

## **METABOLISMO BACTERIANO**

Metabolismo é o conjunto de reações bioquímicas interconectadas de um ser vivo. A definição será mais completa se considerar também a função das reações celulares; essas reações têm funções específicas (biossíntese de aminoácidos, degradação de carboidratos etc.) e funções mais gerais, como a obtenção, o armazenamento e a utilização de energia. Outro modo de conceituar metabolismo, abrangendo processos e funções, é entendê-lo como *a estratégia de sobrevivência de uma espécie*, incluindo a 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 uma 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 essa 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 eliminam 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 que demandam energia sejam 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 essas células sintetizam ATP. Para essa síntese, duas são as

fontes energéticas primárias: a *luz* ou a *oxidação de compostos químicos*. Como grande parte dos compostos químicos passíveis de oxidação 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.

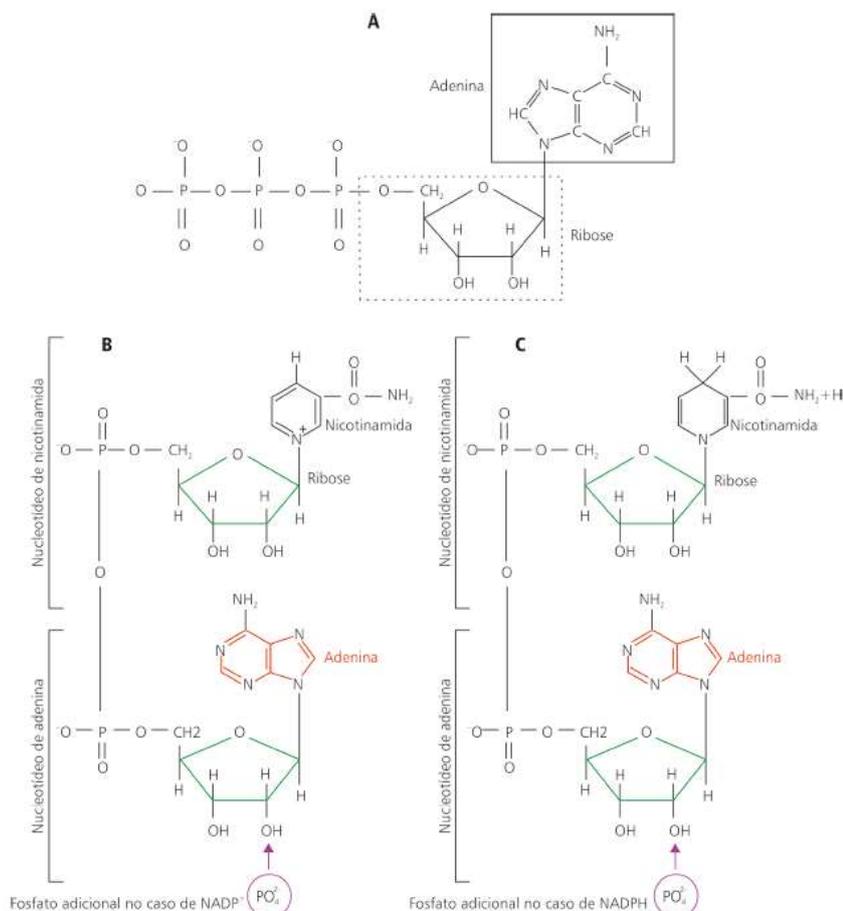
Além de energia, a duplicação de uma célula requer matéria-prima para a duplicação dos seus componentes. As células de todos os seres vivos são quimicamente semelhantes: são constituídas de ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídios etc. Por isso, ainda que as estratégias adotadas para a formação de uma nova célula variem conforme o organismo, o desafio a ser superado é igual 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. Com esses precursores, obtêm 13 compostos orgânicos que servem de intermediários para a síntese de todos os outros constituintes celulares. Outras espécies bacterianas, principalmente patogênicas estritas, não são dotadas de capacidade metabólica tão completa 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. A coenzima mais utilizada para essas reduções é a nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH), que, em algumas reações, pode ser substituída pela sua congênere não fosforilada, a nicotinamida adenina dinucleotídio (NADH). Por sua função, o NADPH é muitas vezes referido como *poder redutor*.

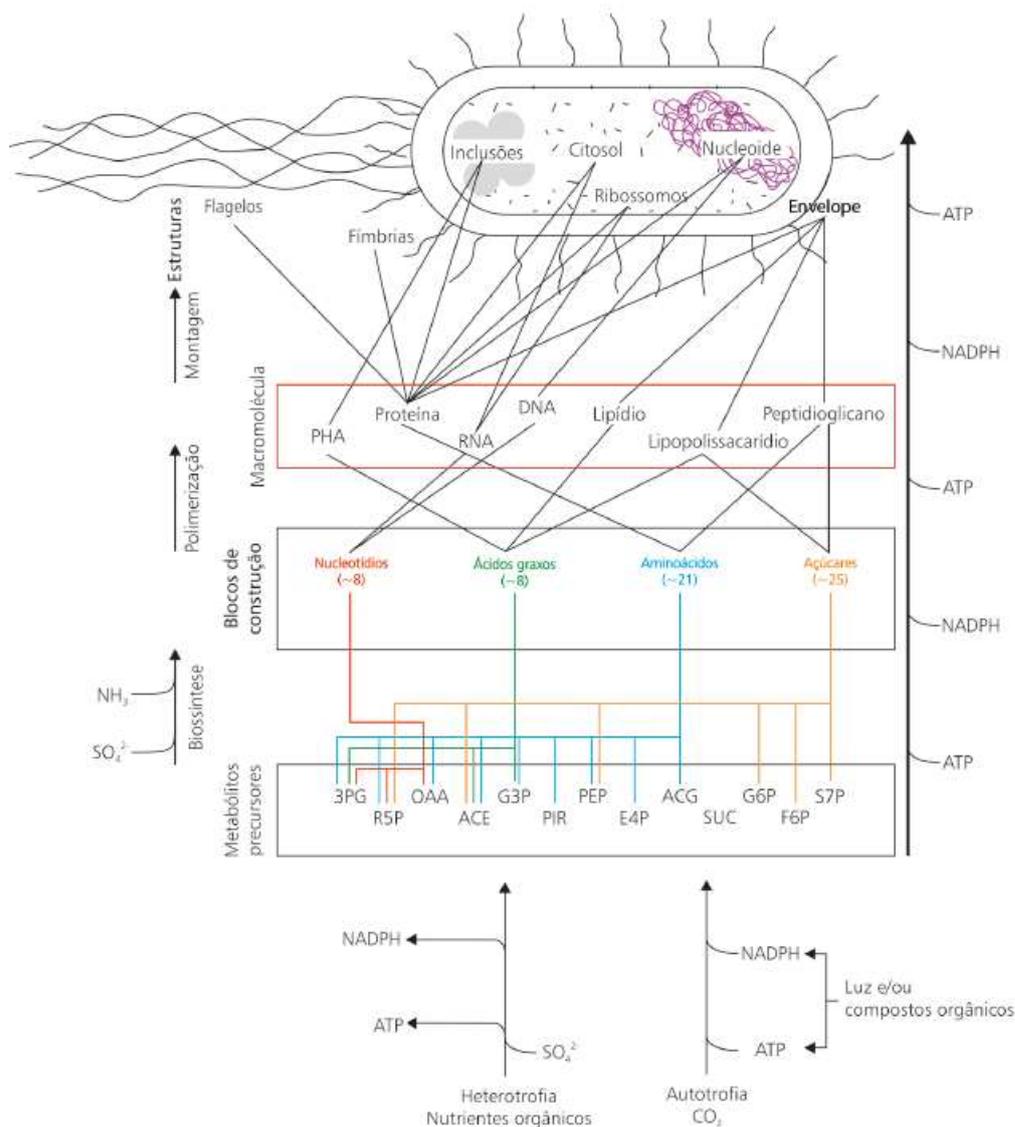
Há uma diferença importante no papel que exercem as coenzimas (ATP e NADPH) e os 13 precursores nas reações do metabolismo. A soma das concentrações celulares das duas formas possíveis das coenzimas [ATP + ADP] e [NADPH + NADP<sup>+</sup>] é constante. No caso do ATP, a alternância de formas é mantida 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<sup>+</sup> 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 dessas coenzimas: fornecer energia ou equivalentes redutores para as reações do metabolismo. Os processos cíclicos envolvendo ATP/ADP e NADPH/NADP<sup>+</sup> representam, portanto, fluxos contínuos de energia e poder redutor, necessários para manter o metabolismo e construir novas células.

Quanto aos 13 compostos fundamentais, não existe nenhum *turnover* imediato, e, uma vez que esses compostos são convertidos em outras moléculas celulares, há constante necessidade de aporte de carbono 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.



**Figura 3.1.** Coenzimas ATP e NAD<sup>+</sup>/NADH. O NADP<sup>+</sup> difere do NAD<sup>+</sup> 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 “propósito” é a obtenção de ATP, NADPH e 13 moléculas precursoras, que serão utilizados na biossíntese de todos os constituintes celulares, bem como na manutenção da célula (**Figura 3.2**). Células que não apresentam essa capacidade completa devem obter do meio os precursores ou moléculas produzidos a partir desses blocos de construção.

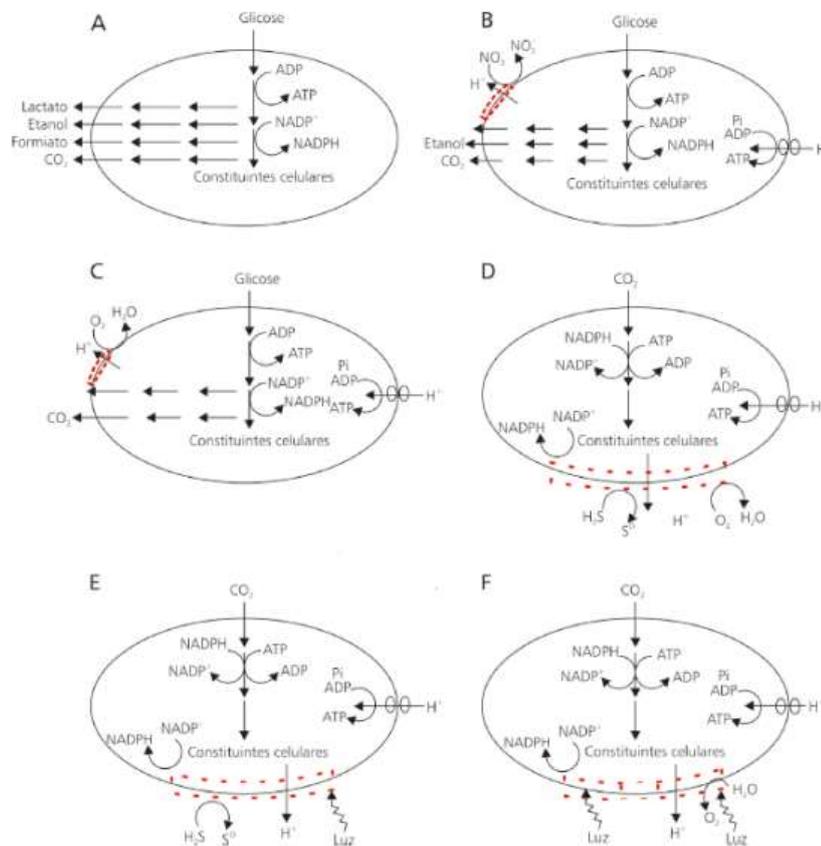


**Figura 3.2.** Formação de novas células (heterotróficas ou autotróficas) a partir dos nutrientes com a formação dos 13 precursores, NADPH e ATP. Dos 21 aminoácidos indicados, 20 são encontrados em proteínas e 1 deles é específico do peptidoglicano. 3PG – 3-fosfoglicerato; R5P – ribose 5-fosfato; OAA – oxaloacetato; ACE – acetil-CoA; G3P – gliceraldeído 3-fosfato; PIR – piruvato; PEP – fosfoenolpiruvato; E4P – eritrose 4-fosfato; ACG – alfa-cetoglutarato; SUC – succinato; G6P – glicose 6-fosfato; F6P – frutose 6-fosfato; e S7P – sedoheptulose 7-fosfato.

### ATP, os 13 precursores e NADPH são obtidos por vias diferentes

Do ponto de vista metabólico, as bactérias são os organismos mais versáteis conhecidos, em razão da 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. A **Figura 3.3** esquematiza diferentes alternativas 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 hábitat dos microrganismos e suas necessidades nutricionais. Algumas das conclusões principais dessa análise estão listadas 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

- por oxidação de compostos orgânicos (esquemas A, B e C) – processo usado por bactérias **quimiorganotróficas**;
- por oxidação de compostos inorgânicos (esquema D) - processo usado por bactérias **quimiolitotróficas**;
- a partir de energia luminosa sem produção de oxigênio (esquema E) - processo usado por bactérias **fototróficas**;
- 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  $\text{CO}_2$  (esquemas D, E e F), definindo-as como **autotróficas**.

3. Um dos processos leva à produção de  $O_2$  (esquema F); outros requerem  $O_2$  (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 descritas as vias metabólicas que permitem a obtenção dos 13 intermediários para a biossíntese de moléculas e 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. Nessa análise, serão consideradas as estratégias de obtenção de ATP e NADPH.

## PARTE A – AUTOTROFIA *VERSUS* HETEROTROFIA

A referência mais imediata que temos de metabolismo autotrófico e heterotrófico vem de plantas e animais. Animais são essencialmente heterotróficos. Plantas, embora autotróficas, ou seja, capazes de utilizar  $CO_2$  como única fonte de carbono, também têm metabolismo heterotrófico, consumindo carboidratos e outros compostos orgânicos em metabolismo respiratório aeróbio. Algumas bactérias têm metabolismo exclusivamente autotrófico, sendo até mesmo seu crescimento inibido em presença de matéria orgânica. Outras são bactérias facultativas, com metabolismo autotrófico ou heterotrófico dependendo das condições; há, ainda diferentes tipos de autotrofia ou heterotrofia dependendo das circunstâncias.

No Capítulo 8 (Evolução e Sistemática) são discutidas diferentes hipóteses sobre o primeiro tipo de metabolismo surgido, heterotrofia ou autotrofia. Para que o metabolismo heterotrófico fosse o primeiro, seria necessário que o ambiente terrestre primitivo contivesse uma quantidade razoável de matéria orgânica para que as células pudessem utilizá-la e reproduzir-se. A atividade biológica heterotrófica deveria consumir essa matéria orgânica, que não seria repostada na ausência de seres vivos capazes de sintetizá-la rapidamente. Por outro lado, havia compostos inorgânicos em abundância suficiente para sustentar o desenvolvimento de um metabolismo autotrófico. No entanto, a biossíntese de compostos orgânicos a partir de  $CO_2$  exige uma complexidade difícil de ser explicada, mesmo considerando que as primeiras células deveriam ser estruturalmente simples.

A identificação precisa do primeiro tipo de metabolismo a surgir é impossível. Atualmente, os dois grupos metabólicos coexistem por vezes em um mesmo indivíduo bacteriano.

### 3.1 HETEROTROFIA

Substâncias orgânicas diversas (carboidratos, proteínas, ácidos graxos etc.) podem suprir as necessidades das células bacterianas heterotróficas. Como a glicose, polimerizada como amido ou celulose, é o composto disponível em maior quantidade na natureza, este açúcar é apresentado como a fonte universal de carbono e conceitua-se o **metabolismo central** dos organismos heterotróficos como o conjunto de reações que levam à oxidação de glicose a  $\text{CO}_2$ . A análise de vias metabólicas heterotróficas para obtenção dos 13 precursores, de ATP e de NADPH, feita a seguir, considerará sempre a glicose como exemplo de matéria orgânica, sem que isso signifique ser essa a única alternativa metabólica para as células.

#### 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 essa via.

A via glicolítica inicia-se com a fosforilação da glicose por ATP, produzindo glicose 6-fosfato (reação 1). Essa 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 durante 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. a glicose 6-fosfato é isomerizada a frutose 6-fosfato (reação 2);
- b. nova fosforilação da hexose, com produção de uma molécula bifosforilada, aproximadamente simétrica (reação 3);
- c. quebra da molécula da hexose bifosforilada (reação 4), produzindo duas trioses monofosforiladas interconvertíveis (reação 5); praticamente, portanto, há produção de duas trioses idênticas;
- d. oxidação da triose fosforilada, por transferência de elétrons ao  $\text{NAD}^+$  (reação 6); nesta reação há incorporação de um grupo fosfato inorgânico;

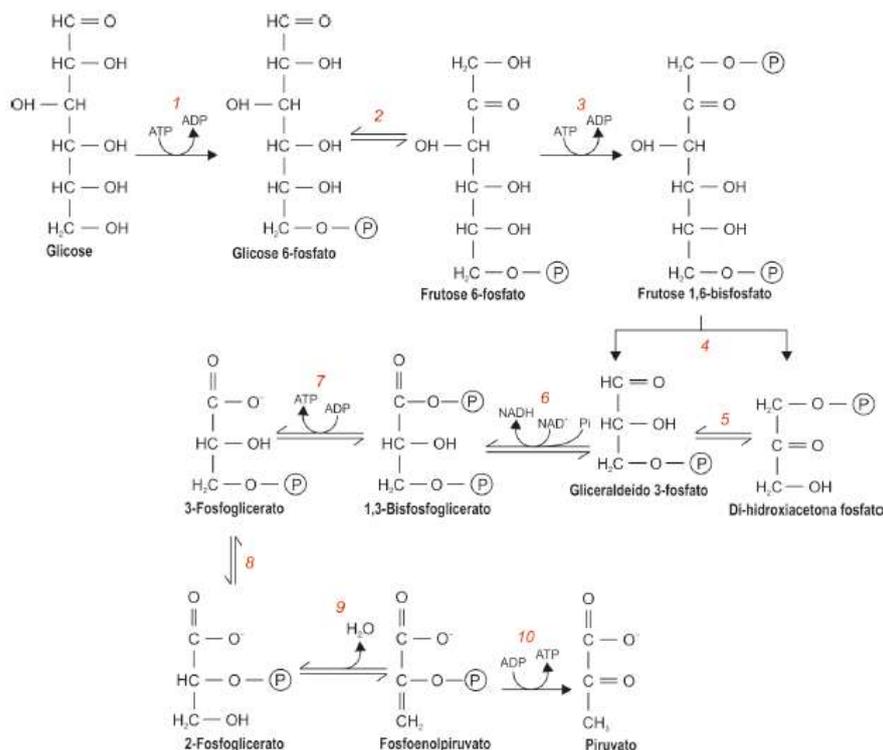
e. transferência, em reações subsequentes, dos dois grupos fosfato presentes no 1,3-bifosfoglicerato para o ADP, produzindo ATP (reações 7 e 10).

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 dessa transformação na forma de ATP. 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-bifosfoglicerato com redução de  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$  (Figura 3.4, reação 6).

A glicólise 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).

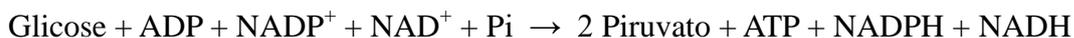


**Figura 3.4.** Via de Embden-Meyerhoff-Parnas

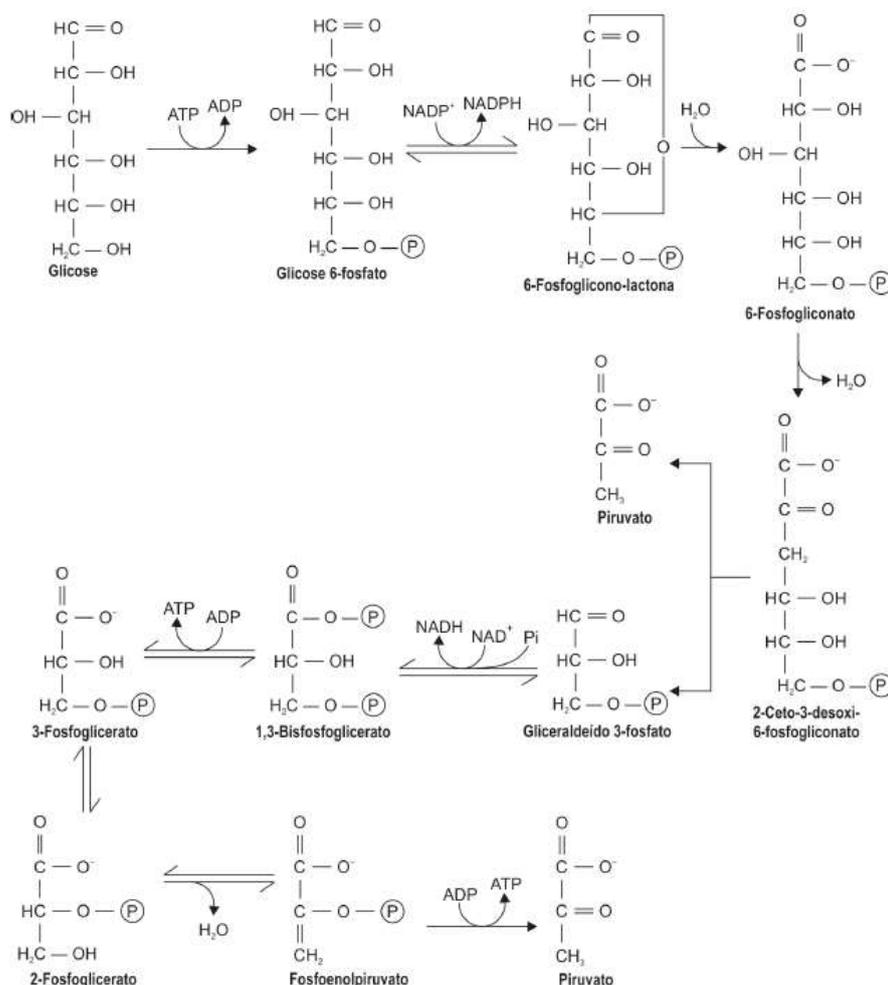
### 3.1.2 Via de Entner-Doudoroff

A via de Entner-Doudoroff (Figura 3.5), descrita apenas em microrganismos, é uma alternativa para o metabolismo de glicose e contém 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-bifosfato na via de Embden-Meyerhof-Parnas e 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato na via de Entner-Doudoroff. A frutose 1,6-bifosfato 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 final da degradação da glicose por essa 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  $\text{NAD}^+$ . 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).**



**Figura 3.5.** Via de Entner-Doudoroff.

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.

**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

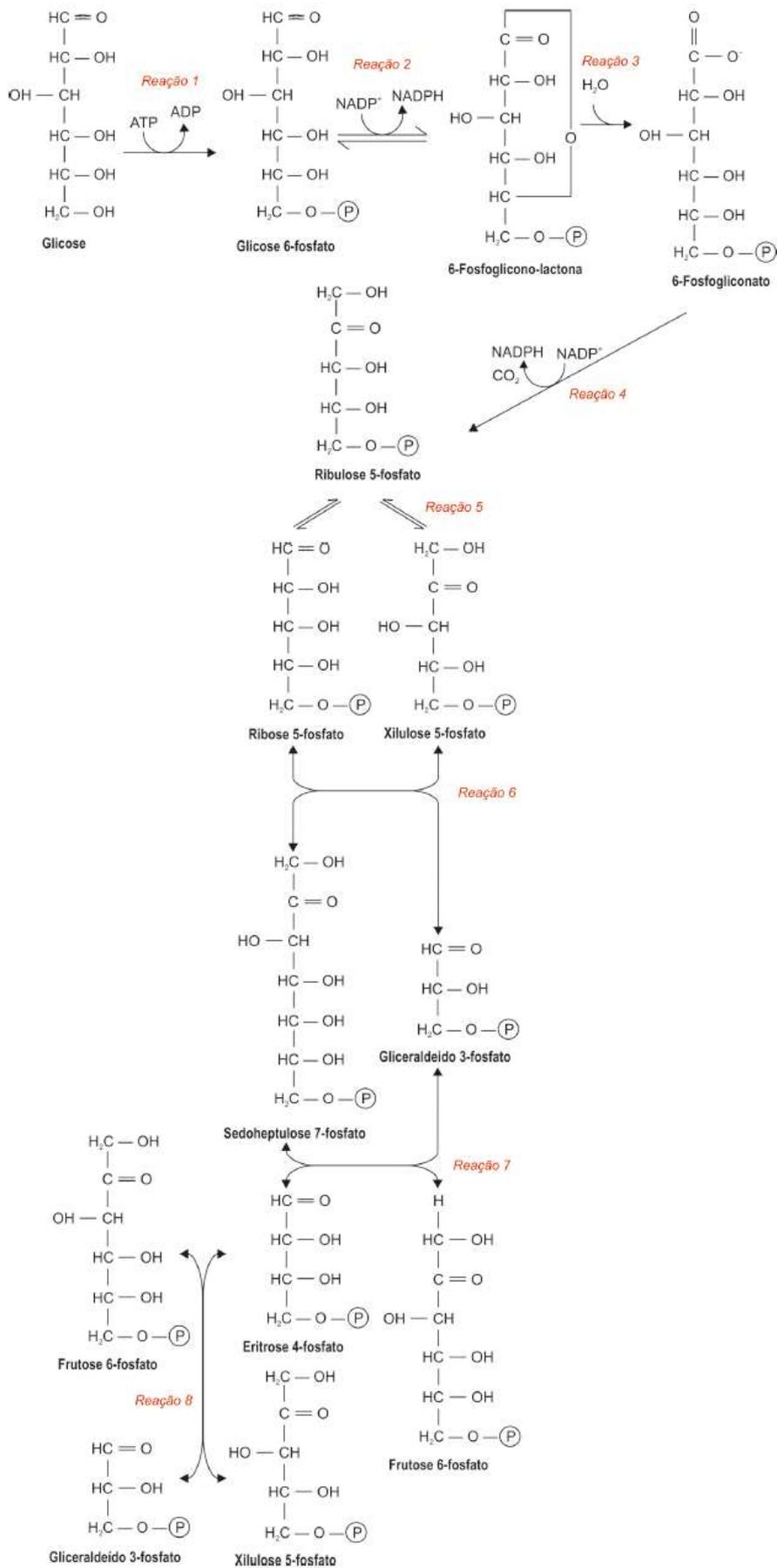
### 3.1.3 Via das Pentoses

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 CO<sub>2</sub> (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 de aminoácidos aromáticos.

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



**Figura 3.6.** Via das pentoses

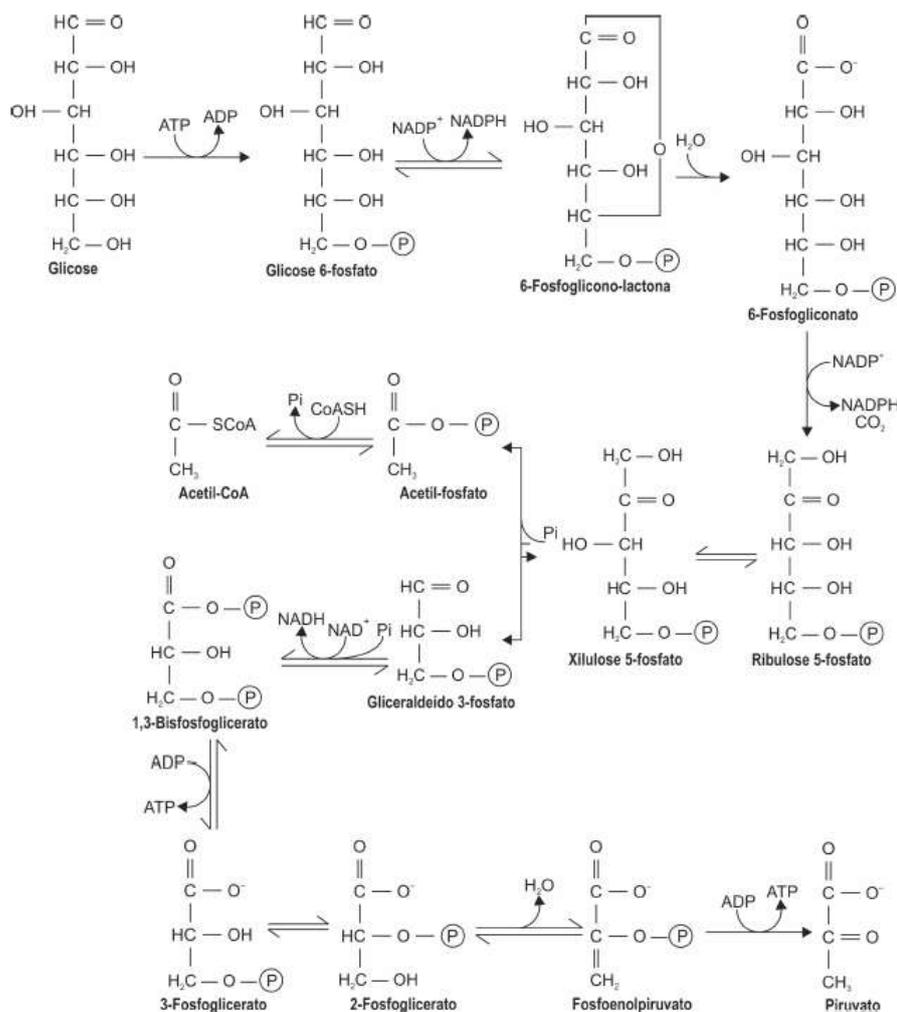
O resultado final da oxidação parcial da glicose pela via das pentoses é representado pela equação seguinte.



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

### 3.1.4 Via da fosfoctolase

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



**Figura 3.7A.** Via da fosfoctolase em *Leuconostoc*.

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**).

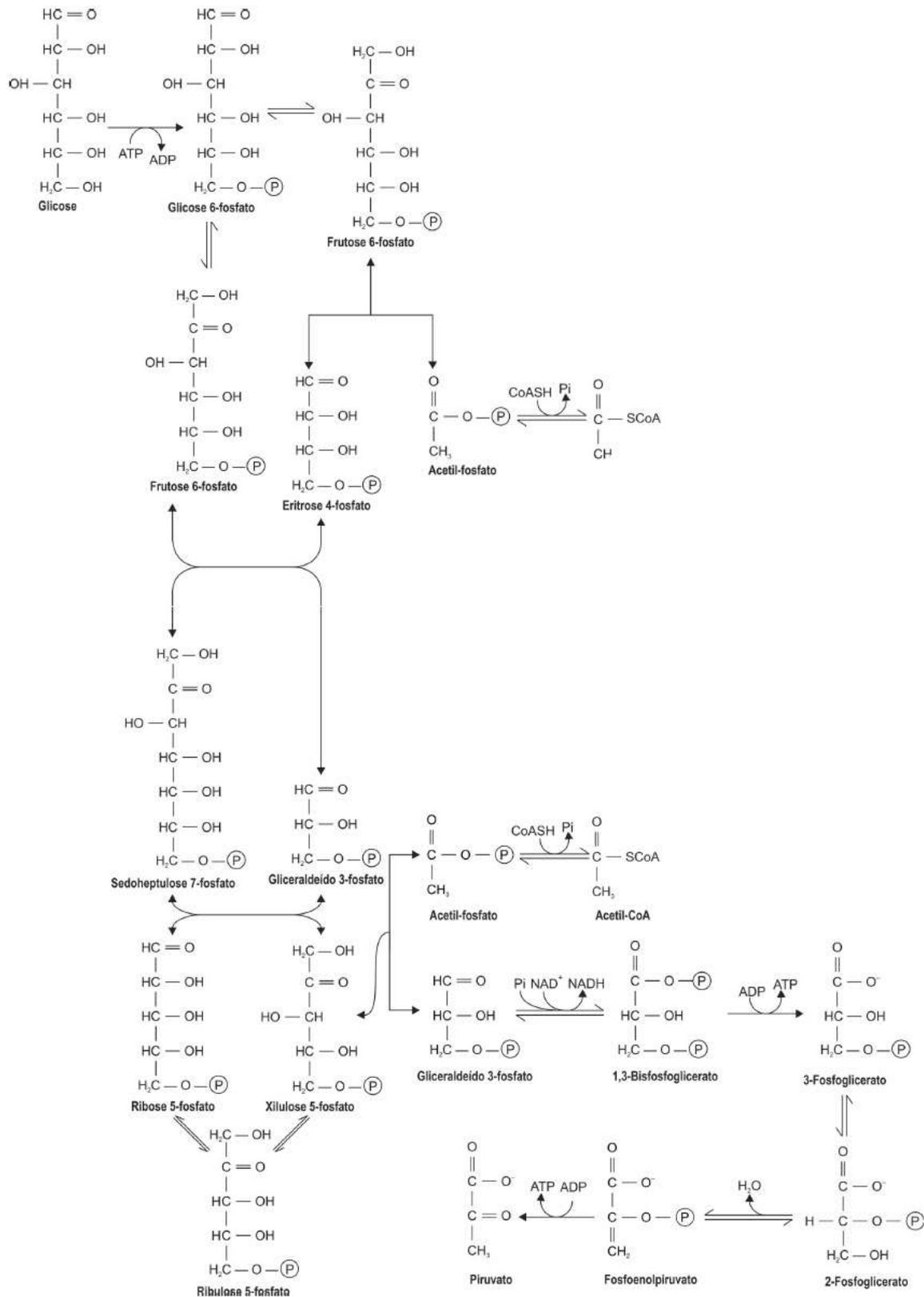
As vias da fosfocetolase permitem a obtenção de 10 dos 13 precursores: **glicose 6-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato, acetil-CoA, frutose 6-fosfato, ribose 5-fosfato, eritrose 4-fosfato e sedo-heptulose 7-fosfato** (**Figura 3.2**).

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



### 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 nessa via.

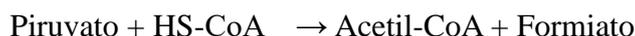
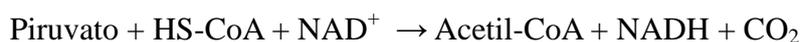


**Figura 3.7B.** Via da fosfoacetolase em *Bifidobacterium*.

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 3.3.1.1.),

não há aceptores exógenos de elétrons. O piruvato ou as substâncias dele derivadas são reduzidos por NADH, restaurando a forma oxidada da coenzima (NAD<sup>+</sup>). A oxidação do NADH permite que essa coenzima participe de novas oxidações do substrato.

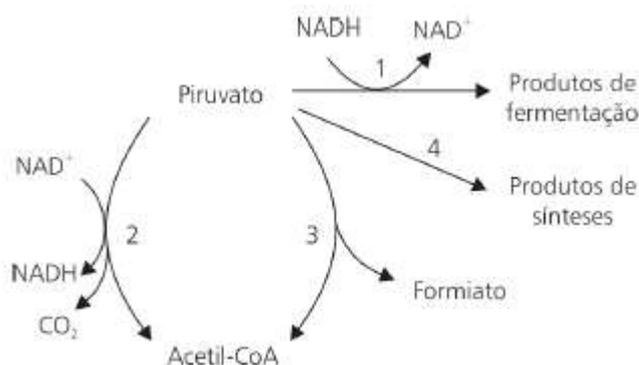
O piruvato pode ser convertido a acetil-CoA, por oxidação catalisada pelo **complexo piruvato desidrogenase** ou por reação catalisada pela **piruvato-formiato liase**. As reações de conversão são as seguintes:



Note-se que, no primeiro caso, há redução de NAD<sup>+</sup> e produção de CO<sub>2</sub>.

Nas enterobactérias em anaerobiose, a piruvato-formiato liase é ativada e o complexo piruvato desidrogenase, inativado. Essa 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.

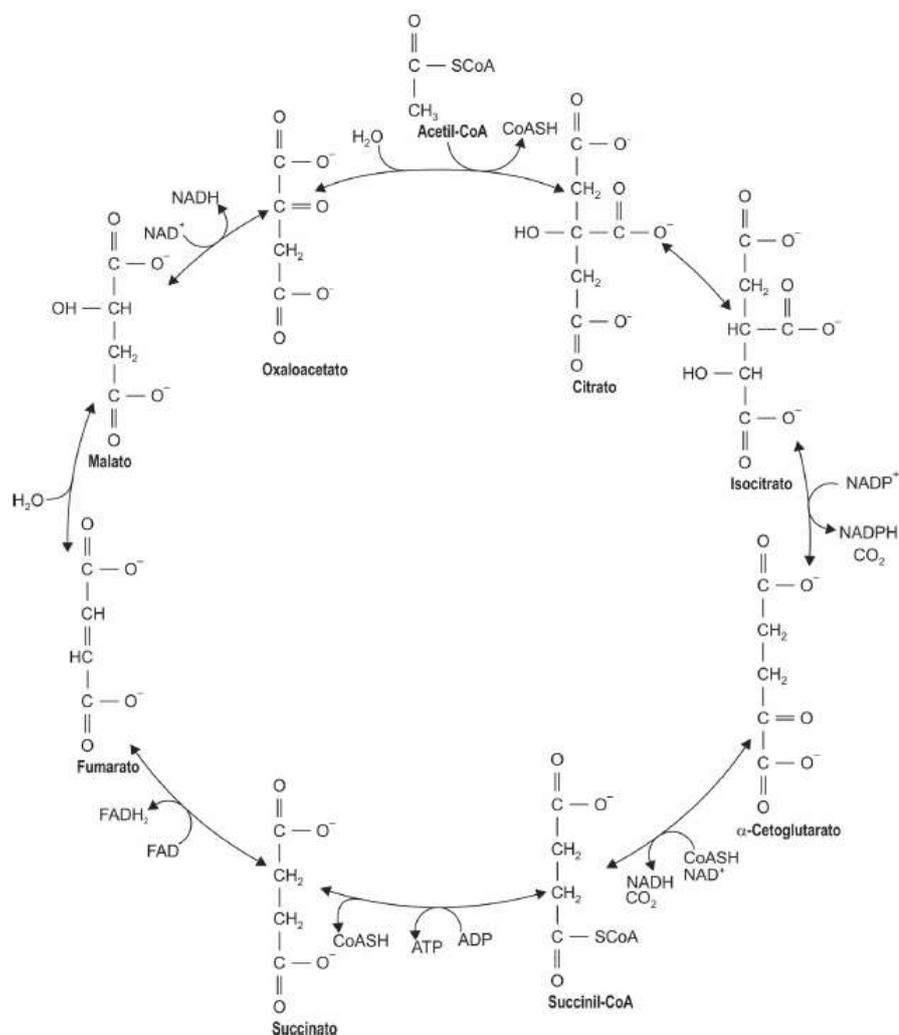
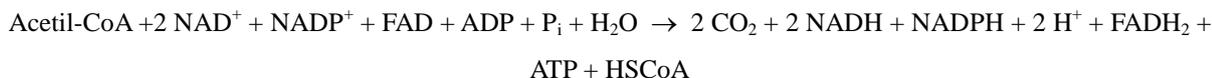


**Figura 3.8.** Diferentes destinos do piruvato. 1. Fermentações. 2. Descarboxilação oxidativa pelo complexo piruvato desidrogenase 3. Conversão a acetil-CoA pela piruvato-formiato liase. 4. Sínteses.

### 3.1.6 Ciclo de Krebs

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 desses compostos converge para a formação de acetil-CoA. A equação geral do ciclo de Krebs é a seguinte:



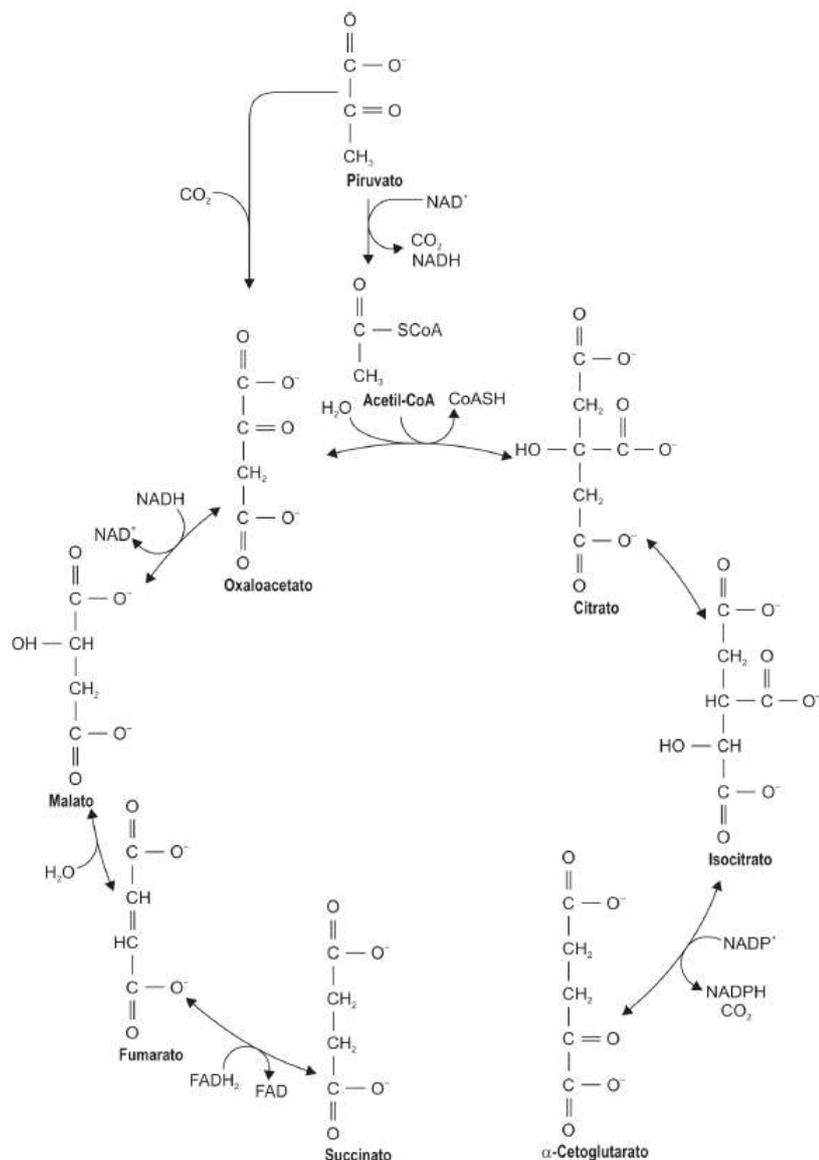
**Figura 3.9.** Ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs).

Na equação geral não aparece 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 1 mol de FADH<sub>2</sub>. Destaca-se que, na maioria das bactérias, ao contrário dos organismos eucarióticos, a coenzima da isocitrato desidrogenase é NADP<sup>+</sup> e não NAD<sup>+</sup>.

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:  $\alpha$ -cetogluturato, oxaloacetato e succinil-CoA.

### 3.1.7 Ramos oxidativo e redutor

Em algumas condições, o complexo  $\alpha$ -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,  $\alpha$ -cetogluturato e succinil-CoA por partes do ciclo, que são referidas como ramos **oxidativo** e **redutor** (Figura 3.10).



**Figura 3.10.** Ramos Oxidativo e Redutor.

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  $\alpha$ -cetoglutarato, 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.

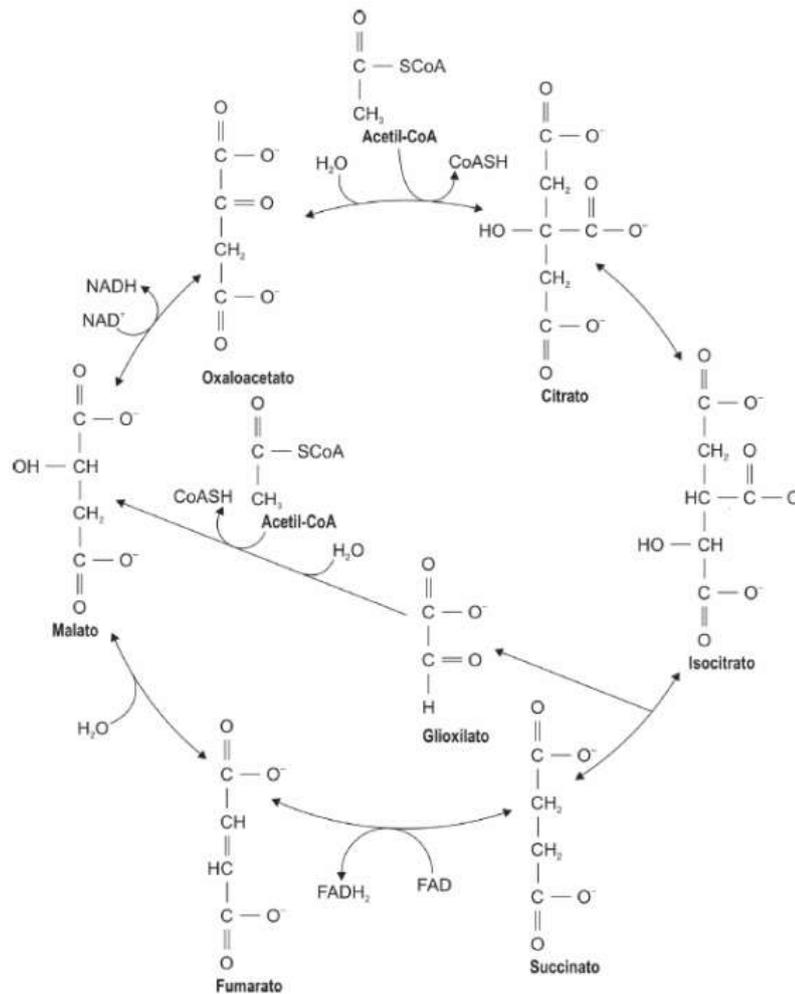
Comparando os ramos oxidativo e redutor com o ciclo de Krebs verifica-se que os ramos cumprem a função de suprir precursores para biossínteses, enquanto o ciclo, além dessa função, oxida acetil-CoA a  $\text{CO}_2$ . Essa oxidação está associada à redução de coenzimas que doam elétrons para a cadeia de transporte de elétrons. Assim, o ciclo também contribui para a produção de ATP, o que não ocorre quando os ramos são acionados.

### 3.18. Ciclo do glioxilato

Quando a única fonte de carbono presente no meio é acetato (ou compostos que originam acetato por oxidação, como os ácidos graxos), o ciclo de Krebs não pode ser acionado de forma plena, pois o acetato seria convertido a  $\text{CO}_2$  e a retirada de intermediários do ciclo para reações de biossíntese acarretaria o “esvaziamento” dos componentes do ciclo. Bactérias com capacidade de crescer em acetato ou ácidos graxos como única fonte de carbono devem essa 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. Essa via é designada **ciclo do glioxilato** (Figura 3.11). Neste ciclo, citrato e isocitrato são produzidos por reações comuns com as do 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:



O conjunto de reações do ciclo do glioxilato permite, portanto, a síntese de oxaloacetato usando os carbonos de acetil-CoA. Bactérias capazes de usar essa via podem, então, produzir carboidratos a partir de ácidos graxos, uma impossibilidade metabólica para os mamíferos.



**Figura 3.11.** Ciclo do glioxilato.

A **Tabela 3.2**, que lista os precursores obtidos nas vias metabólicas analisadas anteriormente, evidencia uma constatação: **uma única via metabólica não é capaz de fornecer elementos suficientes para a célula bacteriana crescer e multiplicar-se**. São necessárias pelo menos três delas para que 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.

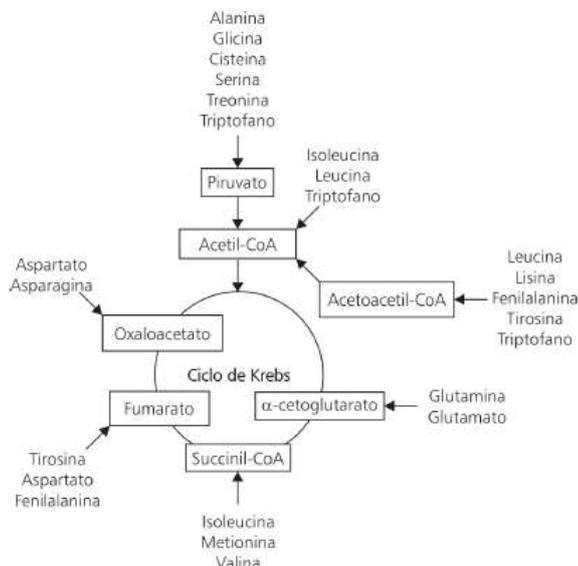
**Tabela 3.2.** Moléculas Precursoras e Vias e Reações que as produzem

Precusores	Vias produtoras						
	Via Glicolítica	Entner Doudoroff	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	-	-	-	+	-	-	+
$\alpha$ -cetoglutarato	-	-	-	-	+	+	-
Oxaloacetato	-	-	-	-	+	+	-
Succinil-CoA	-	-	-	-	+	+	-

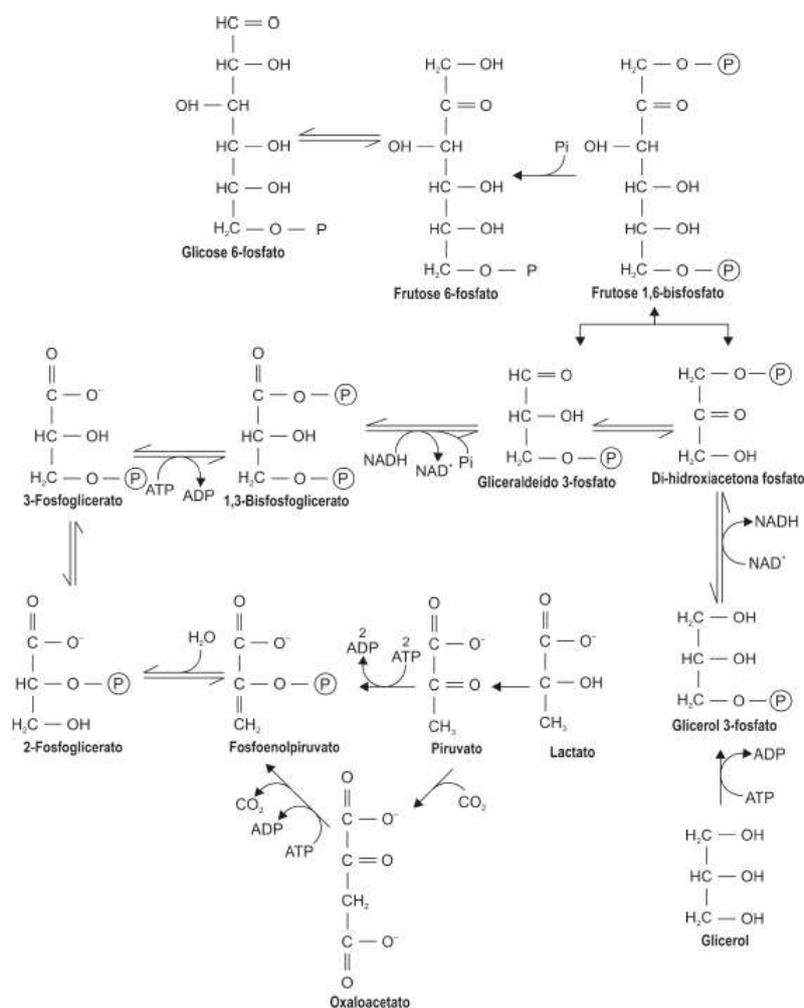
CPD = Complexo Piruvato Desidrogenase PFL = Piruvato-Formiato Liase  
 + = faz parte da via - = não faz parte da via +/- = faz parte de um dos tipo dessa via

### 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, acetoacetyl-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 formados nas vias de Embden-Meyrthof-Parnas, Entner-Doudoroff ou pentoses.

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

A partir de piruvato pode ser acionada uma via denominada **gliconeogênese** (**Figura 3.13**), que consiste na sua conversão a carboidrato, percorrendo reações no sentido inverso ao da glicolítica. Essa é a rota que permite a conversão de aminoácidos, ácidos graxos e lactato a glicose - esses compostos são primeiramente convertidos a piruvato. O mesmo não ocorre com o glicerol, que é convertido a di-hidroxiacetona fosfato. 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-bifosfato). Em bactérias, piruvato pode ser convertido diretamente em fosfoenolpiruvato. Em vários organismos, fosfoenolpiruvato é formado a partir de oxaloacetato. Todas essas reações requerem ATP.



**Figura 3.13.** Gliconeogênese.

O fosfoenolpiruvato é transformado em frutose 1,6-bifosfato pelas mesmas enzimas que participam da via de Embden-Meyerhof-Parnas catalisando reações reversíveis. A

desfosforilação de frutose 1,6-bifosfato por hidrólise do grupo fosfato, catalisada pela frutose 1,6-bifosfatase, 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. É interessante destacar que, mesmo em bactérias que utilizam a via de Entner-Doudoroff, a gliconeogênese ocorre como descrita aqui.

Com o concurso da gliconeogênese, muitos 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**).

## 3.2 AUTOTROFIA

Microrganismos autotróficos são aqueles capazes de se desenvolver utilizando  $\text{CO}_2$  como **única** fonte de carbono. Esse composto constitui a forma totalmente oxidada do carbono; convertê-lo em qualquer outro composto orgânico exige sua redução. Para tanto, energia (ATP) e poder redutor (NADPH) devem ser providos, pela luz ou pela oxidação de compostos inorgânicos.

Embora haja diferentes vias metabólicas bacterianas que promovem a fixação biológica do  $\text{CO}_2$  (incorporação do  $\text{CO}_2$  em moléculas orgânicas), neste texto será analisado o ciclo de Calvin-Benson, a via de fixação mais frequente.

### 3.2.1 Ciclo de Calvin-Benson

Para a fixação do  $\text{CO}_2$ , ou seja, sua incorporação em moléculas orgânicas, há necessidade de sua redução e de duas enzimas chave: a **ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco)** e a **fosforribuloquinase**. A primeira, ausente de células animais, é tida como a enzima mais abundante da biosfera. As outras enzimas do ciclo participam de outras vias metabólicas. O ciclo de Calvin-Benson é encontrado em Archaea, cianobactérias, bactérias púrpuras, na maioria das bactérias quimiolitotróficas e em plantas superiores. A primeira reação do ciclo (**Figura 3.14**), catalisada pela rubisco, constitui a etapa fundamental da incorporação do  $\text{CO}_2$  em uma molécula orgânica. Nesta reação, uma molécula de  $\text{CO}_2$  é ligada à ribulose 1,5-bifosfato 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-bifosfoglicerato; em seguida, sua redução a gliceraldeído 3-fosfato é análoga à reação que ocorre na gliconeogênese, mas usando NADPH como coenzima. Parte das moléculas

de gliceraldeído 3-fosfato é convertida em di-hidroxiacetona fosfato, que se combina com gliceraldeído 3-fosfato, formando frutose 1,6-bifosfato. 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 CO<sub>2</sub> e o gasto de ATP e de coenzimas reduzidas. O destino metabólico do CO<sub>2</sub> incorporado varia muito, e a formação de glicose é apenas uma das alternativas.

As reações seguintes são semelhantes a algumas da via das pentoses, levando à formação de ribulose 1,5-bifosfato, 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-bifosfato e 6 moléculas de CO<sub>2</sub>, haverá produção final de uma molécula de glicose 6-fosfato e a regeneração das 6 moléculas de ribulose 1,5-bifosfato. Para efetuar essas 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, sedo-heptulose 7-fosfato, eritrose 4-fosfato, 3-fosfoglicerato, gliceraldeído 3-fosfato, frutose 6-fosfato** e a **glicose 6-fosfato**.

Como nessa 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 àsquelas encontradas na via glicolítica. Em seguida, **acetil-CoA** é 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, nesse caso, é apenas biossintético e não tem por finalidade obter energia.



## PARTE B - ESTRATÉGIAS DE SOBREVIVÊNCIA

Neste capítulo, foram descritas as potencialidades dos microrganismos com relação aos precursores de esqueleto carbônico para biossíntese de constituintes celulares. Estas são as alternativas bacterianas observadas nos dias atuais, com vias que dependem do microrganismo considerado.

Para especular sobre a evolução que proporcionou o aparecimento dos 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. Essa análise, embora especulativa, baseia-se nas formas de vida atuais e suas estratégias de sobrevivência, uma vez que é impossível reconstituir o processo de diversificação metabólica ocorrido nos organismos procarióticos desde a origem da vida.

A análise das estratégias metabólicas será focada 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 nesse período provocou mudanças no ambiente que, por sua vez, exerceram forte pressão seletiva e profundos ajustes nas estratégias até então existentes. O segundo período é caracterizado pelo surgimento do O<sub>2</sub>, mudando as condições vigentes no planeta e criando condições para o surgimento de estratégias metabólicas mais eficientes e relegando a nichos específicos aquelas preexistentes.

### 3.3 A VIDA EM ANAEROBIOSE

#### 3.3.1 Quimiotróficos

Os primeiros seres vivos eram anaeróbios. Organismos quimiotróficos obtêm energia pela oxidação de compostos químicos, podendo ser quimiolitotróficos (oxidam compostos químicos) ou quimiorganotróficos (oxidam compostos orgânicos). Na origem da vida, a oxidação de compostos químicos ocorria em anaerobiose. A forma mais simples de oxidação anaeróbia de matéria orgânica é o processo de fermentação, que será apresentado inicialmente e permite apenas a obtenção de energia por fosforilação no nível do substrato. A oxidação de compostos inorgânicos, bem como a oxidação mais eficiente de compostos orgânicos exigirá um processo de fosforilação oxidativa, ou seja, envolvendo cadeias de transporte de elétrons. Assim, antes de

abordar esses processos metabólicos será feita uma apresentação geral de cadeias de transporte de elétrons mostrando a diversidade destas em bactérias.

### 3.3.1.1 Fermentações de açúcares

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 para a síntese de macromoléculas, admitindo também que as células primitivas teriam um repertório reduzido de atividades biossintéticas e uma estrutura celular bastante simples. Apesar de ainda existirem bactérias com essas 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). Essas células são, portanto, capazes de sintetizar todos os constituintes celulares a partir de um único tipo de molécula orgânica.

Supõe-se que alguns dos primeiros organismos eram heterotróficos e apresentavam uma estrutura celular simples, com uma membrana plasmática sem complexidade, constituída de poucas proteínas funcionais. Não deveriam existir, nessas 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 degradavam compostos orgânicos por um processo denominado **fermentação**. Nesse tipo de metabolismo, as reações de oxirredução ocorrem no citosol 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 essa 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 a obtenção de energia:

a. a produção de ATP fica restrita às reações de fosforilação no nível do substrato; não existe fosforilação oxidativa.

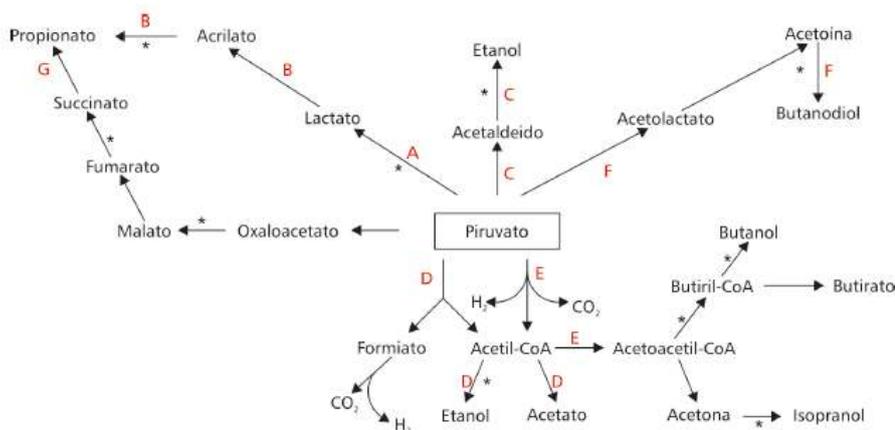
b. a oxidação do substrato inicial é incompleta e os produtos finais da fermentação, excretados no meio, podem ser utilizados como substrato oxidável por outros organismos.

A fosforilação no nível do substrato é um processo mais simples e com menor rendimento do que a fosforilação oxidativa. Em determinadas vias metabólicas ocorrem reações que permitem a incorporação de um íon fosfato a uma molécula orgânica; em reação subsequente, o grupo fosfato é transferido para o ADP (**Figura 3.4**), caracterizando a fosforilação no nível do substrato. Uma parcela dos microrganismos sobrevive utilizando apenas esse 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.

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.

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 3.15**). 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 têm um tipo de fermentação em que outros produtos não ácidos são liberados, tornando a acidificação menos intensa, o que é vantajoso, por não inibir o crescimento bacteriano.



**Figura 3.15** – 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), bactérias do ácido propiônico (G). As reações assinaladas com asterisco são as que promovem a reoxidação de coenzimas.

Uma vez que os produtos excretados pelos processos fermentativos são bases conjugadas de Brönsted (lactato, propionato, butirato etc.), e não ácidos (lático, propiônico, butírico etc.), não é imediato o entendimento da razão pela qual o meio de cultura em que cresce um microrganismo fermentativo sofre acentuada redução de pH. A explicação é obtida pelo mecanismo de excreção da base conjugada: trata-se de cotransporte com prótons.

### Fermentação láctica

No caso em que o NADH produzido pela oxidação da glicose reduz o piruvato a lactato, a fermentação é chamada **láctica**. Esse tipo de fermentação é encontrado em bactérias que fazem parte da microbiota habitante 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, formam-se lactato, etanol, CO<sub>2</sub>, acetato etc. (*Leuconostoc* e *Bifidobacterium*).

Bactérias homo e heterolácticas podem ser distinguidas por usar ou não a via da fosfoctolase. As homolácticas metabolizam carboidratos pela via de Embden-Meyerhof-Parnas. Os dois mols de piruvato geram lactato ou são utilizados como precursores de biossíntese. As heterolácticas produzem simultaneamente piruvato e acetilfosfato a partir da oxidação da glicose pela via da fosfoctolase (**Figura 3.7A**). O piruvato pode ser convertido a lactato e o acetilfosfato a acetato e/ou etanol, originando vários produtos de fermentação; o lactato corresponde a menos de 50% destes.

### Fermentação propiônica

A fermentação de glicose ou outros substratos, formando propionato, acetato e CO<sub>2</sub> como principais produtos, caracteriza essa fermentação (**Figura 3.15**). 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 (**Figura 3.15 item B**); a outra é realizada a partir de succinato, que é isomerizado a metilmalonato e este descarboxilado a propionato (**Figura 3.15 item H**).

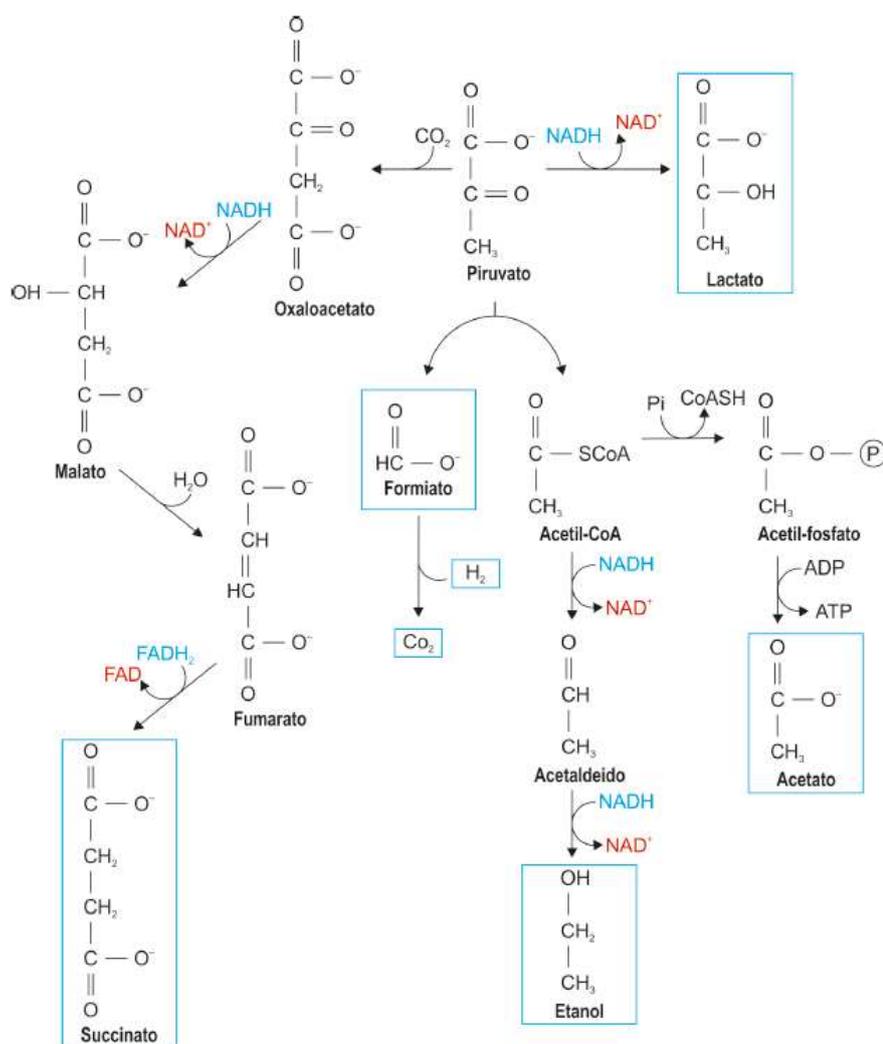
### Fermentação fórmica

Nesse 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<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. De acordo com os demais produtos finais, 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;

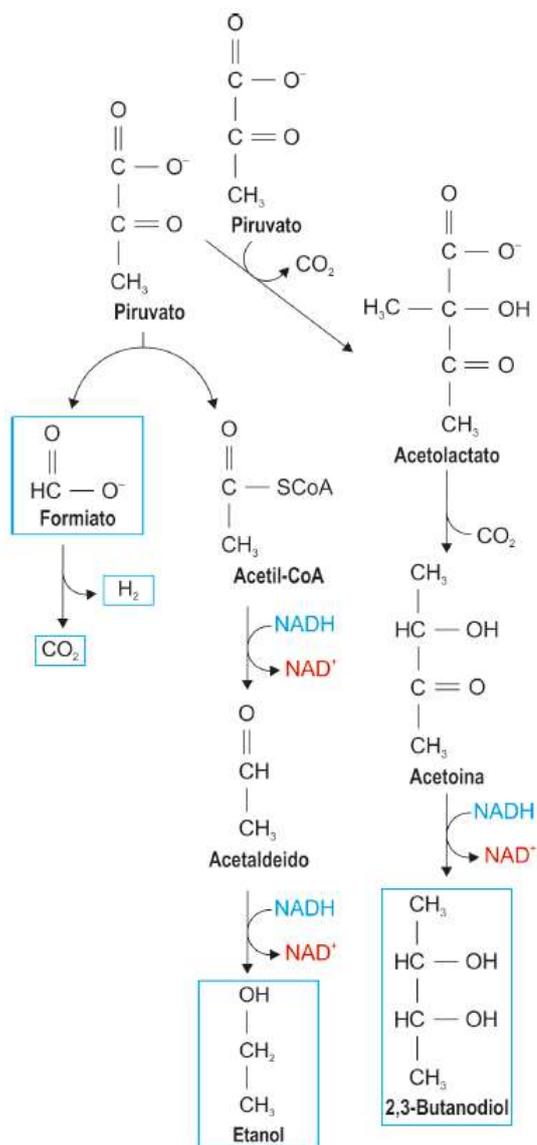
(2) outra molécula de piruvato origina acetil-CoA que é reduzida a acetaldeído, e este, novamente reduzido a etanol;

(3) 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 3.16**). Fermentação desse tipo é realizada principalmente por *Escherichia coli* e pelos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Vibrio* e *Yersinia*.



**Figura 3.16** – 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, a acetoina e o butanodiol (**Figura 3.17**). É realizada pelos gêneros *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Bacillus* etc.



**Figura 3.17** – Fermentação do butanodiol. Os produtos finais estão indicados em azul.

### 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  $\text{NADH}$ ;

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

Em *Zymomonas mobilis*, a oxidação da glicose a piruvato leva à redução de dois mols de  $\text{NAD}^+$ , que são reoxidados na formação de etanol pela primeira via mencionada (1), permitindo que este seja o único produto de fermentação (**Figura 3.15**). Por outro lado, *E. coli*

produz etanol utilizando a segunda via mencionada (2) (**Figura 3.16**). Assim, são reduzidos dois mols de  $\text{NAD}^+$  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, de modo semelhante ao que ocorre na fermentação ácido mista.

### **BOXE 1**

#### **As fermentações de açúcares geram produtos de interesse para o homem**

Além das fermentações descritas neste texto, 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. A fermentação de carboidratos por leveduras, levando à produção de etanol e  $\text{CO}_2$ , tem extensa utilização em panificação. 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 desses cátions. O lactato é também o monômero para produção de polilactato, um polímero com diversas aplicações como termoplástico.

Ainda na área de alimentos, *Propionibacterium* é utilizada na fermentação para a produção do queijo suíço, cujo sabor característico se deve ao propionato formado e os “buracos” internos, à formação de  $\text{CO}_2$ . O ácido propiônico pode ser usado como conservante de alimentos, como o pão, inibindo o crescimento de fungos e de bactérias. O ácido propiônico também tem 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 melado de cana-de-açúcar por leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

**BOXE 2****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 da 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. Nesses valores de pH, ocorre significativa desmineralização do esmalte: a hidroxiapatita, seu principal constituinte, libera íons  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ , e sua estrutura é alterada. O dente perde assim a importante proteção que o esmalte constitui.

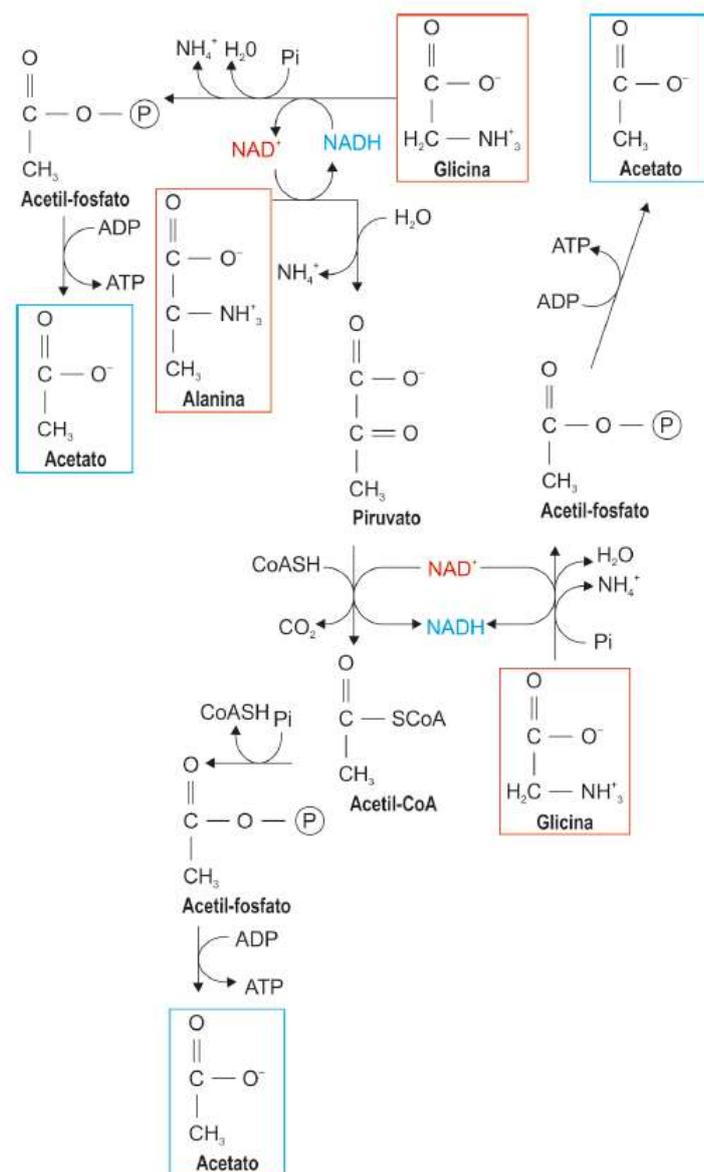
**3.3.1.2 Fermentação de aminoácidos**

Alguns grupos de bactérias são incapazes de utilizar açúcares como substratos oxidáveis, mas conseguem viver anaerobiamente fermentando aminoácidos. Nesse processo, um determinado aminoácido atua como doador de elétrons, recebidos ao final por 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 3.18**). Nessa reação, o aminoácido é oxidado a acetil-CoA, com redução de  $\text{NAD}^+$ . 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 na 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 3.18.** – Fermentação de alanina, um exemplo de fermentação de aminoácidos.

Antes de tratar dos outros metabolismos diferentes da fermentação é importante considerar um mecanismo de produção de ATP presente em todos eles: a fosforilação oxidativa.

### 3.3.1.3. Fosforilação oxidativa e cadeia de transporte de elétrons

A fosforilação oxidativa é um processo muito mais complexo do que a fosforilação no nível do substrato 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. A **fotofosforilação**, um caso particular, está descrita como parte dos metabolismos fototróficos.

Na fosforilação oxidativa, tanto compostos orgânicos como inorgânicos são oxidados e seus elétrons são transferidos, até um aceptor final, não diretamente, mas por passagens intermediárias por compostos constituintes da membrana plasmática. O conjunto desses compostos é designado **cadeia de transporte de elétrons**. Concomitantemente à transferência de elétrons do doador inicial até o aceptor final da cadeia, ocorre extrusão de prótons do citoplasma para o exterior. Como consequência, o citoplasma fica com pH maior do que o exterior, formando-se um 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*. Ao domínio citoplasmático da ATP sintase estão ligados ADP e fosfato, que reagem formando ATP quando do retorno dos prótons. Esse 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.

As cadeias de transporte de elétrons são formadas por um conjunto de compostos que incluem flavoproteínas, proteínas ferro-enxofre, quinonas e citocromos.

Nas mitocôndrias, esses 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.

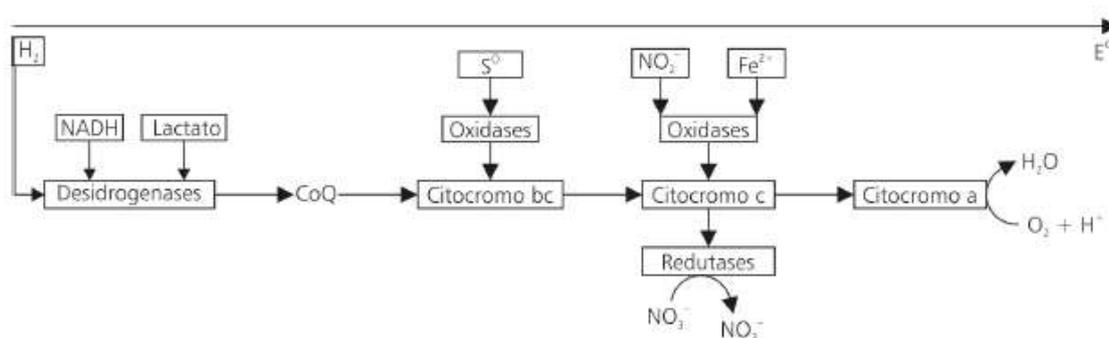


Faz parte das cadeias de transporte de elétrons um tipo especial de proteínas com capacidade de receber e doar elétrons, designadas **proteínas ferro-enxofre** ou ferredoxinas. Como seu nome sugere, esse tipo de proteína contém grupos de átomos de ferro e enxofre, em diferentes arranjos: pode-se encontrar, 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 ao ferro que as proteínas ferro-enxofre devem suas propriedades oxidorreduzoras, pois este íon oscila intermitentemente entre a forma  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , quando doa ou recebe 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. Essas proteínas são, por isso, muitas vezes referidas como possuindo ferro não

hêmico. As proteínas ferro-enzofre são um dos componentes das desidrogenases ligadas à membrana e também do complexo de citocromos *b-c1*.

Flavoproteínas têm como grupo prostético flavinas (flavina mononucleotídeo – FMN ou flavina dinucleotídeo – FAD) e ao serem reduzidas recebem dois elétrons e dois prótons.

Nas bactérias, as cadeias de transporte de elétrons estão dispostas na membrana citoplasmática e são mais variadas, por haver diferentes doadores iniciais de elétrons, diferentes transportadores intermediários e diferentes aceptores finais. Em virtude da diversidade de substratos doadores de elétrons (**Figura 3.19**), 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. Essas cadeias podem conter desde uma até três bombas de prótons (como nas mitocôndrias).



**Figura 3.19.** 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.

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

### Desidrogenases

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

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

Par redox	$E'_0$ (V)
CO <sub>2</sub> /formiato	-0,432
H <sup>+</sup> /H <sub>2</sub>	-0,410
Fd <sub>ox</sub> /Fd <sub>red</sub> ( <i>Clostridium</i> )	-0,410
NAD <sup>+</sup> /NAD	-0,320
Lipoico/diidrolipofílico	-0,290
S <sup>0</sup> /H <sub>2</sub> S	-0,270
FAD/FADH <sub>2</sub>	-0,220
acetaldeído/etanol	-0,197
FMN/FMNH <sub>2</sub>	-0,190
Piruvato/lactato	-0,185
Oxaloacetato/malato	-0,170
Menaquinona (ox/red)	-0,074
cyt b <sub>558</sub> (ox/red)	-0,075 a -0,043
Fumarato/succinato	+0,033
Ubiquinona (ox/red)	+0,100
cyt b <sub>556</sub> (ox/red)	+0,046 a +0,129
cyt b <sub>562</sub> (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 <sub>555</sub> (ox/red)	+0,355
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+0,421
Fe <sup>3+</sup> /Fe <sup>2+</sup>	+0,771
O <sub>2</sub> (1 atm)/H <sub>2</sub> O	+0,815

**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 dois elétrons e um próton a FMN que se reduz formando FMNH<sub>2</sub> usando também um próton do citosol. 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.

**Lactato desidrogenase** – Além da lactato desidrogenase citosólica, que catalisa a redução de piruvato a lactato na fermentação, muitas bactérias expressam uma lactato



complexos redutases por complexos oxidases. Por exemplo: quando crescem anaerobiamente, em um meio contendo um aceptor final, bactérias facultativas produzem complexos redutases em vez de complexos oxidases, permitindo a utilização do aceptor de elétrons disponível. Da mesma forma, a síntese de algumas desidrogenases pode ser reprimida ou estimulada dependendo dos doadores de elétrons disponíveis.. 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 proteínas transportadoras de elétrons que têm um ou mais grupos heme como grupo prostético. Existem 5 classes de grupos heme que distinguem os citocromos bacterianos: hemes *a*, *b*, *c*, *d* e *o*; a composição de hemes é utilizada para denominar os diferentes citocromos: citocromo *b*, *d*, *c*, *o*, *bo*, *bd* etc.

Os citocromos são oxidases que recebem no seu grupo heme um elétron do componente da cadeia que o antecede. Alguns citocromos transferem o seu elétron para o O<sub>2</sub>, reduzindo-o a água, e são denominados **oxidases terminais**. Nas bactérias são encontradas diferentes oxidases terminais e, com frequência, duas ou três estão presentes na mesma bactéria. Ao contrário, a mitocôndria tem 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; é 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 têm 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 (citocromos *o* e *d*), mas não possui citocromo *c* oxidases. Sob baixa tensão de oxigênio, a bactéria expressa o citocromo *d*, que tem maior afinidade por oxigênio do que o citocromo *o*. 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.

Devido à grande diversidade de compostos inorgânicos que podem ser oxidados por bactérias, as enzimas relacionadas à retirada de elétrons recebem nomes bastante diversificados, em geral relacionados aos substratos doadores. Os elétrons retirados destes substratos são transferidos para diferentes componentes da cadeia de transporte de elétrons dependendo do seu potencial de redução, levando a grandes variações na quantidade de ATP produzido.

### Rendimento energético da cadeia respiratória

Os componentes da cadeia de transporte de elétrons estão dispostos ao longo da membrana plasmática de acordo com seus potenciais de redução padrão ( $E^{\circ}$ ), cujos valores estão mostrados na **Tabela 3.3**. Os elétrons partem do doador reduzido, que tem  $E^{\circ}$  menor que os componentes da cadeia de transporte de elétrons, e percorrem uma sequência de transportadores com  $E^{\circ}$  crescentes, até atingirem o acceptor final, que tem o maior  $E^{\circ}$ . As transferências de elétrons entre esses 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 ou cloroplastos, 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 ( $E^{\circ}$ ) do doador de elétrons e do acceptor final, segundo a equação

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

em que,

$\Delta G^{\circ}$  = variação de energia livre padrão

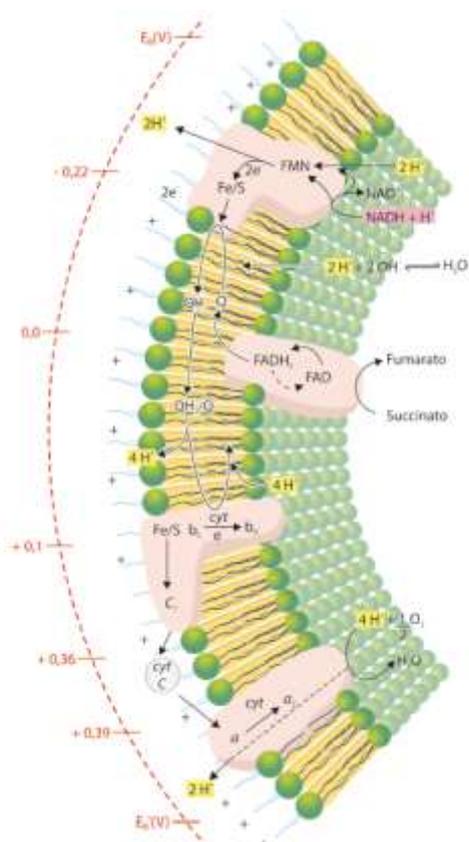
$n$  = número de elétrons transferidos

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

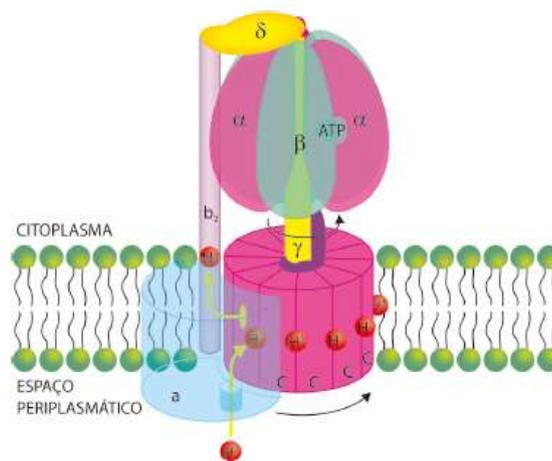
$\Delta E^{\circ}$  = diferença entre os valores de potencial de redução padrão do acceptor e do doador de elétrons.

### 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 de oxidorredução ocorrem acopladas à extrusão de prótons são chamados **sítios de acoplamento**. Como consequência um **gradiente de prótons** é produzido, isto é, uma concentração diferente de prótons dentro e fora da célula (**Figura 3.21**). No máximo 10 prótons são 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, o **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 3.22**).



**Figura 3.21.** 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 3.22.** Modelo de ATP sintase de *Escherichia coli*.

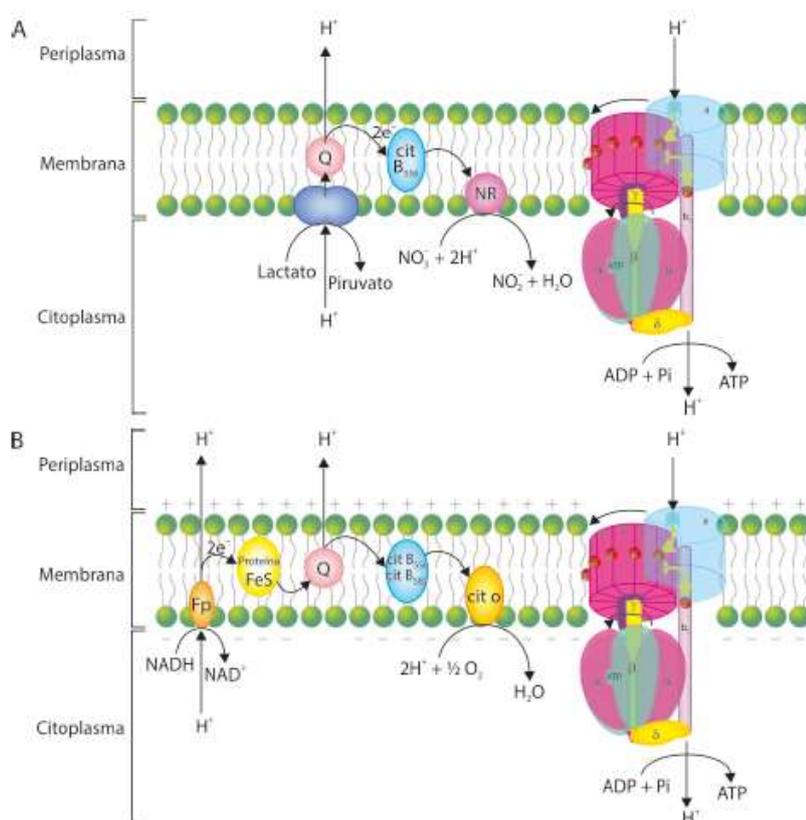
O exato mecanismo do bombeamento de prótons ainda é objeto de controvérsia. Uma hipótese explicativa baseia-se no fato de alguns transportadores de elétrons, ao serem reduzidos, captarem prótons do citosol e, ao transferirem elétrons para o composto seguinte da cadeia, liberarem prótons fora da membrana. Essa alternativa só se aplica às transferências de elétrons associadas à captação/expulsão de prótons. Nos casos em que isso 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. Essas diferenças de conformação provocariam alteração no valor de pKa de alguns grupos ionizáveis da cadeia lateral de aminoácidos presentes no domínio externo de proteínas de membrana, que, dissociando, liberariam prótons para o exterior.

#### **3.3.1.4. Respiração anaeróbia organotrófica.**

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 anaeróbia. Esta cadeia é mais simples que a aeróbia e deve ter surgido antes de haver oxigênio na atmosfera precedendo a fotofosforilação anaeróbia. Apesar de outros processos mais eficientes terem surgido, em ambientes anaeróbios esses processos ainda são encontrados.

Na respiração anaeróbia, as bactérias utilizam como aceptor de elétrons um composto exógeno diferente do oxigênio, inorgânico ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) ou orgânico (fumarato). A cadeia de transporte de elétrons anaeróbia é constituída por desidrogenases e redutases, interligadas por quinonas e citocromos. O rendimento do processo é maior do que o das vias fermentativas, porém menor do que o da respiração aeróbia (**Figura 3.23**). 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 o aceptor final é catalisada por redutases diferentes, específicas para cada aceptor: nitrato redutase, nitrito redutase, sulfato redutase etc. Essas enzimas têm função análoga à das oxidases terminais da cadeia de transporte de elétrons aeróbia, mas, no caso da respiração anaeróbia, são sempre designadas redutases. A presença dessas enzimas nas células é indicativa da ocorrência de respiração anaeróbia, uma vez que sua síntese é reprimida por oxigênio.

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



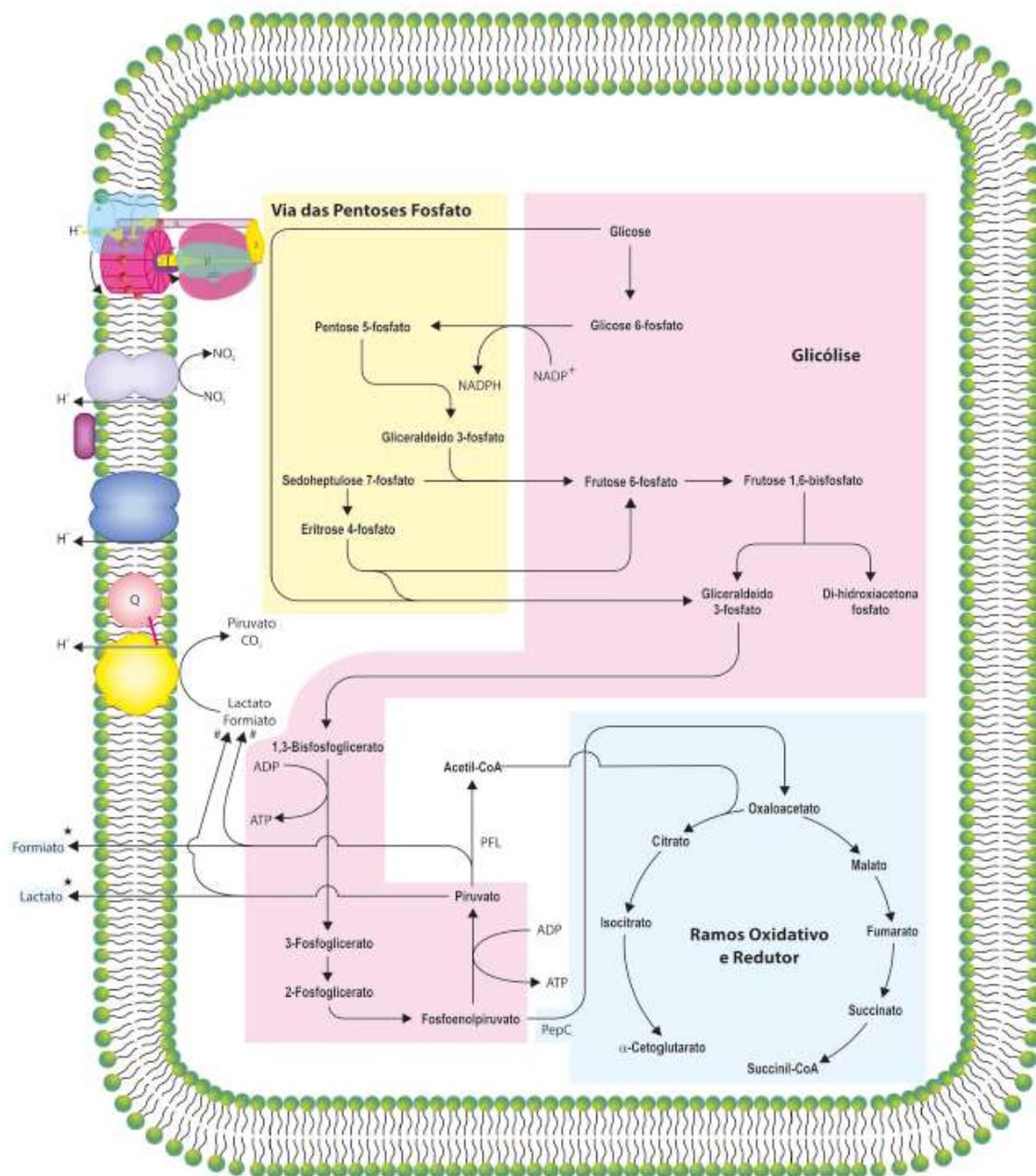
**Figura 3.23.** Cadeia de transporte de elétrons anaeróbia (A) e aeróbia (B) em *E. coli*.

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* e outras enterobactérias em anaerobiose, a ausência do complexo  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase induz o funcionamento dos ramos redutor e oxidativo (**Figura 3.10**). Isso ocorre na ausência ou a 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 isso ocorre com as bactérias em anaerobiose. Por exemplo, *Pseudomonas stutzeri*, em

anaerobiose, não fermenta - faz 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 3.24**). NADP<sup>+</sup> é reduzido principalmente na via das pentoses, mas também pode ser reduzido na via de Entner-Doudoroff ou pela isocitrato desidrogenase. 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.



**Figura 3.24** Esquema geral de fermentação (ou respiração anaeróbia).

### 3.3.1.5 Respiração anaeróbia litotrófica.

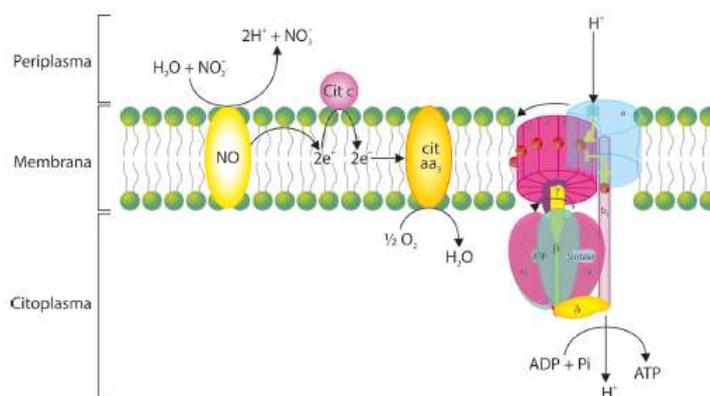
Nas condições primitivas da Terra, a oxidação de compostos químicos inorgânicos (metabolismo quimiolitotrófico) representava uma das formas de obter energia e poder redutor, permitindo gerar matéria orgânica a partir de  $\text{CO}_2$ . O oxigênio ainda não estava disponível, e os primeiros quimiolitotróficos dependiam de outros compostos como aceptores finais de elétrons. Como esses compostos têm potenciais de redução menores que o do oxigênio, a quantidade de energia obtida pelos microrganismos com a oxidação anaeróbia era pequena. O baixo rendimento não constituía desvantagem competitiva, uma vez que os demais tipos de metabolismo vigentes também resultavam em pouca energia útil. Atualmente, compostos inorgânicos reduzidos podem originar-se de atividades humanas, vulcânica, de depósitos geológicos ou de algumas atividades biológicas que geram compostos inorgânicos reduzidos: respiração anaeróbia, assimilação de  $\text{NO}_3^-$  e outros compostos, fixação biológica de  $\text{N}_2$  etc.

Muitos quimiolitotróficos são capazes de utilizar  $\text{CO}_2$  como única fonte de carbono e são denominados **quimiolitotróficos**. Quando o conceito de quimiolitotrófico foi estabelecido por Winogradsky, aplicava-se exclusivamente a quimiolitotróficos estritos, ou seja, bactérias capazes de obter energia exclusivamente pela oxidação de compostos inorgânicos e utilizando  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono. Entretanto, há variantes nos tipos metabólicos 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, além de  $\text{CO}_2$ , inclui compostos orgânicos. A mixotrofia ocorre apenas em baixas concentrações de nutrientes e as vias são acionadas em função da predominância de um tipo de substância, orgânica ou inorgânica.

As bactérias autotróficas estritas necessitam de outras reações, além das do ciclo de Calvin-Benson, para obter os 13 intermediários precursores. Essas 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 essas reações têm a função apenas de suprir os intermediários precursores e não representam uma estratégia para oxidar completamente a acetil-CoA. A **Figura 3.25** apresenta uma rede metabólica que deve funcionar em organismos quimioautotróficos.



(quimiolitotróficas), 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 oceptor final ( $O_2$ ) é o mesmo (**Tabela 3.3**). Nesses casos, a variação de energia livre resultante da transferência de elétrons entre o doador e o receptor de elétrons é similar. Em bactérias do gênero *Acidithiobacillus*, o fluxo de elétrons inicia-se 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 3.26**). Uma consequência importante da pouca diferença entre os potenciais de redução do doador e do receptor 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 é oxidada e o crescimento dessas bactérias é lento.



**Figura 3.26.** Cadeia de transporte de elétrons produtora de ATP em *Nitrobacter*.

### Obtenção de NADPH

Assim como as bactérias heterotróficas, as autotróficas necessitam de ATP e NADPH para as biossínteses. Adicionalmente, também dependem dessas coenzimas para promover a redução do  $CO_2$  a compostos orgânicos, processo denominado **fixação de  $CO_2$** . Organismos autotróficos estritos suprem essa necessidade a partir de uma fonte de elétrons independente da fonte de carbono, tornando-os capazes de sintetizar matéria orgânica utilizando exclusivamente matéria inorgânica para obter energia e NADPH. Os procariontes autotróficos que realizam

fotosíntese cíclica e os quimiolitotróficos obtêm poder redutor, o NADPH, por redução de  $\text{NADP}^+$  envolvendo uma cadeia de transporte de elétrons reversa.

### O transporte reverso de elétrons promove a redução de $\text{NADP}^+$

No metabolismo quimiolitotrófico autotrófico, o mesmo substrato reduzido é doador de elétrons para produção de ATP e para a redução de  $\text{NADP}^+$ . Como o doador de elétrons é exógeno, a enzima que catalisa sua oxidação está localizada na membrana celular e faz parte da cadeia de transporte de elétrons. Os compostos inorgânicos (exceto  $\text{H}_2$ ) transferem elétrons para intermediários da cadeia de transporte de elétrons com potencial de redução superior ao do  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  (**Figura 3.27**). Os elétrons têm dois destinos: (1) seguem a via dos compostos com potenciais de redução crescentes, gerando força próton motriz e formando ATP, ou (2) são transferidos para componentes da cadeia de transporte de elétrons com potenciais de redução decrescentes, até o  $\text{NADP}^+$ , produzindo NADPH. Ambos os “caminhos” são termodinamicamente favoráveis, como está descrito a seguir.

Um exemplo desse processo é encontrado em bactérias que oxidam compostos de enxofre. Os elétrons deles derivados são transferidos para a cadeia respiratória no nível dos citocromos, em razão dos valores de seus potenciais de redução. A redução do  $\text{NADP}^+$  ocorre com os elétrons fluindo no sentido dos **menores** potenciais de redução padrão. Esse mecanismo é conhecido como **transporte reverso de elétrons** (**Figura 3.27**). O fluxo reverso de elétrons é explicado pelo fato de o sentido da transferência de elétrons (assim como o sentido de qualquer reação química) ser estabelecido pelo valor de  $\Delta G$ , e não de  $\Delta G^0$ . O sentido da transferência depende, portanto, das concentrações relativas das espécies envolvidas, e, na situação em análise, a espécie doadora de elétrons (compostos de enxofre), reduzida, está muito mais concentrada do que a coenzima receptora ( $\text{NADP}^+$ ), oxidada. Os valores dos potenciais de redução deixam de ser os valores padrão ( $E^0$ ) e passam a ser calculados segundo a equação:

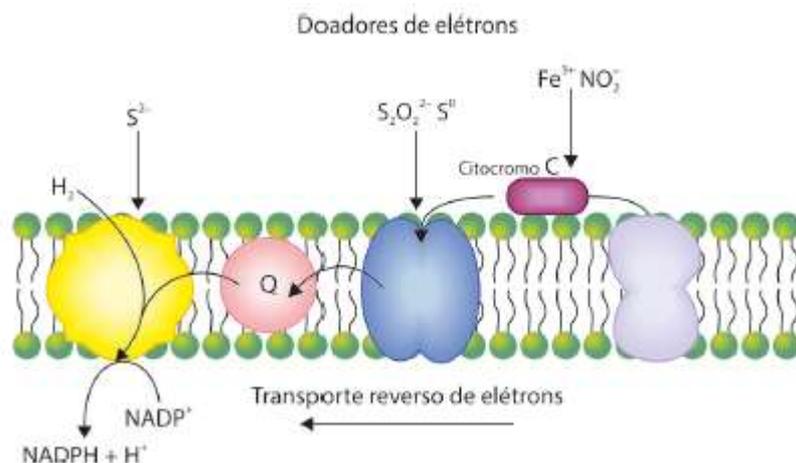
$$E = E^0 + \frac{2,3 RT}{nF} \log \frac{[\text{forma oxidada}]}{[\text{forma reduzida}]}$$

Os “novos” valores de E tornam o valor de  $\Delta G$  da equação seguinte compatível com o transporte eletrônico reverso.

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

O transporte de elétrons ocorre concomitantemente nos dois sentidos, e são reciprocamente regulados. O transporte de elétrons no sentido dos potenciais de redução crescentes leva à formação do gradiente de prótons, associado à síntese de ATP. O transporte no

sentido contrário (no sentido dos potenciais de redução decrescentes) dissipa o gradiente de prótons, mas permite a redução de  $\text{NADP}^+$ .



**Figura 3.27.** Redução de  $\text{NADP}$  pela Cadeia de transporte de elétrons reversa

No caso das bactérias fotossintetizantes 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  $\text{H}_2\text{S}$  ou compostos orgânicos. O mecanismo é similar ao descrito para bactérias quimioautotróficas, ou seja, transporte eletrônico reverso, no qual o  $\text{NADP}^+$  é o acceptor final dos elétrons.

### 3.3.2. Fotossíntese

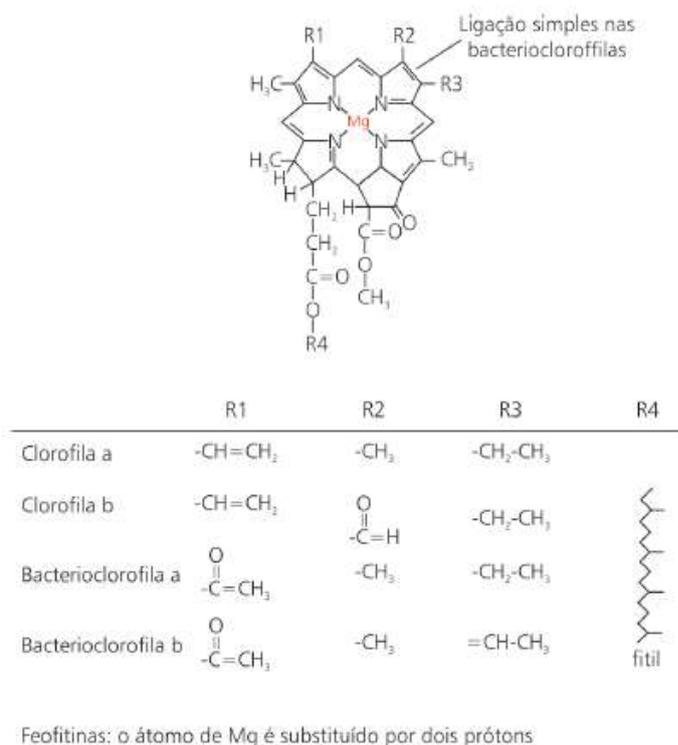
Um processo biológico fundamental, do qual todos os outros dependem, é a fotossíntese, que consiste na conversão da energia luminosa em energia química. Os organismos atuais capazes de realizá-la são alguns grupos de bactérias, as algas e as plantas. Os outros seres vivos usam a energia química contida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

A fotossíntese promove a **fotofosforilação** - o processo de obtenção de ATP a partir da energia luminosa. Nesse processo, a energia luminosa, recebida por pigmentos celulares especiais, é transferida a outros pigmentos capazes de emitir elétrons. O elétron emitido é transferido por uma cadeia de transporte de elétrons até um acceptor 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 acceptor final, o tipo de fotossíntese é cíclico ou não cíclico. O surgimento da fotossíntese não cíclica provocou uma grande revolução metabólica: a

fotossíntese cíclica é anoxigênica e a fotossíntese acíclica é oxigênica. A produção de oxigênio modificou profundamente o ambiente e proporcionou novas possibilidades metabólicas.

### 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 outras bactérias (**Figura 3.28**). Existem diferentes tipos de bacterioclorofilas, que se caracterizam por apresentar picos de absorção luminosa em comprimentos de onda diferentes; a presença de diferentes pigmentos aumenta a amplitude do espectro luminoso aproveitado e contribui para a distribuição desses organismos por diferentes ambientes.



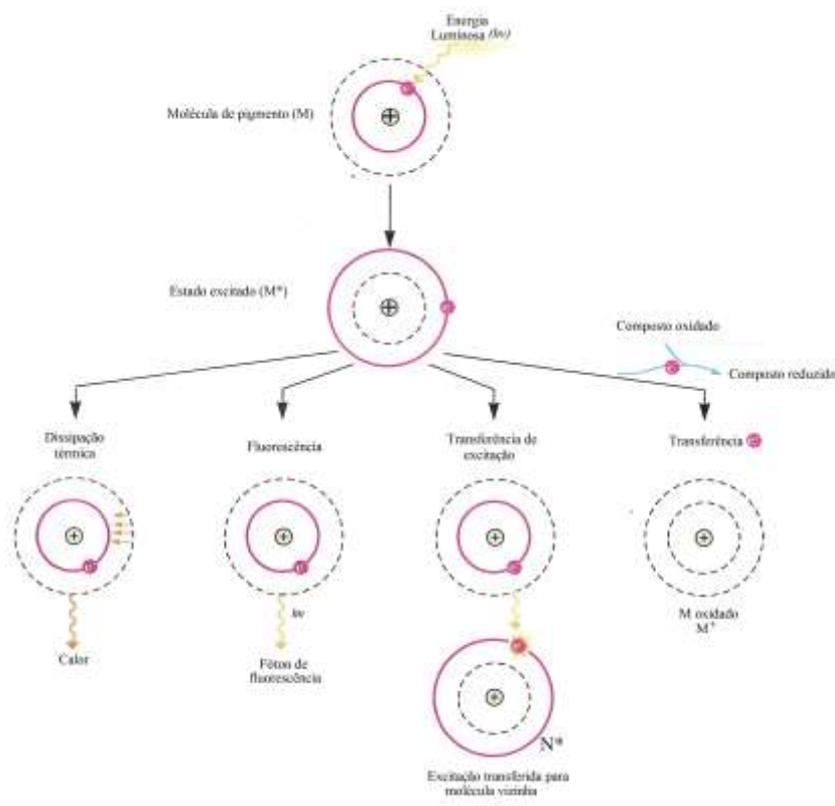
**Figura 3.28.** Estruturas das clorofilas, bacterioclorofilas, feofitinas e bacteriofeofitinas. O longo e hidrofóbico radical fitil, presente em todas estas moléculas, possivelmente auxilia a solubilidade em meio apolar.

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 a 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 depende de 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 molécula deixa o estado fundamental, mas retorna a ele quando perde energia por quatro processos diferentes: dissipação como calor; emissão de luz; transferência da excitação para outra molécula e emissão do elétron, reduzindo outro composto (**Figura 3.29**).



**Figura 3.29** – 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, expandindo o espectro luminoso aproveitado. A energia por eles absorvida é transferida de uma molécula para outra, até o centro de reação, onde excitam moléculas de bacterioclorofila (**Figura 3.29C**) chamadas **par especial**. Essas moléculas têm a propriedade especial de emitir elétrons (**Figura 3.29D**). 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.

### 3.3.2.1 Fotossíntese cíclica

Na fotofosforilação cíclica (**Figura 3.30**), os elétrons emitidos pelo centro de reação a ele retornam depois de percorrer uma cadeia de transportadores de elétrons.

As bactérias púrpuras do enxofre, fotossintetizantes anaeróbias, contêm uma bacterioclorofila com o pico de absorção da luz em 870 nm. Os pigmentos acessórios absorvem energia e transferem a excitação para o par especial, a bacterioclorofila  $P_{870}$ , localizada no centro de reação. Esta bacterioclorofila, quando excitada, tem seu potencial de redução muito reduzido e torna-se 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  $bc_1$ . Este citocromo transfere os elétrons para o citocromo  $c_2$  que os devolve para a bacterioclorofila  $P_{870}$ , fechando o ciclo. No nível do citocromo  $bc_1$ , 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 desprendimento de oxigênio, esse tipo de fotossíntese é chamada **não oxigênica**, ou **anoxigênica**, que tem por finalidade a formação de ATP.



era anaeróbio. Um apoio para essa 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 anaeróbias vivem atualmente em fundos de lagos. Os processos utilizados para a obtenção dos 13 precursores e de NADPH em bactérias que fazem fotossíntese anoxigênica não são essencialmente diferentes dos utilizados por bactérias quimioautotróficas. A produção de ATP, por sua vez, representa uma especialização dessas células, que se tornaram capazes de utilizar a energia luminosa para geração do gradiente de prótons.

### 3.3.2.2 Fotossíntese não cíclica

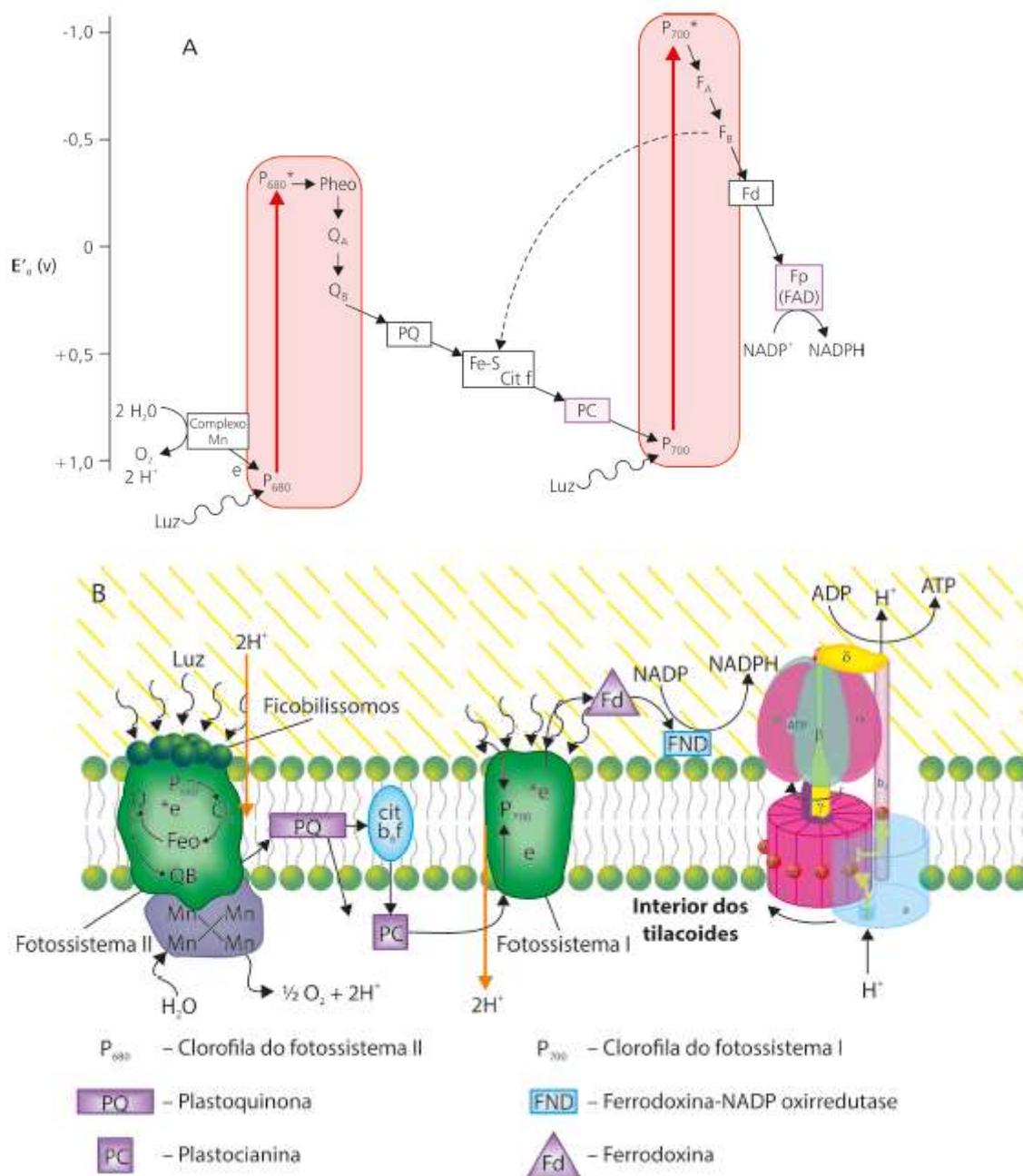
A fotossíntese de cianobactérias, semelhante à das algas e das plantas verdes, é chamada **fotossíntese não cíclica** porque os elétrons emitidos pelo centro de reação têm trajetória linear (**Figura 3.31**) e não retornam ao composto de origem.

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;
- ter participação de 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 3.31 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 dessas 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 isso, este tipo de fotossíntese é chamada **oxigênica**.



**Figura 3.31.** 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<sup>+</sup> oxidoreductase, é feita a transferência final para o NADP<sup>+</sup>, gerando NADPH. O resultado final da fotofosforilação não cíclica é, portanto, a produção de ATP, NADPH e O<sub>2</sub>.

Uma alternativa para os elétrons emitidos por  $P_{700}$  é a ele retornar, via complexo *b-f*, em vez de serem dirigidos ao NADP<sup>+</sup>. Nesse 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. Essa fase é composta de reações que se processam independentemente do estímulo luminoso e consistem, em última análise, na incorporação de CO<sub>2</sub> em compostos orgânicos levando à síntese dos 13 precursores e das demais moléculas necessárias.

### A fotossíntese deu origem ao O<sub>2</sub>

Bactérias que fazem fotossíntese anoxigênica e usam CO<sub>2</sub> como fonte de carbono dependem de compostos reduzidos para gerar poder redutor (NADPH), necessário para fixação do CO<sub>2</sub> e para as reações de biossíntese. Nos primórdios da vida na Terra, compostos reduzidos de enxofre, existentes em grande quantidade, como H<sub>2</sub>S, 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. Essa adaptação expandiu enormemente o hábitat dos organismos fotossintetizantes, que não mais se restringiram aos locais ricos em compostos inorgânicos reduzidos. A grande consequência dessa transformação foi a disponibilização de O<sub>2</sub>, produzido pela oxidação da água. Os sistemas geradores de O<sub>2</sub> foram fundamentais para proporcionar mudanças importantes nas diferentes estratégias de sobrevivência. Os organismos que oxidam matéria orgânica puderam oxidá-la completamente a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O utilizando o O<sub>2</sub> 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 <sub>2</sub>	Tipo	Pigmentos	Doador de elétrons	Fonte de Carbono	Via de fixação de CO <sub>2</sub>	Exemplos
Sim	Cianobactérias	Clorofila a e b, ficobilinas	H <sub>2</sub> O	CO <sub>2</sub>	Calvin-Benson	<i>Anabaena</i>
Não	Púrpuras do enxofre	Bacterioclorofila a ou b	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub> ou orgânico	CO <sub>2</sub> ou Orgânico (etanol ou piruvato)	Calvin-Benson	<i>Chromatium</i>
	Púrpuras não-enxofre	Bacterioclorofila a ou b	H <sub>2</sub> , Fe <sup>2+</sup> , H <sub>2</sub> S (não é o principal) ou orgânico	CO <sub>2</sub> ou Orgânico (succinato/malato)	Calvin-Benson	<i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhodobacter</i> <i>Rhodospirillum</i>
	Verdes do enxofre	Bacterioclorofila a + c, d ou e	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> ou orgânico	CK redutivo	<i>Chlorobium</i>
	Verdes não enxofre	Bacterioclorofila a + c ou d	H <sub>2</sub> S, H <sub>2</sub> ou orgânico	CO <sub>2</sub> ou orgânico	Outras vias	<i>Chloroflexus</i>
	Heliobactérias	Bacterioclorofila g	Orgânico	orgânico	Não fixam	<i>Heliobacterium</i>

### 3.4 A VIDA EM AEROBIOSE

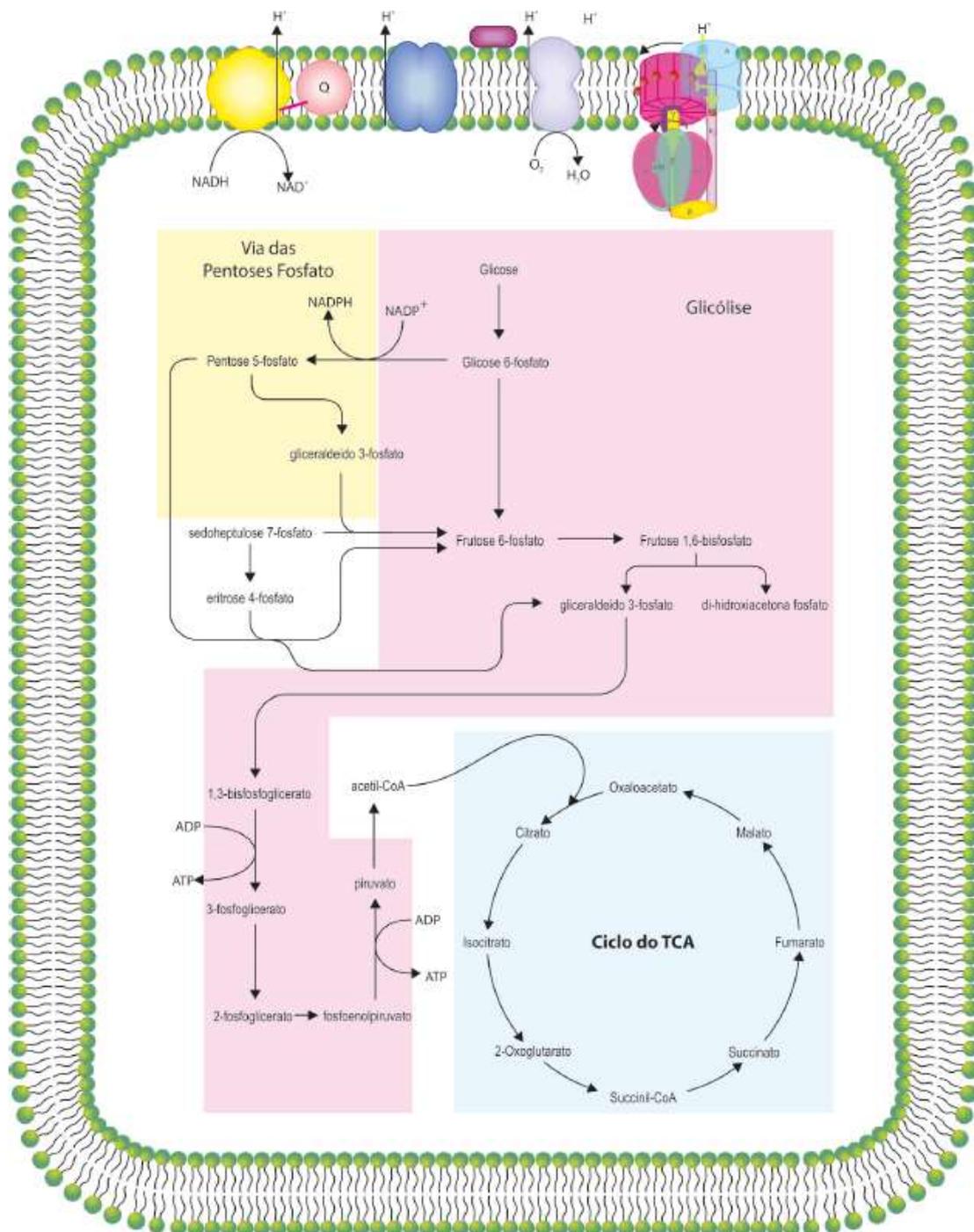
#### 3.4.1 Oxidação de compostos inorgânicos e orgânicos

A disponibilidade de O<sub>2</sub> no ambiente proporcionou a sobrevivência por respiração aeróbia. A **Figura 3.32** esquematiza 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 trouxe 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 aceitor final de elétrons na cadeia de transporte 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, surgiu

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 de 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. Isso faz dos microrganismos procariotos importantes e únicos agentes em muitos dos processos de transformação da matéria orgânica e inorgânica na Terra.

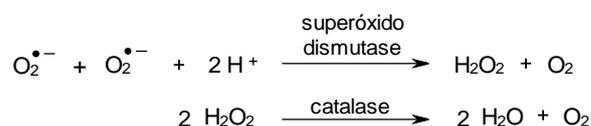
### 3.4.2 Oxigênio como inibidor do metabolismo

Cerca de 90% do oxigênio consumido pelos microrganismos aeróbios é utilizado como acceptor final da cadeia de transporte de elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ ; os 10% restantes são substratos de reações catalisadas por oxidases ou oxigenases. O metabolismo oxidativo gera continuamente espécies de oxigênio apenas parcialmente reduzidas; a primeira dessas espécies é o ânion radical superóxido, que dá origem às outras (**Tabela 3.6**). Essas espécies são muito reativas, capazes de reagir com qualquer composto orgânico, e, portanto, muito tóxicas.

**Tabela 3.6.** Espécies reativas de oxigênio formadas pela redução parcial de  $O_2$ . A redução completa, com a transferência de quatro elétrons, leva à formação de água.

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

Nos organismos aeróbios, estão presentes várias enzimas incumbidas da eliminação das 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, sem as enzimas desintoxicadoras, são danificados em tal extensão que não se mantêm vivos. Essa 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 isso 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 3 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.

### **PARTE C. 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 desses 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. Esse 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 (**simporte**, 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. Esse mesmo gradiente fornece energia para a movimentação dos flagelos bacterianos, sustentando também um trabalho mecânico.

#### **O ATP é o principal doador de energia**

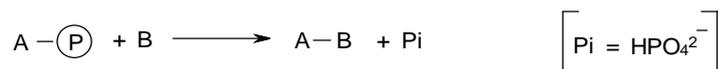
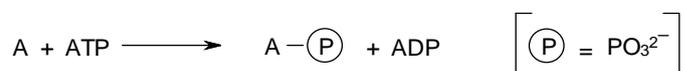
O número de processos que utilizam a energia contida no gradiente de prótons é baixo, apesar de qualitativamente importantes para a sobrevivência do microrganismo. A maior parte da energia utilizada pelos microrganismos provém da energia química presente na molécula de adenosina trifosfato. O ATP é responsável, 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. Essa 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) dessas reações e é dessa forma que esse 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:

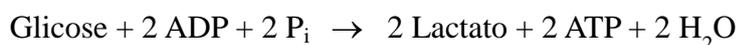


Somando as duas reações acima,



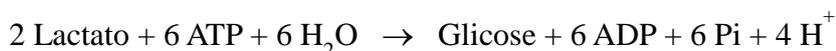
O exame da última reação mostra apenas o resultado geral do processo, no qual o ATP "fornece a energia" para que a síntese de A-B possa ocorrer. Na verdade, o ATP participa efetivamente de reações, como mostram as reações parciais.

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 esse 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 essa 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, essa 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 considerar o dispêndio energético necessário à síntese como resultado da hidrólise do ATP. Nesse 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 polissacarídeos, polifosfato ou poli-3-hidroxicanoatos; 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 das proteínas oligoméricas é pouco conhecido, mas, aparentemente, não é nessa 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. Nessas 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.

### 3.5 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 esse 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 desse 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) ligados 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 preexistente, por ação de um sistema de autolisinas que rompem as ligações  $\beta$ -1,4 entre os componentes *N*-acetilglicosamina e *N*-acetilmurâmico e entre os peptídios, quando novas unidades são inseridas ao longo das aberturas.

Em cocos, o crescimento do peptidoglicano ocorre 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 mais bem 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.

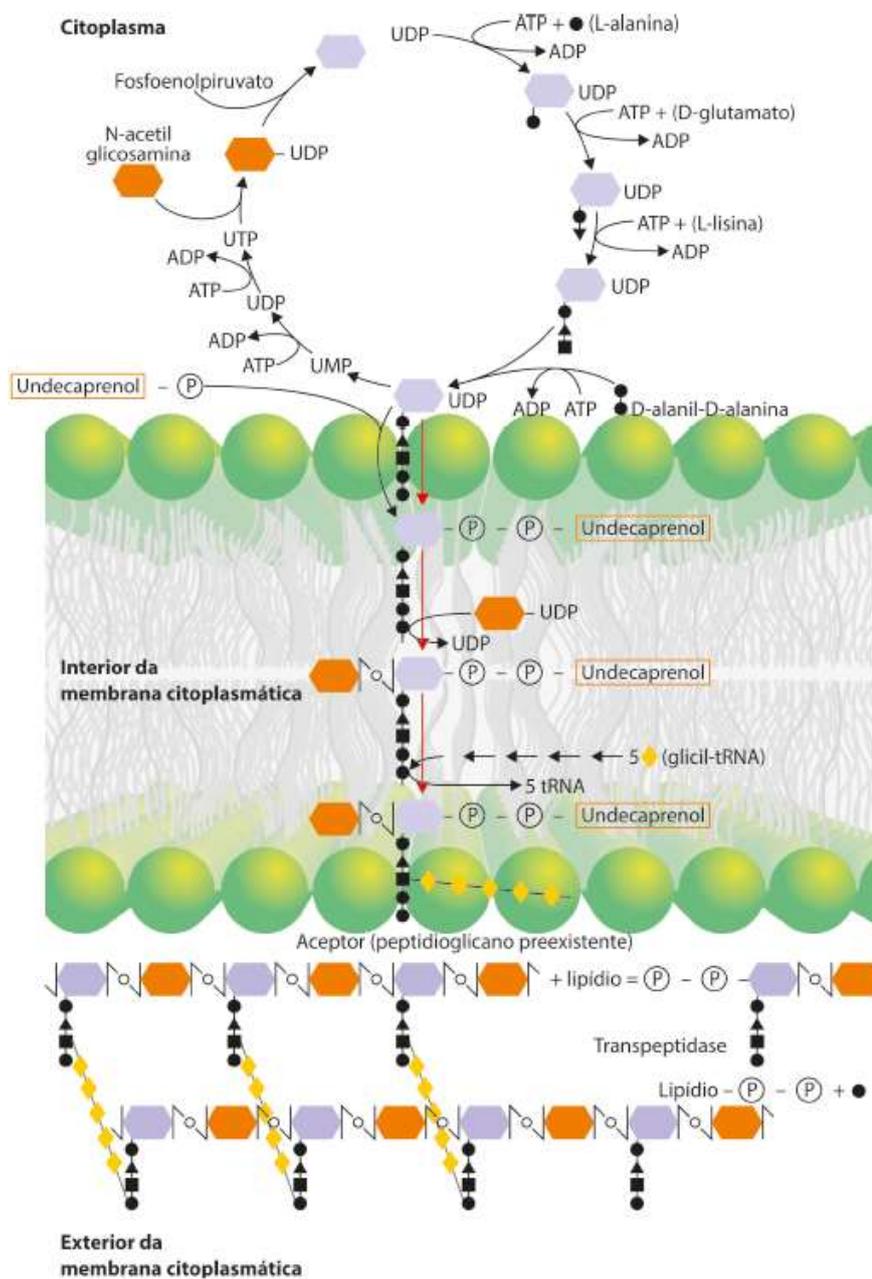
2. Ligação do *N*-acetilmuramilpentapeptídio-UDP a um transportador de membrana, o bactoprenol (undecaprenol), com a liberação de UMP.

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 preexistente, 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 juntamente com o lipídio pirofosfato (presente na estrutura que é transportada através da membrana), o qual será ligado a uma cadeia polissacarídica preexistente 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; esse grupo estabelece uma ligação peptídica com a penúltima alanina de um pentapeptídio I adjacente. Nesse 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; nesse 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.