmente, acetaldeído é reduzido a etanol com a oxidação de mais um NADH.

Em *Zymomonas mobilis*, a oxidação da glicose até piruvato leva à redução de dois mols de NAD^+ , que são reoxidados na formação de etanol pela primeira via mencionada (1), permitindo que este seja o único produto de fermentação (Figura 3.25).

Por outro lado, *E. coli* produz etanol utilizando a segunda via (Figura 3.26) mencionada (2). Assim, são reduzidos dois mols de NAD^+ na oxidação da glicose a piruvato, mas são necessários dois mols de NADH para formação de etanol a partir de cada mol de acetil-CoA. *E. coli* necessitará formar outros produtos de fermentação para ajustar o balanço de coenzimas reduzidas/oxidadas, como foi visto acima (fermentação ácido mista).

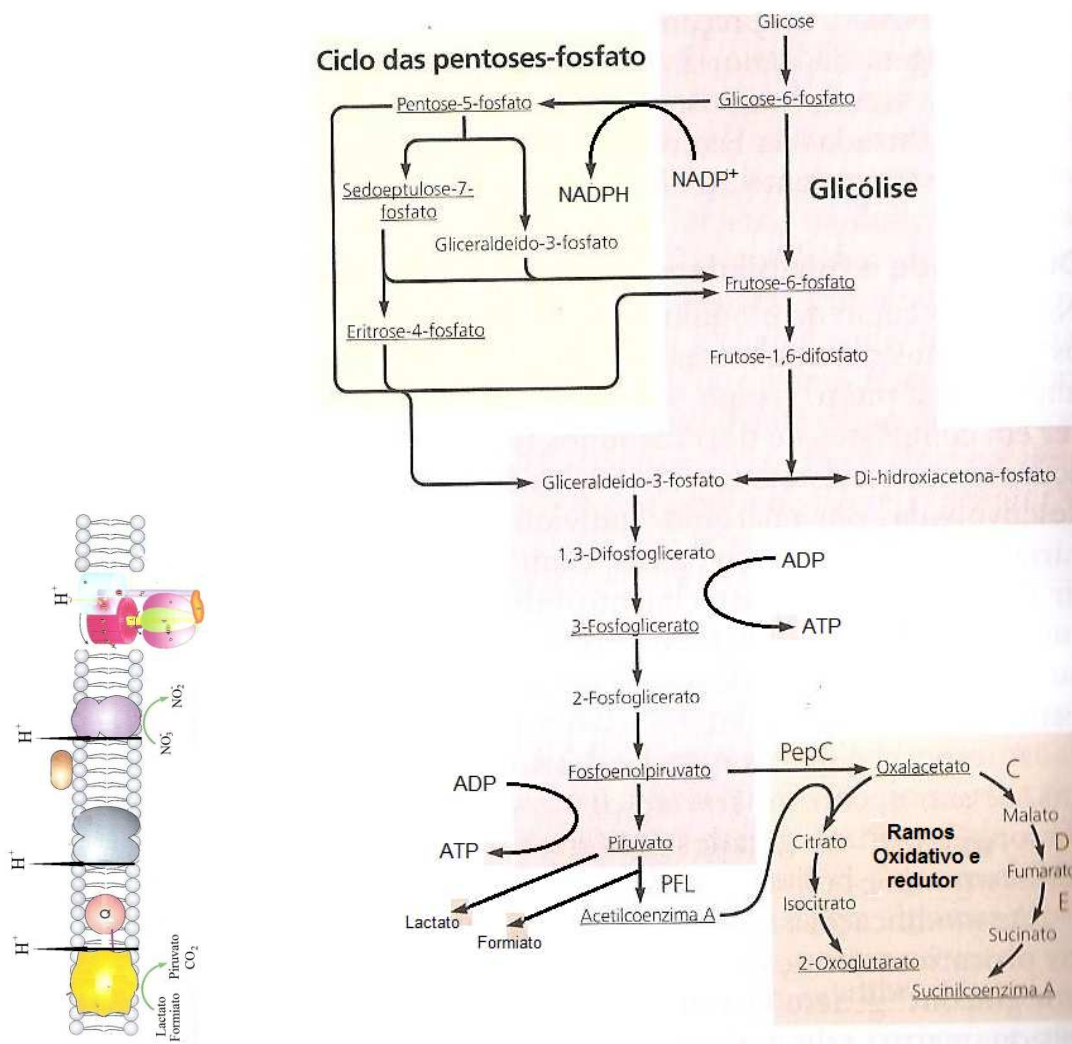


Figura 3.28 Esquema geral de fermentação (ou respiração anaeróbia).

Ao analisar a fermentação como uma estratégia de sobrevivência deve-se considerar que, além de ser um mecanismo de reoxidação de coenzimas e síntese de ATP, ela também supre as necessidades de obtenção de poder redutor e dos 13 precursores de biossínteses. Para analisar esta questão, considere-se uma das situações mais simples, ou seja, uma bactéria que oxida glicose pela via de Embden-Meyerhof-Parnas e que gera lactato como único produto de fermentação. Como pode ser verificado na Figura 3.28, nesta bactéria, o ATP é gerado apenas por fosforilação no nível de substrato. Os 13 precursores serão obtidos em pelo menos três vias metabólicas: Embden-Meyerhof-

Parnas, via das pentoses e ramos oxidativo e redutor. O NADP^+ é reduzido principalmente na via das pentoses, embora possa ser obtido em parte pela ação da isocitrato desidrogenase.

BOX 1

As fermentações de açúcares geram produtos de interesse para o homem

Nas bactérias, além das fermentações já mencionadas, vários outros tipos podem ocorrer, levando a diferentes produtos finais, muitos dos quais têm grande aplicação prática. Há microrganismos capazes de produzir solventes orgânicos, como acetona, butanol e isopropanol. Deve-se ainda lembrar a extensa utilização, em panificação, da produção fermentativa de CO_2 por leveduras. Ainda na área de alimentos, *Propionibacterium* é utilizada na fermentação destinada à produção do queijo suíço, cujo sabor característico se deve ao propionato formado e os “buracos” internos, à formação de CO_2 . O ácido propiônico pode ser usado como conservante de alimentos, como o pão, inibindo o crescimento de fungos e de algumas bactérias. Outros usos do ácido propiônico incluem sua aplicação como intermediário químico na síntese de herbicidas, perfumes e produtos farmacêuticos.

O etanol produzido por fermentação tem grande emprego no Brasil como combustível. Para a produção industrial deste álcool, é utilizada a fermentação de melão de cana de açúcar por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). A fermentação alcoólica de extratos de malte e de macerados de uvas e de vários outros frutos é utilizada há muitos séculos para o preparo de diferentes bebidas alcoólicas.

A fermentação láctica tem grande emprego industrial na área de alimentos: leite e vegetais podem ser fermentados para a produção de coalhada, iogurte, pickles, etc. O ácido láctico purificado é utilizado como acidulante de alimentos enlatados ou como conservante de couros, tecidos, etc. Lactatos de cálcio e ferro são empregados como medicamentos em caso de carência destes cátions. O lactato é também o monômero para produção de polilactato, um polímero com diversas aplicações como termoplástico.

BOX2**A fermentação provoca a cárie dentária**

Uma consequência grave da fermentação de açúcares, que afeta praticamente toda a população humana, é a cárie dentária. Nos diferentes estágios do processo de formação da cárie, várias combinações de bactérias, entre as quais *Streptococcus* e *Lactobacillus*, podem interagir para formação de uma placa dental. A alta atividade fermentadora bacteriana após a ingestão de carboidratos reduz o pH da cavidade oral a valores entre 5,4 e 4,4, apesar do efeito tamponante da saliva. Nestes valores de pH, ocorre significativa desmineralização do esmalte: a hidroxiapatita, seu principal constituinte, libera íons OH⁻, Ca²⁺ e PO₄³⁻, e sua estrutura é alterada. O dente perde assim a importante proteção que o esmalte constitui.

3.1.1.2 Fermentação de aminoácidos

Alguns grupos de bactérias são incapazes de utilizar açúcares como substratos oxidáveis, mas conseguem viver anaerobiamente fermentando aminoácidos. Neste processo, um determinado aminoácido atua como doador de elétrons e o acceptor final é, geralmente, outro aminoácido. A via fermentativa processa-se com um número de reações menor do que na fermentação de carboidratos. Um exemplo de fermentação de aminoácidos é dado pela oxidação de alanina (Figura 3.29). Nesta reação, o aminoácido é oxidado a acetil-CoA, com redução de NAD⁺. A reoxidação da coenzima é acoplada à redução de glicina a acetato. Na primeira reação, forma-se um composto rico em energia, a acetil-CoA, que permite a produção de ATP através da formação intermediária de acetilfosfato.

O processo de fermentação de alanina pode ser resumido pela seguinte equação geral:



Outros aminoácidos - leucina, isoleucina e valina - podem ser utilizados como doadores de elétrons para a fermentação. A fermentação de aminoácidos ocorre em bactérias proteolíticas, como *Clostridium histolyticum*, causador de gangrena gasosa em

animais e *Clostridium perfringens*, agente necrosante em humanos, após traumatismo com contaminação por solo ou fezes. A proteólise no músculo, com posterior fermentação dos aminoácidos, produz odor pútrido, característico da moléstia.

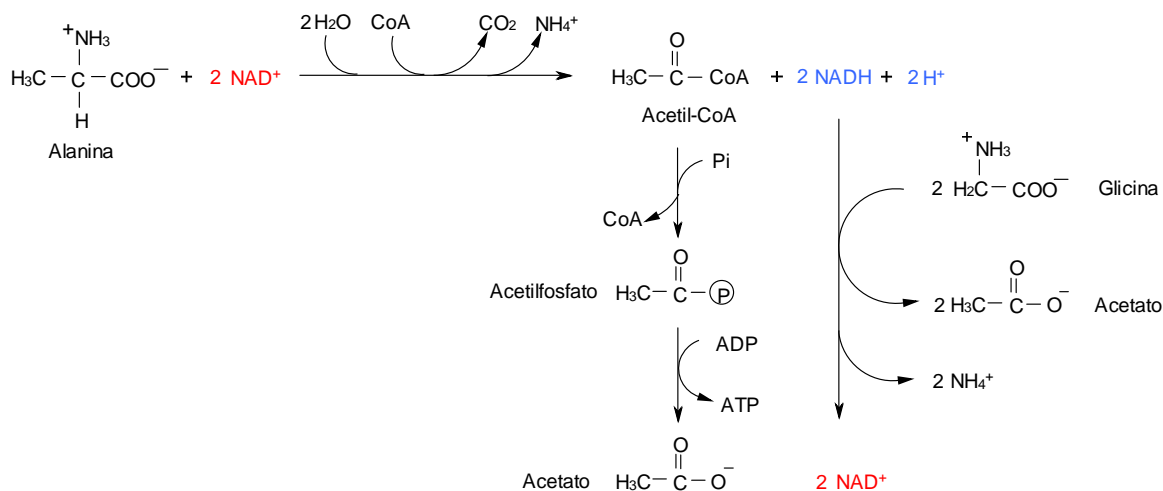


Figura 3.29. – Fermentação de alanina, um exemplo de fermentação de aminoácidos.

3.1.1.3 Respiração anaeróbia.

Se os primeiros organismos eram anaeróbios e apresentavam mecanismos de obtenção de energia simples e pouco eficientes, o surgimento da respiração anaeróbia foi consequência de uma grande modificação na estrutura da membrana plasmática, que se tornou muito mais complexa ao abrigar todos os componentes da cadeia de transporte de elétrons.

Nesse processo, as bactérias utilizam comoceptor de elétrons um composto exógeno diferente do oxigênio. Este composto pode ser inorgânico (NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Fe^{3+}) ou orgânico (fumarato). A cadeia de transporte de elétrons anaeróbia é constituída por desidrogenases e redutases, interligadas por quinonas.. A transferência de elétrons está associada à extrusão de prótons e à formação de um gradiente, aproveitado para a síntese de ATP. O rendimento do processo é maior do que o das vias fermentativas, porém menor do que o da respiração aeróbia (Figura 3.30). A respiração anaeróbia é encontrada em bactérias facultativas, como *E. coli* (também capaz de respiração aeróbia e fermentação), *Pseudomonas* (que também faz respiração aeróbia) e em bactérias anaeróbias estritas, como as do gênero *Desulfotomaculum*. A transferência de elétrons do último citocromo para oceptor final é catalisada por redutases diferentes, específicas para cadaceptor: nitrato redutase, nitrito redutase, sulfato redutase, etc. Estas enzimas

têm função análoga à das oxidases da cadeia de transporte de elétrons aeróbia, mas, no caso da respiração anaeróbia, são sempre designadas redutases. A presença destas enzimas nas células é indicativa da ocorrência de respiração anaeróbia, uma vez que sua síntese é reprimida por oxigênio.

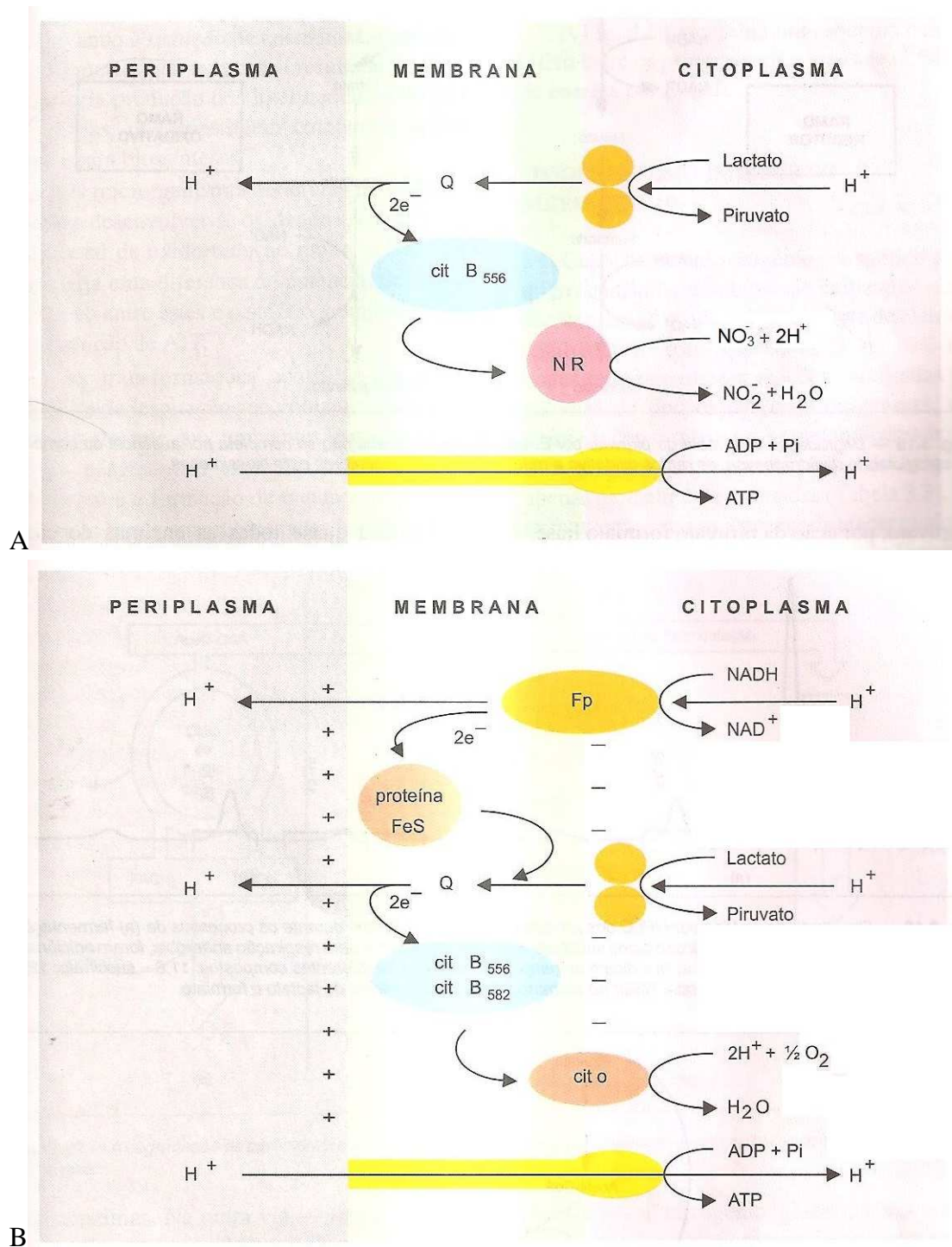


Figura 3.30. Cadeia de transporte de elétrons anaeróbia (A) e aeróbia (B) em *E. coli*.

Os doadores de elétrons para cadeia de transporte de elétrons anaeróbia podem ser coenzimas reduzidas (NADH), mas também compostos não totalmente oxidados como: lactato, succinato, formiato entre outros.

Comparadas à fermentação, as mudanças que possibilitaram a ocorrência de respiração anaeróbia levaram a um melhor aproveitamento energético da fonte de carbono, uma vez que, ao ser mais oxidada, maior quantidade de energia fica disponível para a célula. O meio ambiente também foi modificado, pois a respiração anaeróbia levou à diminuição da liberação de substâncias reduzidas pela célula. Tais substâncias (como ácidos), em concentrações elevadas, inibem a multiplicação celular, restringindo, dessa maneira, o número de indivíduos da população.

Em *E. coli*, na ausência de oxigênio, a inibição da α -cetoglutarato desidrogenase induz o funcionamento dos ramos redutor e oxidativo (Figura 3.10), seja na ausência ou presença de nitrato, situações que caracterizam fermentação ou respiração anaeróbia, respectivamente. Esta é claramente uma estratégia que reduz a quantidade de coenzimas reduzidas geradas com a oxidação da fonte de carbono. Entretanto, nem sempre isto ocorre com as bactérias em anaerobiose. Por exemplo, *Pseudomonas stutzeri*, em anaerobiose, não fermenta - apresenta apenas respiração anaeróbia e o ciclo de Krebs é completo, sendo o NADH o doador inicial de elétrons da cadeia de transporte de elétrons anaeróbia.

As estratégias de obtenção de NADPH e dos 13 precursores de biossíntese são muito semelhantes nos processos de respiração anaeróbia e fermentação (Figura 3.26). NADP^+ é reduzido na via das pentoses, na via de Entner-Doudoroff ou pela isocitrato desidrogenase e os 13 precursores são obtidos pela via de Embden-Meyerhof-Parnas ou via de Entner-Doudoroff, na via das pentoses e nos ramos oxidativo e redutor ou ciclo de Krebs.

3.1.2 Sobrevivência pela oxidação de matéria inorgânica.

Considerando que as condições primitivas da Terra eram redutoras, o metabolismo quimiolitotrófico deve representar uma das primeiras formas de metabolismo a ter surgido com capacidade de gerar matéria orgânica a partir de CO_2 . Nessas condições, entretanto, o oxigênio ainda não estava disponível e os primeiros quimiolitotoautotróficos dependeriam de outros compostos como aceptores finais de elétrons. Como a maioria dos

outros compostos apresentam potenciais de redução menores que o oxigênio, a quantidade de energia útil nessas condições seria baixa, mas compatível, uma vez que o oxigênio não estava disponível para qualquer outro organismo.

Atualmente, compostos inorgânicos reduzidos podem originar-se de atividades humanas, vulcânica ou de depósitos geológicos. Outra fonte importante é a atividade biológica, que gera compostos inorgânicos reduzidos (respiração anaeróbia, assimilação do NO_3^- e outros compostos, fixação biológica de N_2 , etc.).

Muitos quimiolitotróficos são capazes de utilizar CO_2 como única fonte de carbono e são denominados *quimiolitotróficos*. Quando o conceito de quimiolitotrófico foi estabelecido por Winogradsky, referia-se exclusivamente a quimiolitotróficos estritos (quimiolitotróficos), ou seja, bactérias capazes de obter energia exclusivamente pela oxidação de compostos inorgânicos e utilizando CO_2 como fonte de carbono. Entretanto, há maior diversidade de tipos metabólicos em bactérias que oxidam compostos inorgânicos. Quimiolitotróficos facultativos, também denominados *mixotróficos*, podem crescer autotroficamente utilizando compostos inorgânicos, sendo também capazes de realizar simultaneamente um metabolismo heterotrófico. Vias características dos dois tipos de metabolismo são utilizadas, por exemplo, da seguinte maneira: a energia é obtida pela oxidação de compostos orgânicos e inorgânicos e a fonte de carbono é CO_2 e compostos orgânicos. A mixotrofia ocorre apenas em baixas concentrações de nutrientes e as vias são acionadas conforme a predominância de um tipo de substância, orgânica ou inorgânica. Quando em concentrações altas de um dos tipos de nutriente, um comportamento diáuxico é observado, ou seja, cada um dos metabolismos ocorre sequencialmente e não simultaneamente.

Como visto, bactérias autotróficas estritas deverão fazer outras reações, além do ciclo de Calvin-Benson, para obter os 13 intermediários precursores. Estas reações incluem parte da via glicolítica, correspondente à conversão de 3-fosfoglicerato a piruvato, e algumas reações correspondentes às reações dos ramos oxidativo e redutor, pois em bactérias autotróficas estas reações têm a função apenas de suprir os intermediários precursores e não representam uma estratégia para oxidar completamente a acetil-CoA. A Figura 3.31 apresenta uma rede metabólica que deve funcionar em organismos quimioautotróficos.

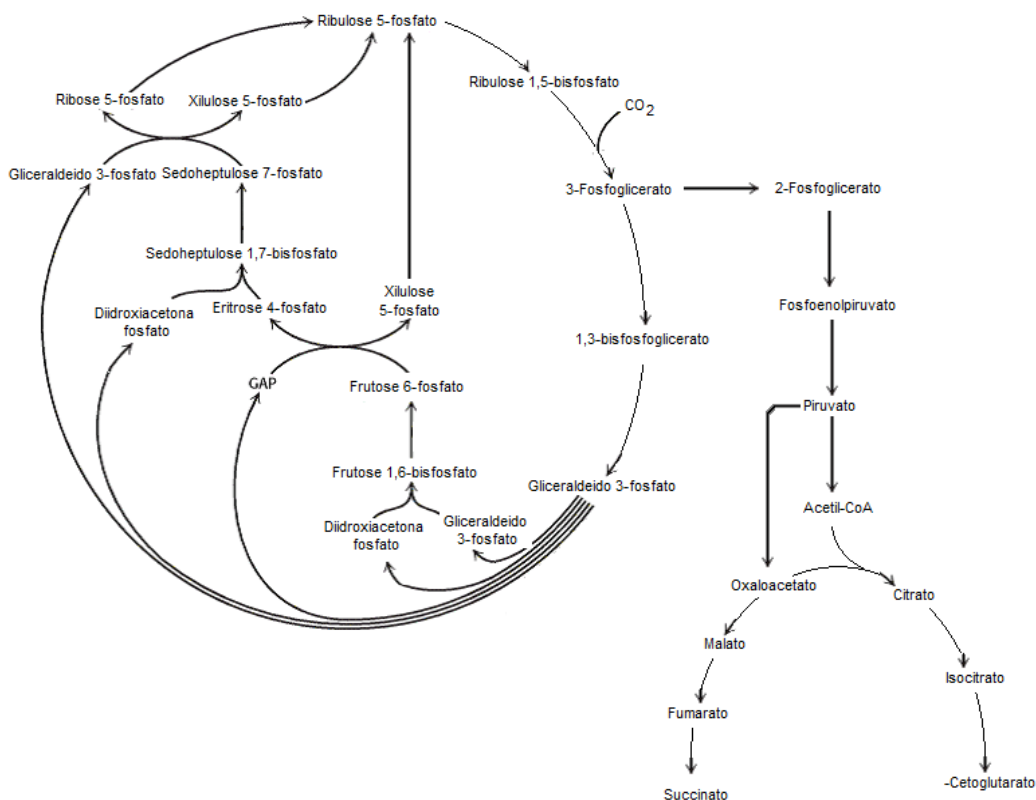


Figura 3.31 – Esquema geral da produção dos 13 precursores em célula que faz metabolismo quimio(foto)autotróficos

3.1.3 Utilização de luz em anaerobiose.

Nos primórdios da vida na Terra, com uma atmosfera desprovida de oxigênio, as células poderiam manter-se com metabolismo anaeróbico e quimiotrófico, utilizando-se de compostos orgânicos disponíveis no meio, por fermentação e depois por respiração anaeróbica de compostos orgânicos disponíveis no meio. A oxidação metabólica de compostos inorgânicos, e não os processos abióticos, provavelmente consistiu na forma mais primitiva de produção de matéria orgânica. Posteriormente, surgiram as primeiras bactérias fotossintetizantes. O mecanismo desenvolvido por esses primeiros seres capazes de utilizar luz como fonte de energia era anaeróbico. Um apoio para esta hipótese é a toxidez do O_2 para muitas bactérias que fazem fotossíntese anoxigênica, resultado da inibição da síntese dos pigmentos fotossensíveis. As bactérias fotossintetizantes anaeróbicas vivem atualmente em fundos de lagos onde recebem luz em ambiente anaeróbico. Os processos utilizados para a obtenção dos 13 precursores e de NADPH em bactérias que fazem fotossíntese anoxigênica não é essencialmente diferente dos

utilizados por bactérias quimioautotróficas. A produção de ATP por sua vez representa uma especialização dessas células, pois se tornaram capazes de utilizar a energia luminosa para geração do gradiente de prótons.

3.2 A vida em aerobiose.

3.2.1. A fotossíntese deu origem ao O₂.

Bactérias que fazem fotossíntese anoxigênica e usam CO₂ como fonte de carbono dependem de compostos reduzidos para gerar poder redutor (NADPH), necessário para fixação do CO₂ e para as reações de biossíntese. Nos primórdios da vida na Terra, compostos reduzidos de enxofre, como H₂S, provavelmente eram os principais supridores de elétrons.

Um grande passo evolutivo foi obtido quando algumas cianobactérias desenvolveram um fotossistema com poder oxidativo capaz de extrair elétrons da água. Esta adaptação expandiu enormemente o habitat dos organismos fotossintetizantes, que não mais se restringiram aos locais ricos em compostos inorgânicos reduzidos. A grande consequência dessa transformação foi a disponibilização de O₂, produzido pela oxidação da água. Os sistemas geradores de O₂ foram fundamentais para proporcionar mudanças importantes nas diferentes estratégias de sobrevivência. Os organismos que oxidam matéria orgânica puderam oxidá-la completamente a CO₂ e H₂O utilizando o O₂ como acceptor final de elétrons em uma cadeia de transporte de elétrons aeróbia. Os organismos quimioautotróficos também puderam aprimorar suas cadeias de transporte de elétrons utilizando esse acceptor, retirando mais energia da oxidação de compostos inorgânicos.

A Tabela 3.5 mostra a diversidade de tipos de fotossintéticos bacterianos que resultam de diferenças de pigmentos, doadores de elétrons, fonte de carbono e produção de oxigênio.

Tabela 3.5 – Diversidade metabólica em bactérias fotossintetizantes.

Produção de O ₂	Tipo	Pigmentos	Doador de elétrons	Fonte de Carbono	Via de fixação de CO ₂	Exemplos
Sim	Cianobactérias	Clorofila a,e b, ficobilinas	H ₂ O	CO ₂	Calvin-Benson	<i>Anabaena</i>
Não	Púrpuras do enxofre	Bacterioclorofila a ou b	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ³⁻ , H ₂ ou orgânico	CO ₂ ou Orgânico (etanol ou piruvato)	Calvin-Benson	<i>Chromatium</i>
	Púrpuras não-enxofre	Bacterioclorofila a ou b	H ₂ , Fe ²⁺ , H ₂ S (não é o principal) ou orgânico	CO ₂ ou Orgânico (succinato/ malato)	Calvin-Benson	<i>Rhodospseudomonas</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Rhodospirillum</i>
	Verdes do enxofre	Bacterioclorofila a+ c,d ou e	H ₂ S, S ⁰ , S ²⁻ O ₃ , H ₂	CO ₂ ou orgânico	CK reductivo	<i>Chlorobium</i>
	Verdes não-enxofre	Bacterioclorofila a+ c ou d	H ₂ S, H ₂ ou orgânico	CO ₂ ou orgânico	Outras vias	<i>Chloroflexus</i>
	Heliobactérias	Bacterioclorofila g	orgânico	orgânico	Não fixam	<i>Heliobacterium</i>

3.2.2. Oxidação de compostos inorgânicos e orgânicos na presença de O₂.

A disponibilidade de O₂ no ambiente proporcionou a estratégia de sobrevivência por respiração aeróbia. A Figura 3.32 apresenta a rede metabólica desse processo com a formação de 13 precursores, produção de ATP e obtenção de poder redutor para um organismo heterotrófico aeróbio. O emprego de oxigênio possibilitou a oxidação completa do composto orgânico, aumentando a quantidade de ATP sintetizado por massa de composto utilizado.

A presença do oxigênio também resultou em vantagens para bactérias que oxidam matéria inorgânica. O alto potencial de redução do oxigênio resulta em maior diferença entre os potenciais de redução do doador e o aceptor final de elétrons; conseqüentemente, maior quantidade de ATP pode ser gerada. Ainda mais, a utilização de oxigênio ampliou o espectro de compostos inorgânicos que podem ser oxidados para obtenção de energia por bactérias quimiolitotróficas, tornando possível a oxidação de compostos com potencial de redução muito alto.

De acordo com a hipótese endossimbiótica, um dos passos importantes para o surgimento das células eucarióticas primitivas foi a associação com bactérias que realizavam respiração aeróbia e que passaram a constituir as mitocôndrias dessas células.

A partir dessa célula, surgiram os metazoários, estabelecendo um novo domínio dos seres vivos, Eucaria, com respiração aeróbia como principal estratégia de sobrevivência e fermentação em casos especiais. Esse domínio de seres vivos diversificou-se com uma nova relação endossimbiótica que resultou no surgimento dos cloroplastos e da fotossíntese oxigênica. A relação endossimbiótica deve, portanto, ter sido estabelecida com cianobactérias.

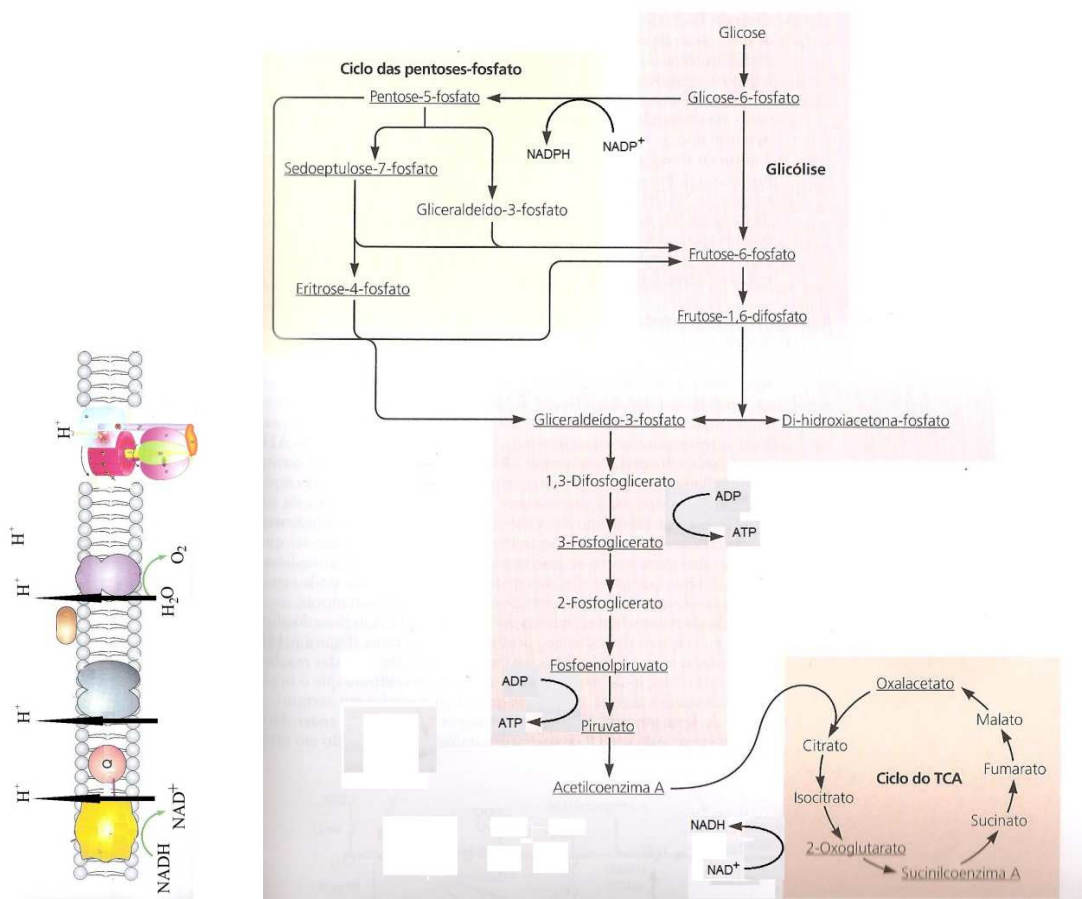


Figura 3.32 - Esquema geral de respiração aeróbia de compostos orgânicos.

Esta análise leva à conclusão que é dentro dos domínios procarióticos que as estratégias metabólicas se diversificaram. Hoje, encontram-se, pelos menos, sete estratégias diferentes: (1) fermentação, (2) respiração anaeróbia de compostos orgânicos e (3) inorgânicos, (4) respiração aeróbia de compostos orgânicos e (5) inorgânicos, (6) fotossíntese anoxigênica e (7) oxigênica. Isto faz dos microrganismos procariotos importantes e únicos agentes em muitos dos processos de transformação da matéria orgânica e inorgânica na Terra.

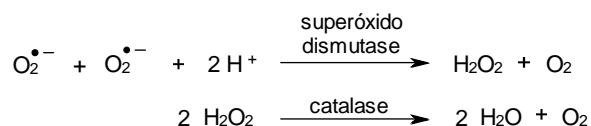
3.2.3. Oxigênio como inibidor do metabolismo

Cerca de 90% do oxigênio consumido pelos microrganismos aeróbios são utilizados como aceptor final da cadeia de transporte de elétrons, resultando na formação de H₂O; os 10% restantes são substratos de reações catalisadas por oxidases ou oxigenases. O metabolismo oxidativo gera continuamente espécies de oxigênio apenas parcialmente reduzidas (Tabela 3.6), extremamente reativas, capazes de reagir com qualquer composto orgânico e, portanto, muito tóxicas.

Tabela 3.6. Espécies reativas de oxigênio formadas pela redução parcial de O₂. A redução completa, com a transferência de quatro elétrons, leva à formação de água.

$O_2 + e^- \longrightarrow O^{\bullet-}$	ânion radical superóxido
$O^{\bullet-} + e^- + 2 H^+ \longrightarrow H_2O_2$	peróxido de hidrogênio
$H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow H_2O + OH^{\bullet}$	radical hidroxila
$OH^{\bullet} + e^- + H^+ \longrightarrow H_2O$	água

Nos organismos aeróbios, estão presentes várias enzimas incumbidas do processo de eliminação destas espécies ativas de oxigênio. O ânion radical superóxido pode ser eliminado pela ação sequencial de duas enzimas, a *superóxido dismutase* e a *catalase*:



As superóxido dismutases são encontradas em todos os organismos aeróbios, mas estão ausentes nos anaeróbios obrigatórios que, na ausência das enzimas desintoxicadoras, são danificados em tal extensão que não se mantêm vivos. Esta explicação tem confirmação no fato de mutantes de bactérias aeróbias facultativas, ao tornarem-se incapazes de sintetizar superóxido dismutase converterem-se em anaeróbios estritos. Altas tensões de oxigênio inibem a superóxido dismutase em algumas espécies microbianas. Provavelmente por isto bactérias microaerófilas só se desenvolvem em ambientes com baixas concentrações de oxigênio.

Os microrganismos anaeróbios estritos têm graus diferentes de sensibilidade ao oxigênio. Os mais sensíveis não sobrevivem além de três minutos à exposição ao oxigênio, enquanto outros mantêm a viabilidade por longo tempo, porém sem conseguir

multiplicar-se. É possível que tais anaeróbios, por não utilizarem oxigênio, tampouco produzam radicais livres.

A presença de catalase é utilizada para a identificação de bactérias.

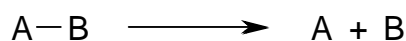
D. UTILIZAÇÃO DE ENERGIA

A permanente necessidade de utilização da energia contida no gradiente de prótons ou na molécula de ATP prende-se a razões termodinâmicas, ou seja, destina-se a viabilizar processos cuja tendência "natural" seria ocorrer no sentido contrário ao das necessidades celulares. Tome-se como exemplo a composição do meio em que o microrganismo vive. A concentração de íons e moléculas no meio jamais reproduzirá com exatidão a concentração ideal destes íons e moléculas para as funções celulares. Se a concentração de um determinado íon no meio externo for menor do que a ideal, seu transporte para o interior da célula contraria a tendência termodinâmica de igualar as concentrações dos dois lados da membrana, e é feito com gasto de energia. Este é o caso do transporte de lactose para as células de alguns microrganismos. A captação exclusiva do açúcar não é viável; por outro lado, a concentração de prótons no exterior da membrana é maior do que no interior e a tendência termodinâmica é de igualar as concentrações. A captação de lactose torna-se possível por associar a entrada do açúcar à de prótons, de tal forma que o transporte conjunto (*symport*, Seção 2.2.1.3) torna-se termodinamicamente viável. Em situações análogas, o gradiente de prótons gerado pela respiração ou pela fotossíntese é usado para promover a captação de moléculas do meio, em um processo quimiosmótico. Este mesmo gradiente fornece energia para a movimentação dos flagelos bacterianos, promovendo também um trabalho mecânico.

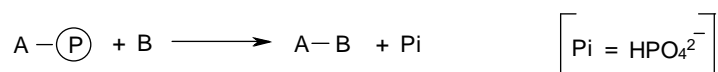
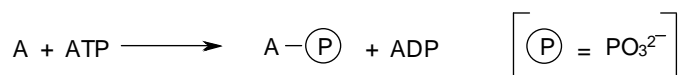
O ATP é o principal doador de energia

O número de processos que utilizam a energia contida no gradiente de prótons é baixo, apesar de qualitativamente importantes para a sobrevivência do microrganismo. A maior parte da energia utilizada pelos microrganismos provém da energia química presente na molécula de adenosina trifosfato. O ATP é responsável, direta ou indiretamente, pelo transporte de inúmeras substâncias para o interior das células e pela excreção de outras tantas. Mas, sobretudo, é à custa de ATP que se processam as sínteses das substâncias imprescindíveis para a manutenção e reprodução celulares.

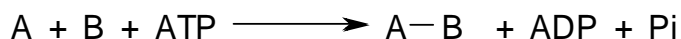
De uma maneira geral, pode-se admitir que os processos de obtenção de energia consistem em oxidação de moléculas grandes e reduzidas, levando à produção de moléculas menores e mais oxidadas; são processos *espontâneos*, termodinamicamente favoráveis. As sínteses, ao contrário, consistem em produção de moléculas grandes e reduzidas a partir de moléculas menores e mais oxidadas; tais processos não podem ocorrer simplesmente por inversão do sentido das reações de degradação. Esta impossibilidade termodinâmica é contornada pela utilização de uma via de síntese diferente da via de degradação, composta de outras reações, estas sim, termodinamicamente viáveis. O ATP participa de alguma (ou algumas) destas reações e é desta forma que este composto contribui para tornar possíveis as sínteses. Tome-se como exemplo a reação genérica de degradação, termodinamicamente viável:



A reação no sentido contrário ao que está escrito não é viável. Entretanto, o composto A-B pode ser sintetizado a partir de A e B, não diretamente, mas utilizando outras reações das quais participa o ATP:

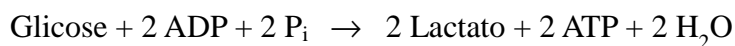


Somando as duas reações acima,



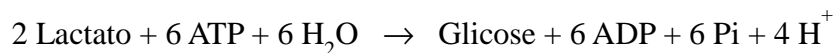
O exame da última reação mostra apenas o resultado geral do processo, no qual o ATP "fornece a energia" para que a síntese de A-B possa ocorrer. Na verdade, o ATP participa efetivamente de reações, como mostram as reações parciais.

Um exemplo real da contribuição do ATP é observado nas interconversões de glicose e lactato. A equação geral da transformação de glicose a lactato é:



Deve-se notar que uma equação geral não representa uma reação química: a degradação de glicose a lactato é feita pela série de reações que constituem a via glicolítica. A equação geral é apenas o balanço final do processo.

Se este processo é termodinamicamente favorável, o processo inverso (ou seja, a síntese de glicose a partir de lactato) não o é. A forma biológica de contornar esta impossibilidade é a utilização de outro caminho metabólico para a síntese de glicose, usando outras reações. A conversão de lactato a glicose (uma síntese, pois forma-se uma molécula de seis carbonos a partir de duas moléculas de três carbonos) processa-se segundo a equação geral:



Naturalmente, esta reação também jamais ocorre. Ela representa tão somente o resultado global de um processo constituído por muitas reações, em algumas das quais o ATP aparece como reagente. A reação deve ser interpretada com cuidado. Um conceito errôneo frequentemente a ela associado é imputar o dispêndio energético necessário à síntese como resultado da hidrólise do ATP. Neste caso, como ocorre sempre, a equação geral esconde as reações parciais nas quais houve participação do ATP como componente da reação, sem que em nenhuma delas tenha havido sua hidrólise. A comparação das duas equações gerais evidencia a utilização de ATP para promover o processo de síntese.

A síntese de macromoléculas exige grande dispêndio de ATP

Quanto maior for a molécula a ser sintetizada, maior será o gasto de ATP necessário para viabilizar a síntese. Portanto, o grande dispêndio energético celular refere-se à produção dos muitos tipos de macromoléculas presentes nas células bacterianas: a parede celular é composta por peptidoglicano e a membrana externa das Gram-negativas por lipopolissacarídeo, proteínas e fosfolipídios; flagelos e pili são compostos por proteínas; a membrana citoplasmática é formada por fosfolipídios e proteínas; o citoplasma pode conter material de reserva, na forma de polissacarídios, polifosfato ou poli-3-hidroxicarboxilatos; ribossomos são constituídos por proteínas e RNA; DNA está presente no cromossomo bacteriano e nos plasmídios; RNA mensageiro

e RNA transportador fazem parte da fisiologia celular. Destaque especial deve ser dado às proteínas, pois além de sua função estrutural constituem muitas toxinas bacterianas e as enzimas, sintetizadas em grande variedade. Além disso, o processo de síntese proteica, pela necessidade do rigor estrutural que possibilita sua função, é energeticamente muito dispendioso.

Deve-se notar que muitas das macromoléculas sintetizadas pelas células têm atuação não como moléculas isoladas, mas participando de estruturas de ordem superior. Muitas proteínas são constituídas por várias cadeias polipeptídicas (iguais ou diferentes), sintetizadas independentemente. O processo que leva à montagem (*assembly*) das proteínas oligoméricas é pouco conhecido, mas, aparentemente, não é nesta fase que há grande dispêndio energético. Casos ainda muito mais complexos de montagem aparecem quando diferentes macromoléculas ligam-se para constituir componentes estruturais supramoleculares, como as membranas ou os ribossomos. Nestas montagens há poucas regras gerais e o processo que leva à organização da organela depende de cada caso.

As sínteses das macromoléculas ocorrem por meio de vias metabólicas particulares a cada tipo. Como exemplo de um processo de síntese de macromolécula será descrita a seguir a síntese de peptidoglicano, uma macromolécula característica das bactérias.

3.1. SÍNTESE DO PEPTIDIOGLICANO

A rigidez da parede das bactérias é garantida por uma molécula única, gigante, formando uma rede tridimensional, o peptidoglicano, mureína ou mucopeptídio. Como seu nome indica, é composto por derivados de açúcares (*N*-acetilmurâmico e *N*-acetilglicosamina) e por um oligopeptídio (nas Gram negativas) ou por dois tipos de oligopeptídios (nas Gram positivas). A estrutura do peptidoglicano está detalhada na Seção 2.2.2..

À exceção dos micoplasmas e das Archaea, todas as bactérias apresentam este biopolímero, que lhes garante uma estrutura perfeita, responsável pela viabilidade celular. Como será descrito adiante, alguns antibióticos têm seu mecanismo de ação justamente por interferência na síntese deste polímero. A estrutura rígida do peptidoglicano é imprescindível para a manutenção da estrutura celular porque a membrana citoplasmática sozinha é incapaz de resistir à tensão provocada pela entrada de água nas condições habituais de hipotonicidade a que estão submetidas as bactérias.

O peptidoglicano é sempre composto por cadeias dos aminoaçúcares *N*-acetilglicosamina (NAG) e *N*-acetilmurâmico (NAM) ligadas por oligopeptídios; sua síntese ocorre em duas fases, uma intracelular e outra extracelular. Como na fase extracelular não é possível usar ATP, a primeira fase consiste em ativar os monômeros precursores do polímero, de modo que, ao serem transferidos para o exterior da célula, eles possam unir-se sem fornecimento de energia para a reação.

A síntese dessa macromolécula ocorre parte no citoplasma, parte na membrana plasmática e termina externamente com a polimerização dos monômeros, pela ação de *glicosiltransferases* que catalisam a inserção dos glicanos e de *transpeptidases*, que formam as pontes peptídicas cruzadas. Para a inserção dos monômeros deve ocorrer uma septação do peptidoglicano pré-existente, por ação de um sistema de autolisinas que rompem as ligações β -1,4 entre os componentes *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilmurâmico e entre os peptídios, quando novas unidades são inseridas ao longo das aberturas.

O crescimento do peptidoglicano ocorre, em cocos, em duas direções opostas ao anel FtsZ (Seção 5.2.2) e, em células com formato de bacilos, o aumento da parede ocorre em vários pontos ao longo do eixo maior.

O processo geral de síntese do peptidoglicano é semelhante em todas as bactérias; a seguir será descrita a síntese em *Staphylococcus aureus*, organismo em que é melhor conhecida.

A Figura 3.33 apresenta as reações componentes do processo de síntese, que pode ser resumido nas seguintes etapas:

1. Formação do NAM ativado (UDP-NAM) a partir de UDP-NAG e ligação de uma cadeia de aminoácidos (pentapeptídio I) ao UDP-NAM, produzindo *N*-acetilmuramilpentapeptídio. Cada aminoácido é inserido pela ação de uma enzima diferente e requer ATP para ativar seu grupo carboxila.
2. Ligação do *N*-acetilmuramilpentapeptídio-UDP a um transportador de membrana, o bactoprenol (undecaprenol), com a liberação de UMP.
3. Formação da ligação glicosídica entre *N*-acetilmuramilpentapeptídio (ainda ligado ao transportador) e UDP-NAG, com a liberação de UDP.
4. Ligação sequencial de cinco glicinas, provenientes de cinco glicil-tRNA ao terceiro aminoácido do pentapeptídio I, formando o pentapeptídio II (portanto, uma pentaglicina).
5. Transporte da estrutura formada para o exterior da membrana.

6. Inserção da estrutura transportada no interior do peptidoglicano pré-existente, devidamente quebrado por autolisinas. Formam-se, então, as ligações entre os aminoácidos e os peptídios, conservando a estrutura de ligações cruzadas do polímero, expandindo-o nas três dimensões.

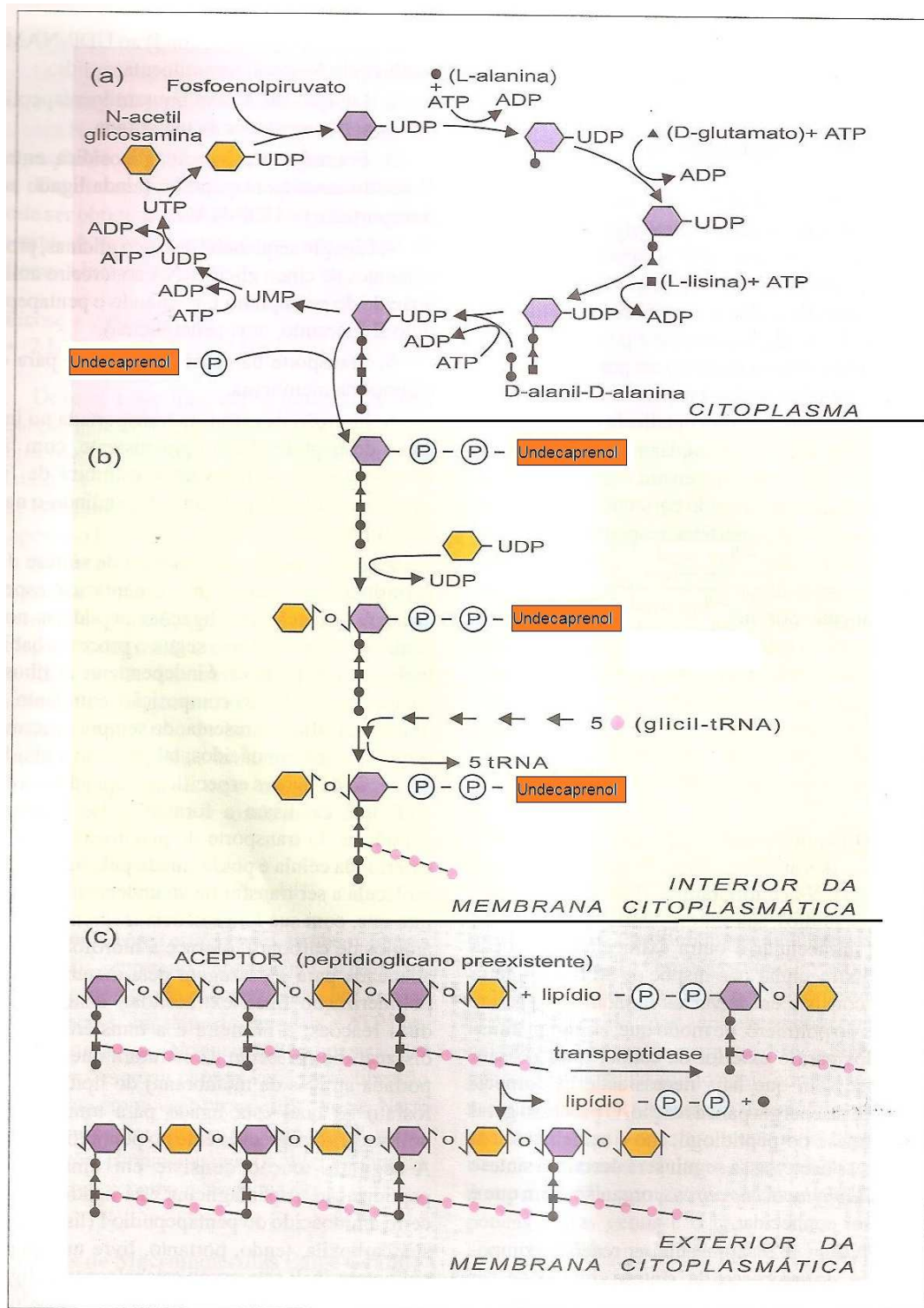


Figura 3.33 – Síntese de peptidoglicano. N-acetilglicosamina N-acetilmurâmico

Alguns aspectos do processo de síntese do peptidoglicano merecem comentários especiais. A formação das ligações peptídicas nos pentapeptídios I e II não segue o processo habitual de síntese proteica: é independente de ribossomos e m-RNA. Sua composição, entretanto, é muito específica, apresentando sempre a mesma sequência de aminoácidos; tal precisão é obtida pela ação de ligases específicas, dependentes de ATP, que catalisam a formação das ligações peptídicas.

O transporte de precursores para o exterior da célula é possibilitado pela ligação da molécula a ser transferida ao undecaprenol fosfato (bactoprenol) que, com sua longa cadeia isoprenoide (55 átomos de carbono), oferece a hidrofobicidade adequada para a passagem pela membrana.

A polimerização final, extracelular, compreende duas reações: a primeira é a transferência do dissacarídeo (presente na estrutura que é transportada através da membrana) do lipídio pirofosfato ao qual está ligado para uma cadeia polissacarídica pré-existente no peptidoglicano. A segunda reação consiste em uma transpeptidização. A pentaglicina está ligada ao terceiro aminoácido do pentapeptídio I (lisina) por sua carboxila, tendo, portanto, livre um grupo amino terminal; este grupo estabelece uma ligação peptídica com a penúltima alanina de um pentapeptídio I adjacente. Neste processo, a alanina terminal é liberada e o resultado final é a formação de uma ponte de pentaglicina ligando dois pentapeptídios I. A transpeptidização é catalisada por uma transpeptidase. Nas bactérias Gram negativas, que não apresentam o peptídio II (a pentaglicina), também ocorre transpeptidização; neste caso, porém, a ligação é feita entre o grupo amino da lisina (que não participa de ligação peptídica no pentapeptídio I) com a mesma alanina mencionada no caso anterior. Assim, os dois pentapeptídios I adjacentes ficam unidos apenas por uma ligação peptídica (lisina de um pentapeptídio I + alanina de outro pentapeptídio I).

Analisando a Figura 3.33 pode-se verificar que para a introdução de um monômero no peptidoglicano há gasto de seis moléculas de ATP, evidenciando o grande dispêndio energético nas sínteses dos polímeros.