
Bioquímica Básica

Anita Marzzoco

Bayardo Baptista Torres

Professores Doutores
Departamento de Bioquímica
Universidade de São Paulo

Segunda Edição

No interesse de difusão da cultura e do conhecimento, os autores e os editores envidaram o máximo esforço para localizar os detentores dos direitos autorais de qualquer material utilizado, dispondo-se a possíveis acertos posteriores caso, inadvertidamente, a identificação de algum deles tenha sido omitida.

Direitos exclusivos para a língua portuguesa
Copyright © 1999 by
EDITORA GUANABARA KOOGAN S.A.
Travessa do Ouvidor, 11
Rio de Janeiro, RJ — CEP 20040-040

PREFÁCIO DA 1.^a EDIÇÃO

Este livro baseia-se na nossa longa experiência como professores no Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo. Ao planejar um curso de Bioquímica, o professor enfrenta sempre o problema de selecionar os conteúdos que farão parte do programa. Esta tarefa tem se tornado a cada ano mais difícil, uma vez que o conhecimento nesta área se expande exponencialmente e a carga horária disponível para o curso permanece constante. Esta contradição obriga a uma seleção de conteúdo cada vez mais restritiva. Nosso critério seletivo, que foi trazido para este texto, tem sido o de privilegiar os conceitos fundamentais e o estudo da integração do metabolismo, indispensáveis na formação de profissionais da área biológica.

Nosso objetivo é, portanto, oferecer um texto suficientemente conciso para poder ser utilizado na maioria dos cursos básicos de Bioquímica. Certos conceitos fundamentais foram bastante explorados, na tentativa de antecipar soluções para dificuldades sistematicamente apresentadas pelos estudantes.

Nas Partes 1 e 2 são introduzidos conceitos básicos. Na Parte 3 são descritas as vias metabólicas principais, retomadas na Parte 4 para a análise de sua regulação; consta também da Parte 4 a regulação integrada destas vias. A área da Bioquímica geralmente referida como Biologia Molecular não foi incluída neste livro por entendermos que seu enorme desenvolvimento atual justifica um texto à parte.

Agradecemos aos Professores Isaías Raw e José Carneiro o incentivo para escrever este livro. A Professora Olga Y. Castellani contribuiu decisivamente na elaboração do texto. A ela devemos muito mais do que a criteriosa revisão dos originais e as críticas e sugestões valiosas: os muitos anos do nosso convívio foram um privilégio e constituíram um fértil período de aprendizagem que norteou muitas das idéias contidas neste livro.

OS AUTORES

PREFÁCIO DA 2.^a EDIÇÃO

A segunda edição de Bioquímica Básica obedeceu aos mesmos critérios de seleção e organização dos conteúdos estabelecidos para a primeira edição, e pelas mesmas razões. Procurou-se conservar um texto conciso, privilegiando os conceitos fundamentais. Muitos capítulos foram integralmente reescritos, incorporando atualização das informações e atendendo críticas e sugestões dos estudantes e dos colegas que têm utilizado o livro; a todos queremos manifestar nosso agradecimento.

O presente texto inclui uma Parte, que denominamos *Estudo do Conteúdo*, formada por dois conjuntos de objetivos educacionais, os *Objetivos para Estudo e os Exercícios e Problemas*. Os Objetivos para Estudo organizam de forma hierárquica os conhecimentos principais de cada Capítulo, visando orientar o estudo do conteúdo pelos alunos. Os Exercícios e Problemas, destinados à aplicação do conhecimento adquirido com os Objetivos para Estudo, foram bastante ampliados em relação à primeira edição. Tais itens para guiar o estudo e estimular a resolução de problemas têm-se revelado muito valiosos para a condução de nossos cursos. Esperamos que o Estudo do Conteúdo possa ser útil para estudantes e professores de outros cursos.

OS AUTORES

CONTEÚDO

Parte 1 Conceitos Básicos, Proteínas e Enzimas

- 1 Sistema-tampão, 3
- 2 Aminoácidos e Proteínas, 11
- 3 Hemoglobina — Transporte de Oxigênio e Tamponamento do Plasma, 37
- 4 O Sentido das Reações, 49
- 5 Enzimas, 59

Parte 2 Estrutura de Carboidratos e Lipídios; Membranas

- 6 Estrutura de Carboidratos e Lipídios, 91
- 7 Membranas, 103

Parte 3 Metabolismo: Vias Principais

- 8 Introdução ao Metabolismo, 113
- 9 Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA, 119
- 10 Ciclo de Krebs, 131
- 11 Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa, 136
- 12 Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato, 159
- 13 Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose, 164
- 14 Gliconeogênese, 172
- 15 Fotossíntese, 178
- 16 Metabolismo de Lipídios, 194

x Conteúdo

17 Metabolismo de Aminoácidos, 216 ✓

18 Os Substratos das Vias Metabólicas: Nutrição, 243

Parte 4 Regulação do Metabolismo

19 Estratégias de Regulação do Metabolismo, 257

20 Regulação das Vias Metabólicas Principais, 275

21 Regulação Integrada do Metabolismo, 296

22 Adaptações Metabólicas ao Exercício, 303

Parte 5 Estudo do Conteúdo

Objetivos para Estudo, 319

Exercícios e Problemas, 331

Índice Alfabético, 354

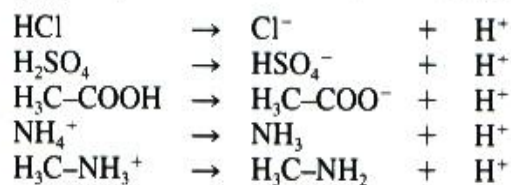
1

SISTEMA-TAMPÃO

A estrutura de muitas moléculas presentes na composição celular e, por conseguinte, a grande maioria dos processos bioquímicos são extremamente sensíveis a variações do pH. Nos seres humanos, o pH plasmático deve ser mantido em uma faixa muito estreita em torno de 7,4 — decréscimos a valores próximos de 7,0 têm sérias conseqüências. Intracelularmente, a restrição se repete: um exemplo suficiente da importância do pH na fisiologia celular é dado pela sua interferência na atividade das enzimas, catalisadores de todas as reações químicas celulares. Muitas destas reações processam-se com liberação ou captação de prótons do meio aquoso em que estão dissolvidas as substâncias presentes na célula. Entretanto, o valor do pH celular ou plasmático é mantido fixo. A manutenção do pH ideal é conseguida pelos seres vivos graças à existência dos *sistemas-tampão*.

1.1 ÁCIDOS E BASES DE BRÖNSTED

Para definir sistema-tampão e compreender suas propriedades, é necessário recorrer à definição de Brönsted para ácidos e bases. Brönsted definiu *ácidos* como substâncias capazes de doar prótons e *bases* como substâncias capazes de recebê-los. Segundo esta definição, são classificados como ácidos, por exemplo, HCl, H₂SO₄, H₃C-COOH, NH₄⁺ e H₃C-NH₃⁺, pois podem dissociar-se, liberando prótons:



Generalizando, a equação de dissociação de um ácido é



O íon (Cl⁻, HSO₄⁻ etc.) — ou a molécula (NH₃, H₃C-NH₂) — resultante desta dissociação é denominado *base conjugada* do ácido, já que pode receber um próton, convertendo-se novamente no *ácido conjugado* respectivo.

Alguns ácidos, chamados *ácidos fortes*, dissociam-se totalmente quando em soluções diluídas — é o caso, por exemplo, de HCl e H₂SO₄. Outros, os chamados *ácidos fracos*, ionizam-se muito pouco. Para estes ácidos, pode-se, portanto, escrever



Os ácidos fracos são caracterizados por sua constante de dissociação

A equação anterior indica que, em solução aquosa, o ácido fraco HA dissocia-se, produzindo as espécies A e H^+ que, juntamente com a parte não-dissociada, HA, compõem um equilíbrio químico. A constante de equilíbrio desta dissociação é

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]}$$

Em reações deste tipo, a constante de equilíbrio é geralmente chamada *constante de dissociação* ou de *ionização*, representada por K_a . O Quadro 1.1 (p. 6) apresenta alguns ácidos fracos e os valores de sua constante de dissociação; são todos ácidos fracos, mas com forças ácidas variáveis.

1.2 SISTEMAS-TAMPÃO: DEFINIÇÃO E PROPRIEDADES

Um sistema-tampão é constituído por um ácido fraco e sua base conjugada

Os ácidos fracos têm para a Bioquímica um interesse particular, pois, junto às suas bases conjugadas, constituem os *sistemas-tampão*, capazes de impedir grandes variações de pH quando da adição de outros ácidos ou álcalis.

Veja-se como um sistema-tampão hipotético — formado pelo ácido HA e sua base conjugada A — reage à adição de um ácido forte, ou seja, à adição de prótons, já que o ácido forte dissocia-se completamente. Quando se adiciona H^+ ao equilíbrio formado pelo ácido, base conjugada e prótons ($HA \rightleftharpoons A + H^+$), o sistema-tampão reage por intermédio da base conjugada (A), que se associa a prótons, transformando-se no ácido (HA).

Dois aspectos desta associação são importantes. Primeiramente, o simples fato de haver uma associação deixará livre um número de prótons *menor* do que se a base A não estivesse presente, pois, neste caso, todos os prótons adicionados ficariam livres. Em outras palavras, o pH irá diminuir, mas muito menos do que diminuiria se a mesma quantidade de prótons fosse adicionada a uma solução desprovida da base conjugada de um ácido fraco — uma solução de NaCl, por exemplo.

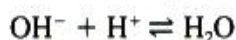
Em segundo lugar, deve-se notar que o tampão constitui um equilíbrio químico, regido por uma constante de equilíbrio (K_{eq}) e, por isto, nem todos os prótons adicionados associam-se à base conjugada. Se isto ocorresse, o número de prótons em solução seria o mesmo que antes da adição; a concentração de A seria menor e a concentração de HA seria maior. Com estes novos valores para as concentrações das espécies, o valor da constante de equilíbrio seria diminuído, o que é absurdo.

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]} \neq \frac{[A] \downarrow [H^+]}{[HA] \uparrow}$$

Na realidade, embora a *maior* parte dos prótons adicionados associem-se a A, uma pequena parte fica livre, em solução. O valor final da concentração de $[H^+]$ será, portanto, um pouco maior do que antes da adição; o de A será menor e o de HA, maior. Desta forma, o valor da constante de equilíbrio é mantido:

$$K_{eq} = \frac{[A][H^+]}{[HA]} = \frac{[A] \downarrow [H^+] \uparrow}{[HA] \uparrow}$$

Quando se adiciona um álcali ao sistema-tampão, o resultado é análogo ao caso anterior. Os íons OH^- , provenientes de um álcali como NaOH, associam-se com prótons do meio, formando H_2O .



A adição do álcali corresponde, portanto, à retirada de prótons do meio. Neste caso, o equilíbrio químico que constitui o tampão reagirá por dissociação do ácido HA. Entretanto, nem todos os prótons que se associaram a OH^- serão repostos por esta dissociação — se isto ocorresse, novamente ter-se-ia uma variação no valor da constante de equilíbrio:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{A}][\text{H}^+]}{[\text{HA}]} \neq \frac{[\text{A}]\uparrow [\text{H}^+]}{[\text{HA}]\downarrow}$$

O que efetivamente ocorre é que a dissociação do ácido repõe a maior parte mas não todos os prótons que se associaram a OH^- . Haverá, portanto, uma diminuição da concentração de prótons, ou um aumento no valor do pH, muito menor, entretanto, do que aquele que ocorreria se não houvesse reposição alguma, como no caso em que a adição do álcali fosse feita à água ou a uma solução de NaCl, por exemplo.

Neste caso, a concentração final de H^+ será um pouco menor do que a inicial; a de A, maior; e a de HA, menor, mantendo o equilíbrio:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{A}][\text{H}^+]}{[\text{HA}]} = \frac{[\text{A}]\uparrow [\text{H}^+]\downarrow}{[\text{HA}]\downarrow}$$

Concluindo, dissociando o ácido quando se adiciona um álcali ou associando próton e base conjugada quando se adiciona um ácido forte, o sistema-tampão previne variações acentuadas de pH. Esta propriedade é consequência da existência concomitante das formas ácido e base conjugada e, embora a soma ($\text{HA} + \text{A}$) permaneça sempre constante, a concentração das espécies varia de acordo com o tipo — H^+ ou OH^- — e a quantidade dos íons adicionados.

1.3 FATORES QUE DETERMINAM A EFICIÊNCIA DE UM SISTEMA-TAMPÃO

A eficiência de um tampão está restrita a uma faixa de pH

A solução de um ácido fraco em água apresenta uma concentração de HA muito maior do que de A, como mostra o Quadro 1.1 (a pequena dissociação é característica do ácido fraco). Se esta solução for submetida a uma contínua adição de álcali, haverá uma progressiva dissociação do ácido, cuja concentração diminui, e um conseqüente aumento da concentração de A, acompanhados de aumento no valor de pH. Se a quantidade de álcali adicionado for grande, a concentração de HA acaba tornando-se tão reduzida que passa a ser insuficiente para compensar, com sua dissociação, novas adições de álcali. A partir deste ponto, o pH sofrerá aumentos significativos a cada nova adição de álcali, mostrando que o sistema perdeu suas propriedades de tampão. O mesmo ocorrerá quando, com constante adição de prótons, esgotar-se praticamente a espécie base conjugada — novas adições de prótons, que não encontrarão mais base conjugada à qual associar-se (e, portanto, permanecerão em solução), provocarão queda acentuada de pH. O sistema não estará mais se comportando como sistema-tampão (Fig. 1.1).

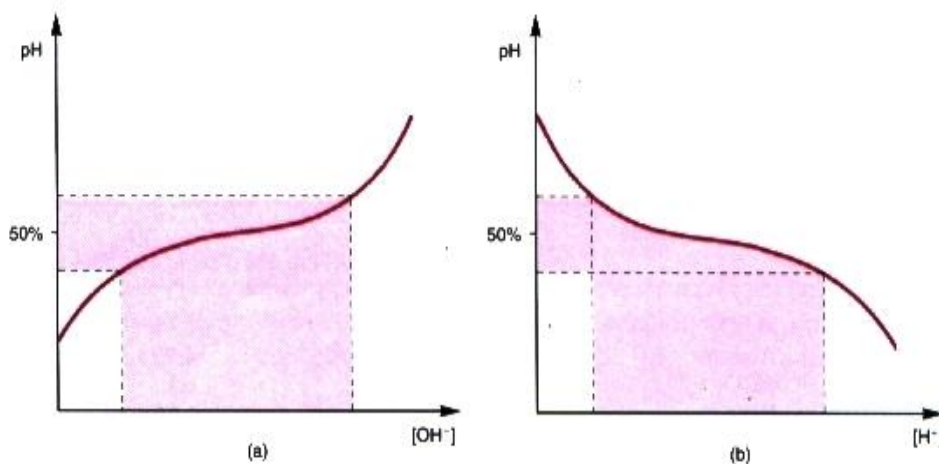


Fig. 1.1 Titulação de um ácido fraco com álcali (a) e com ácido (b). Na região assinalada, as adições de álcali ou ácido provocam pequenas variações de pH; fora desta região, a variação é grande. Nas ordenadas, está assinalado o pH em que há 50% de dissociação do ácido.

Deduz-se, do exposto, que a ação tamponante está restrita a uma faixa de pH dentro da qual as concentrações de ácido e base conjugada são suficientes para compensar adições de álcali ou de ácido. Como a soma ($HA + A$) é constante, fora do intervalo de tamponamento tem-se a situação seguinte:

	[HA]	[A]
Grande adição de álcali	$\cong 0\%$	$\cong 100\%$
Grande adição de ácido	$\cong 100\%$	$\cong 0\%$

Dentro da faixa de pH onde se exerce a ação tamponante haverá, obrigatoriamente, um valor de pH em que exatamente 50% do total inicial do ácido estão associados, os 50% restantes estando na forma de base conjugada. Esta situação, que será verificada em um valor de pH definido e característico para cada tampão considerado, apresenta interesse particular. É nesta situação, ou é neste valor de pH, que o sistema-tampão tem sua eficiência máxima, pois é aqui que existem, *simultaneamente*, as maiores concentrações possíveis de ácido e base conjugada. Ao redor deste valor de pH, uma unidade acima ou uma unidade abaixo (região assinalada na Fig. 1.1), o tampão ainda é eficaz, mas além deste intervalo, o sistema deixa de atuar como tampão.

A determinação do pH em que há 50% de dissociação do ácido pode ser obtida experimentalmente por titulação: tomando-se uma solução de um ácido fraco e medindo-se o valor de pH após cada pequena adição de álcali, obtêm-se valores que são representados pelo gráfico da Fig. 1.1 (a). A curva de titulação apresenta uma região achatada, correspondente à região de tamponamento: pequenas variações de pH para adições fixas de ácido ou álcali. No centro desta região, o ponto de inflexão da curva corresponde ao valor de pH onde há 50% de dissociação. Neste ponto, $[HA] = [A]$.

Como foi discutido, entre os ácidos fracos existe uma gradação de força ácida, revelada pelo valor de seus K_a . Soluções de ácidos fracos diferentes, de mesma concentração, apresentam valores diferentes de pH, dependendo da afinidade de cada base conjugada pelo próton: quanto maior o valor de K_a , menor esta afinidade e, portanto, menor o pH da solução.

Suponha-se dois ácidos fracos diferentes, HA e HB, com $K_a > K_b$. A base conjugada A têm, portanto, afinidade pelo próton menor do que a base conjugada B. Se estes ácidos forem dissolvidos em água, o ácido HA, cuja base conjugada A retém o próton mais "fracamente", irá dissociar-se mais do que o ácido HB, cuja base conjugada B retém o próton mais "fortemente". Portanto, o ácido HA será um ácido fraco mais forte do que HB. Admita-se agora que ambas as soluções estejam em pH igual a 2 (isto pode ser conseguido adicionando-se um ácido forte a ambas as soluções dos ácidos fracos HA e HB). Para proceder à titulação dos dois ácidos, a partir de pH 2, adiciona-se álcali, gradativamente, a estas soluções. Como já foi analisado, a adição provocará a dissociação dos ácidos; após a adição de uma quantidade conveniente de álcali, haverá uma situação em que 50% do ácido HA estará dissociado, mas menos do que 50% do ácido HB encontrar-se-á dissociado. O valor do pH nesta situação poderia ser 5, por exemplo. Em outras palavras, em pH igual a 5 o ácido HA encontra-se 50% dissociado. Para obter situação análoga para o ácido HB há necessidade de adicionar mais álcali, ou seja, o ácido HB vai apresentar-se 50% dissociado em um valor de pH mais alto. Graficamente, as duas curvas de titulação terão a mesma forma, mas localizadas em regiões diferentes em relação à escala de pH. O valor de pH em que um ácido apresenta-se 50% dissociado constitui, então, uma medida da sua força

Quadro 1.1 Variação de força ácida entre os ácidos fracos

Ácido	Base conjugada	K_a	pK_a (pH em que o ácido está 50% dissociado)
H_3PO_4	$H_2PO_4^-$	$7,2 \times 10^{-3}$	2,14
Acético	Acetato	$1,7 \times 10^{-5}$	4,76
H_2CO_3	HCO_3^-	$4,3 \times 10^{-7}$	6,1
$H_2PO_4^-$	HPO_4^{2-}	$1,4 \times 10^{-7}$	6,86
NH_4^+	NH_3	$5,6 \times 10^{-10}$	9,25
Fenol	Fenolato	$1,3 \times 10^{-10}$	9,89
$H_3C-NH_3^+$ (Íon metilamônio)	H_3C-NH_2 (Metilamina)	$1,6 \times 10^{-11}$	10,80
HPO_4^{2-}	PO_4^{3-}	$3,9 \times 10^{-13}$	12,40

ácida: quanto maior for o valor do pH, mais fraco será o ácido (Quadro 1.1). Ao mesmo tempo, este valor de pH revela a região em que cada ácido fraco apresenta seu maior poder tamponante. Como será visto a seguir, este valor de pH (em que um ácido fraco está 50% dissociado), corresponde ao co-logaritmo da constante de dissociação do ácido ($-\log K_a$) e é característico para cada ácido.

A equação de Henderson-Hasselbalch relaciona pH, constante de dissociação do ácido e as concentrações de ácido e base conjugada

Tomando em logaritmo a equação que apresenta o valor da constante de equilíbrio em função da concentração das espécies, tem-se

$$K_{eq} \text{ (ou } K_a) = \frac{[A][H^+]}{[HA]}$$

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A]}$$

$$\log [H^+] = \log K_a + \log \frac{[HA]}{[A]}$$

$$\log [H^+] = \log K_a - \log \frac{[A]}{[HA]}$$

$$-\log [H^+] = -\log K_a + \log \frac{[A]}{[HA]}$$

A expressão $-\log [H^+]$ é definida como pH. Analogamente, $-\log K_a$ é definido como pK_a . Portanto,

$$pH = pK_a + \log \frac{[A]}{[HA]}$$

Esta é a equação de Henderson-Hasselbalch, que, como visto, nada mais é do que a equação de dissociação de um ácido fraco tomada sob a forma logarítmica. De maneira genérica, esta equação pode ser escrita

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{base conjugada}]}{[\text{ácido conjugado}]}$$

Vê-se, por esta equação, que pK_a é o valor de pH que provoca 50% de dissociação do ácido. De fato, nestas condições, $[HA] = [A]$ e a relação $[A]/[HA]$ vale 1. Portanto,

$$pH = pK_a$$

A equação de Henderson-Hasselbalch define o pK_a em bases operacionais, à semelhança do pH, em relação à concentração de H^+ da solução. Deste modo, a região de eficiência máxima de um tampão (50% de ácido conjugado e 50% de base conjugada) é definida pelo pK_a de seu ácido fraco e o pK_a pode ser determinado por titulação.

A equação de Henderson-Hasselbalch permite calcular prontamente a relação entre as concentrações das espécies doadoras e receptoras de prótons em qualquer pH, para um ácido de pK_a conhecido.

Por exemplo, pode-se calcular as concentrações de ácido acético ($pK_a = 4,7$) e acetato em $pH = 5,7$:

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$5,7 = 4,7 + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

$$1 = \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

ou

$$\frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]} = 10$$

No pH 5,7, portanto, haverá 10 vezes mais acetato do que ácido acético. No pH 3,7 ocorrerá o inverso.

Generalizando, em valores de pH inferiores ao pK_a de um ácido fraco predomina a sua forma protonada (ácido conjugado) e, em valores de pH maiores do que o pK_a , predomina a forma desprotonada (base conjugada).

Para o ácido acético, ou melhor, para o tampão acetato, a faixa compreendida entre 3,7 e 5,7 ($pH = pK_a - 1$ e $pH = pK_a + 1$) corresponde à região achatada da curva de titulação (assinalada na Fig. 1.2), ou seja, à região de tamponamento. Fora destes limites, a concentração de ácido conjugado fica desprezível em relação à de base conjugada, ou vice-versa, e o sistema não se comporta mais como tampão. Por exemplo, a pH 6,7 tem-se

$$6,7 = 4,7 + \log \frac{[\text{acetato}]}{[\text{ácido acético}]}$$

e

$$[\text{acetato}] = 100 [\text{ácido acético}]$$

Ou seja, uma solução que contivesse inicialmente 101 moléculas de ácido acético apresentaria no $pH = 6,7$ uma única molécula do ácido e 100 íons acetato. Neste pH a solução não se comportaria mais como um tampão, pois, com tão pequena concentração de ácido, seria incapaz de resistir a adições de álcali. Para soluções reais, a afirmativa também é válida: salvo casos excepcionais (ver seção seguinte), a melhor atuação do tampão se dá em valores de pH próximos ao seu pK_a e com eficiência que depende da sua concentração.

O ácido acético ilustra a regra geral para a escolha do ácido fraco com o qual se pretende fazer uma solução tampão: o ácido fraco constituirá um tampão apropriado se o valor de seu pK_a estiver dentro do intervalo compreendido por uma unidade abaixo e uma unidade acima do valor de pH que se quer manter constante:

$$pK_a - 1 \leq pH \leq pK_a + 1$$

A eficiência de um tampão depende de sua concentração

Além da proximidade do pH em que há 50% de dissociação, um outro fator importante na eficiência do tampão é a sua concentração, que é a soma das concentrações do ácido e da base conjugada. Ou seja, um tampão 0,1 M mantém esta concentração em qualquer valor de pH, pois à medida que a concentração do ácido aumenta, a da base conjugada diminui, ou vice-versa. Quanto maior a concentração de um tampão, maior

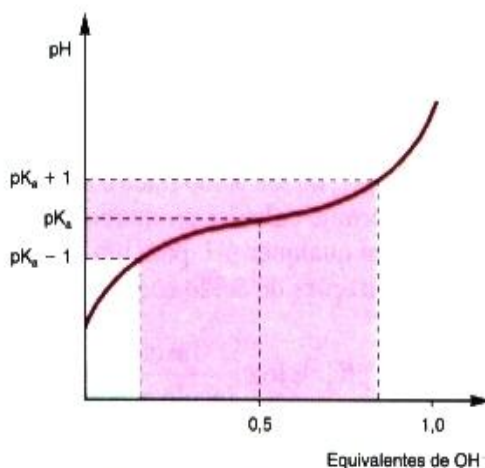


Fig. 1.2 Titulação de um ácido fraco — a região de tamponamento estende-se uma unidade abaixo e acima do pK_a .

a disponibilidade das espécies capazes de doar ou receber prótons; assim, uma solução 0,1 M de um ácido que esteja 50% dissociado será um tampão 10 vezes mais eficiente do que uma solução 0,01 M do mesmo ácido na mesma condição.

Em resumo, a eficiência de um tampão é proporcional à sua concentração e é máxima no pH igual ao pK_a . Na prática, o ácido fraco escolhido e um dos seus sais solúveis são dissolvidos em concentrações molares iguais. Assim, por exemplo, se se deseja preparar um tampão acetato 0,1 M pH 4,7, dissolve-se em um litro de água 0,05 moles de ácido acético e 0,05 moles de acetato de sódio. O mesmo resultado seria conseguido pela dissolução de 0,1 moles de ácido acético e adição de álcali suficiente para elevar o pH até 4,7; quando o pH atingir este valor e o volume for acertado para um litro, a composição da solução será idêntica ao caso anterior (50% do ácido e 50% da base conjugada).

1.4 TAMPÕES BIOLÓGICOS

Os seres vivos mantêm constante o seu pH interno

Os tampões biológicos são aqueles encontrados nos seres vivos; na espécie humana, por exemplo, há tampões capazes de manter o pH do sangue muito próximo de 7,4. Não são muitos os ácidos fracos que satisfazem este requisito. Os principais tampões são o fosfato, as proteínas e o bicarbonato.

A dissociação $[H_2PO_4^- \rightleftharpoons HPO_4^{2-} + H^-]$ tem $pK_a = 6,8$. Este sistema constitui um tampão apropriado para valores de pH entre 5,8 e 7,8. No plasma, entretanto, a concentração deste tampão é muito pequena, tornando sua eficiência muito reduzida. Intracelularmente sua concentração é maior e sua eficácia é considerável.

As proteínas presentes no plasma exercem efeito tamponante muito discreto. Este efeito é devido a grupos ionizáveis presentes em muitos aminoácidos ($-COO^-$, $-NH_3^+$ etc.), que são ácidos fracos. Entretanto, os valores do pK_a desses grupos estão muito distantes do valor do pH fisiológico, como é o caso das carboxilas e dos grupos amino, tornando-os inefetivos como tampões a pH 7,4. O único aminoácido que apresenta um grupo com pK_a compatível com o tamponamento a pH fisiológico é a histidina ($pK_a = 6,0$). Ainda assim, o efeito tamponante devido a este aminoácido é discreto, pois não é um aminoácido freqüente nas proteínas plasmáticas — vale lembrar que a eficiência do tampão depende de sua concentração. A exceção é a hemoglobina, proteína rica em histidina e que, juntamente com o sistema bicarbonato, é a responsável principal pela manutenção do pH plasmático. A importância das proteínas no tamponamento celular é maior do que no plasmático, porque sua concentração nas células é maior do que no plasma.

O sistema bicarbonato é constituído pela dissociação



O valor de pK_a desta dissociação é 3,8, incompatível, portanto, com o tamponamento fisiológico. O sistema bicarbonato apresenta, entretanto, uma característica peculiar: seu ácido (H_2CO_3) está em equilíbrio com o CO_2 dissolvido em água através da equação

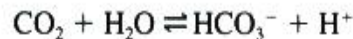


Esta reação pode processar-se rapidamente na ausência de catalisadores; ainda assim, a sua velocidade é incompatível com as necessidades fisiológicas. As hemácias contêm uma enzima, a *anidrase carbônica (AC)*, uma das enzimas mais ativas que se conhece, capaz de acelerar a reação por um valor de aproximadamente 100 vezes. Desta forma, o CO_2 presente no plasma difunde-se pela membrana da hemácia e é eficientemente transformado em H_2CO_3 no seu interior. A sua dissociação em HCO_3^- e H^+ é imediata.

A quantidade de CO_2 dissolvido dependerá da pressão parcial de CO_2 na atmosfera e, nas condições atmosféricas comuns, a constante de dissociação aparente do ácido será elevada para 6,1.



Como a concentração de H_2CO_3 neste sistema é muito reduzida (cerca de 1/200 da concentração do CO_2 dissolvido), pode-se escrever:



A concentração de H_2O é praticamente constante e, portanto, pode ser eliminada:



A constante de equilíbrio é, portanto:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}^+]}{[\text{CO}_2]}$$

A concentração de CO_2 dissolvido é função da pressão parcial deste gás ($p\text{CO}_2$) multiplicada por um fator de conversão igual a $0,03 \text{ meq} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$, a 37°C . Portanto,

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{HCO}_3^-][\text{H}^+]}{0,03 \cdot p\text{CO}_2}$$

A equação de Henderson-Hasselbalch para este tampão torna-se:

$$\text{pH} = 6,1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{0,03 \cdot p\text{CO}_2}$$

Neste sistema, o CO_2 ("ácido" conjugado do tampão) dissolvido no plasma está em contato com o CO_2 atmosférico através do espaço alveolar, permitindo um rápido ajuste da concentração de H^+ quando esta tende a variar. O tampão bicarbonato constitui, por isto, um *sistema aberto*, muito mais eficiente no controle do pH. De fato, supondo o sistema fechado, uma adição de ácido forte (H^+) faria com que a maior parte dos prótons combinasse com a base conjugada (HCO_3^-), diminuindo sua concentração e aumentando a concentração do ácido (CO_2). A razão

$$\frac{[\text{HCO}_3^-]}{0,03 \cdot p\text{CO}_2}$$

ficaria, portanto, muito diminuída, e o pH assumiria um valor muito baixo. Como o sistema é aberto, a mesma adição de prótons faz diminuir a concentração de base conjugada, mas **não** aumenta a concentração de ácido conjugado, já que a concentração de CO_2 ajusta-se rapidamente à pressão parcial deste gás na atmosfera. A relação entre as concentrações de HCO_3^- e CO_2 , neste caso, diminui, mas muito menos do que no caso do sistema fechado. Em outras palavras, no sistema fechado, a adição de ácido provocou uma queda de pH muito maior do que no sistema aberto. O fato de o sistema bicarbonato ser um sistema aberto é que permite sua eficácia na manutenção do pH plasmático.

No pH fisiológico, a proporção entre as concentrações de HCO_3^- e H_2CO_3 é de 20:1, mostrando que o sistema é mais efetivo para resistir à acidificação do que à alcalinização. Para o estudo do funcionamento associado deste sistema-tampão com a hemoglobina, consultar o Capítulo 3.

2

AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

As proteínas, além de constituírem o componente celular mais abundante, são as moléculas mais diversificadas quanto à forma e função. As funções que desempenham são estruturais e dinâmicas. Formam os componentes do esqueleto celular e de estruturas de sustentação, como, por exemplo, o colágeno e a elastina. Participam de quase todos os processos biológicos, já que incluem as enzimas, que catalisam as milhares de reações químicas extraordinariamente diversas que ocorrem nos organismos. Uma outra função dinâmica das proteínas é o transporte de moléculas. O transporte de oxigênio por hemoglobina e mioglobina no sangue e músculos, respectivamente, será discutido no capítulo seguinte. Os mecanismos de defesa do organismo incluem diversas proteínas, como as imunoglobulinas e o interferon, que atuam no combate a infecções bacterianas e virais. Atuam, ainda, no controle global do metabolismo, devido à sua ação hormonal, como é o caso da insulina. São também responsáveis por mecanismos contráteis, sendo de particular importância as proteínas actina e miosina, que atuam na contração muscular. Até mesmo a atividade dos genes é controlada por proteínas: proteínas reguladoras ligam-se ao DNA em sítios específicos, localizados próximo aos genes, alterando a sua expressão. Estas proteínas, no genoma de mamíferos, são capazes de reconhecer o sítio regulador de um determinado gene, dentre dezenas de milhares de genes diferentes.

2.1 AMINOÁCIDOS COMPONENTES DE PROTEÍNAS

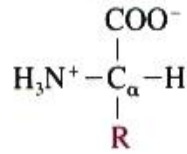
As proteínas são polímeros de aminoácidos

As proteínas, apesar de apresentarem estruturas e funções tão diversificadas, são sintetizadas a partir de apenas 20 monômeros diferentes: os aminoácidos. Todavia, as possibilidades de existirem proteínas diferentes, constituídas por esse número reduzido de monômeros, são espantosamente grandes. Considerando-se a formação de proteínas contendo apenas 20 aminoácidos, um de cada tipo, podem ser obtidas $2,4 \times 10^{18}$ moléculas diferentes! Como as proteínas são compostas por centenas de aminoácidos, cada um deles podendo estar presente mais de uma vez, a probabilidade de construção de moléculas diferentes é, naturalmente, muito maior.

Os aminoácidos diferem entre si pela estrutura da cadeia lateral

Os aminoácidos são compostos que apresentam, na sua molécula, um grupo amino ($-NH_2$) e um grupo carboxila ($-COOH$); a única exceção é a prolina, que contém um grupo imino ($-NH-$) no lugar do grupo amino. Em pH fisiológico, esses grupos estão na forma ionizada: $-NH_3^+$, $-COO^-$ e $-NH_2^-$. Os aminoácidos

têm uma fórmula básica comum, na qual os grupos amino e carboxila estão ligados ao carbono α , ao qual também se liga um átomo de hidrogênio e um grupo variável chamado *cadeia lateral* ou *grupo R*:



As propriedades das cadeias laterais dos aminoácidos — principalmente o fato de algumas delas terem afinidade pela água e outras não — são importantes para a conformação das proteínas e, portanto, para sua função.

Os aminoácidos são classificados, de acordo com a polaridade do grupo R, em duas grandes categorias: aminoácidos apolares (grupo R hidrofóbico) e aminoácidos polares (grupo R hidrofílico) (Fig. 2.1).

Os aminoácidos *apolares* têm grupos R constituídos por cadeias orgânicas com caráter de hidrocarboneto, que não interagem com a água. Têm geralmente uma localização interna na molécula de proteína. Pertencem a este grupo: *glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina e triptofano*.

Os aminoácidos classificados como *polares* são os que têm, nas cadeias laterais, grupos com carga elétrica líquida ou grupos com cargas residuais, que os capacitam a interagir com a água. São geralmente encontrados na superfície da molécula proteica. Estes aminoácidos são subdivididos em três categorias, segundo a carga apresentada pelo grupo R em soluções neutras: *aminoácidos básicos*, se a carga for positiva; *aminoácidos ácidos*, se a carga for negativa; e *aminoácidos polares sem carga*, se a cadeia lateral não apresentar carga líquida. Os aminoácidos básicos são *lisina, arginina e histidina*. O valor de pK_a do grupo ionizável presente na cadeia lateral de lisina e arginina (amino e guanidino, com $\text{pK}_a = 10,54$ e $\text{pK}_a = 12,48$, respectivamente) mostra que, em pH neutro, esses grupos estão protonados (Quadro 2.1). As cadeias laterais da histidina (grupo imidazólico, com $\text{pK}_a = 6,04$) estão muito menos ionizadas em pH 7; como o valor de seu pK_a está uma unidade abaixo deste pH, apenas 10% de suas moléculas estarão com o grupo R protonado (ver Equação de Henderson-Hasselbalch, p. 7). Os aminoácidos ácidos são os dicarboxílicos: *aspartato e glutamato*. O pK_a de suas cadeias laterais é 3,90 e 4,07, respectivamente, e, portanto, em pH neutro, estão desprotonadas. O Quadro 2.1 apresenta, também, os valores de pK_a que os aminoácidos podem apresentar quando estão incorporados em proteínas; o significado dessas alterações de pK_a será analisado oportunamente. Os aminoácidos polares sem carga são *serina, treonina e tirosina*, com um grupo hidroxila na cadeia lateral; *asparagina e glutamina*, com um grupo amida; e *cisteína*, com um grupo sulfidril.

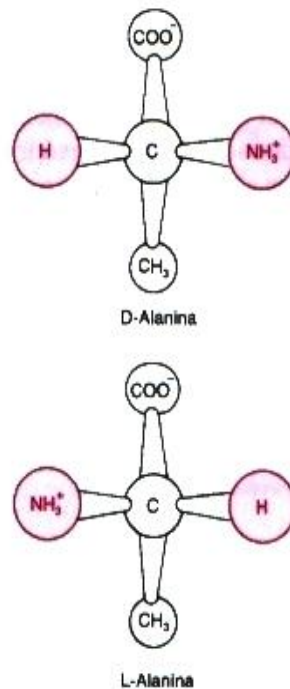


Fig. 2.2 Isômeros ópticos da alanina.

Quadro 2.1 pK_a dos aminoácidos

Aminoácido	pK ₁ (α-COO ⁻)	pK ₂ (α-NH ₃ ⁺)	pK _R (grupo R)	pK _R (radical de proteínas)
Glicina	2,35	9,78		
Alanina	2,35	9,87		
Valina	2,29	9,74		
Leucina	2,33	9,74		
Isoleucina	2,32	9,76		
Metionina	2,13	9,28		
Prolina	1,95	10,64		
Fenilalanina	2,20	9,31		
Triptofano	2,46	9,41		
Serina	2,19	9,21		
Treonina	2,09	9,10		
Asparagina	2,14	8,72		
Glutamina	2,17	9,13		
Tirosina	2,20	9,21	10,46	9,5-10,5
Cisteína	1,92	10,70	8,37	8,0-9,0
Lisina	2,16	9,06	10,54	9,5-10,5
Arginina	1,82	8,99	12,48	11,5-12,5
Histidina	1,80	9,33	6,04	6,0-7,4
Aspartato	1,99	9,90	3,90	4,0-5,5
Glutamato	2,10	9,47	4,07	4,0-5,5
Radical				
Carboxila terminal				3,5-4,0
Amino terminal				7,6-9,0

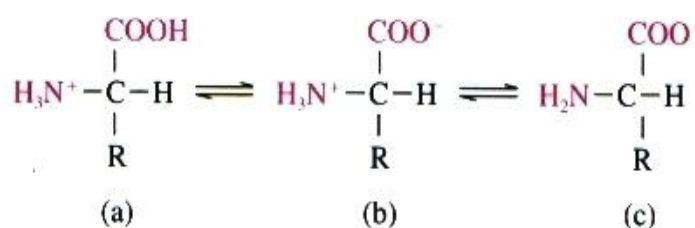
As proteínas são formadas por L-aminoácidos

O carbono α de todos os aminoácidos, com exceção da glicina, é assimétrico, já que está ligado a quatro grupos diferentes: -NH₃⁺, -COO⁻, -H e -R. Na glicina, este carbono não é assimétrico porque o grupo R é constituído por -H. Os aminoácidos com carbono α assimétrico apresentam dois isômeros opticamente ativos: formas D e L (Fig. 2.2). Todas as proteínas encontradas nos seres vivos são formadas por L-aminoácidos. Os D-aminoácidos aparecem somente em certos antibióticos e em peptídios componentes da parede de algumas bactérias. Os aminoácidos com configuração D, assim como outros aminoácidos exóticos encontrados nas células, são formados por modificações dos 20 aminoácidos proteicos ou são produtos intermediários das vias de síntese destes compostos.

2.2 IONIZAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

A carga elétrica dos aminoácidos varia com o pH

Os aminoácidos têm pelo menos dois grupos ionizáveis, que podem existir na forma protonada (-COOH, -NH₃⁺) ou desprotonada (-COO⁻, -NH₂), dependendo do pH do meio em que se encontram.



Em soluções muito ácidas, os dois grupos apresentam-se protonados (a); em pH muito alcalino, ambos apresentam-se desprotonados (c); e, em soluções próximas da neutralidade ou na forma cristalina, o aminoácido apresenta-se como um íon dipolar (b).

A conversão entre as formas *a*, *b* e *c* em função do pH do meio é refletida na curva de titulação do aminoácido. Quando o aminoácido tem apenas dois grupos ionizáveis, como a alanina, sua curva de titulação (Fig. 2.3) assemelha-se à composição das curvas de titulação de dois ácidos fracos com valores de pK_a muito diferentes, como, por exemplo, um ácido carboxílico e uma amina primária (ver o capítulo Sistema-tampão). Esta semelhança é resultado da presença do grupo carboxila e do grupo amino na mesma molécula: o aminoácido. As duas regiões de tamponamento observadas na curva correspondem à ionização do grupo carboxila (conversão da forma *a* em *b*) e do grupo amino (conversão de *b* em *c*), com valores de pK_a de 2,35 e 9,87, respectivamente.

Outros aminoácidos monoamínicos e monocarboxílicos apresentarão curvas de titulação similares, apenas variando a região de pH em que se dá o tamponamento. A curva de titulação de aminoácidos com cadeias laterais ionizáveis apresenta uma terceira região de tamponamento, ou seja, um terceiro pK_a . Isto ocorre com os aminoácidos ácidos, básicos, cisteína e tirosina.

Cada aminoácido apresenta-se neutro em um valor de pH

A carga elétrica total da molécula de um aminoácido resulta da soma algébrica das cargas apresentadas pelos seus grupos ionizáveis, que, por sua vez, dependem dos valores de seus pK_a e do pH do meio. Assim, o grupo carboxila pode apresentar-se sem carga ou com carga negativa; o grupo amino é neutro ou tem carga positiva.

A curva de titulação de um aminoácido monoamínico e monocarboxílico, representada na Fig. 2.3, inicia-se em pH muito ácido, abaixo do pK_a do grupo carboxila. Nesta situação, com grande excesso de prótons, tanto a carboxila quanto o grupo amino estarão protonados, o que confere à maioria das moléculas do aminoácido uma carga líquida positiva (forma *a*). À medida que se adiciona álcali, o valor do pH sobe gradativamente, aumentando a dissociação do grupo carboxila e, conseqüentemente, a concentração da forma com uma carga negativa e uma positiva, ou seja, a forma eletricamente neutra (forma *b*). Prosseguindo a adição de álcali, o valor do pH continua aumentando, até que se inicia a dissociação do grupo amino e aumenta a concentração da forma com carga negativa (forma *c*). A forma eletricamente neutra (forma *b*) só poderá, portanto,

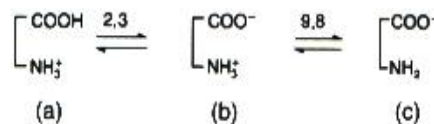
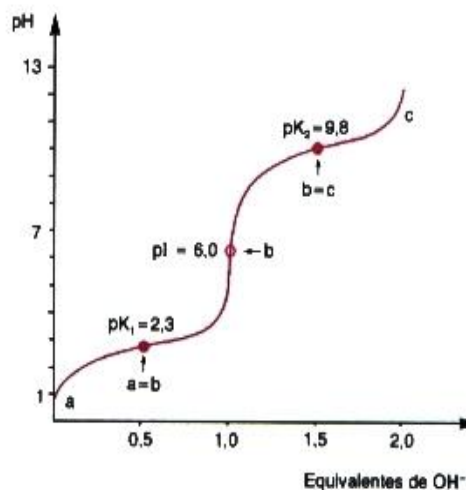


Fig. 2.3 Curva de titulação da alanina.

existir acima do pK_a do grupo carboxila e abaixo do pK_a do grupo amino e será mais abundante no pH equidistante dos dois valores de pK_a .

Os aminoácidos monoamínicos e dicarboxílicos (aspartato e glutamato) possuem um grupamento que pode apresentar carga positiva e dois grupamentos que podem apresentar carga negativa. Neste caso, a forma com carga líquida igual a zero será obtida quando um dos grupos carboxila estiver protonado (sem carga) e o outro desprotonado (com carga negativa) — neste valor de pH, a carga negativa será compensada pela carga positiva do grupamento amino protonado. O pH em que esta forma será a predominante equidista dos valores de pK_a das duas carboxilas.

Por um raciocínio análogo, para os aminoácidos com um grupo carboxila e dois grupos que podem apresentar carga positiva (lisina, histidina e arginina), a forma eletricamente neutra será mais abundante em um valor de pH equidistante dos valores de pK_a dos dois grupamentos básicos do aminoácido. A equação de Henderson-Hasselbalch (ver o capítulo Sistema-tampão) permite verificar qual é a forma predominante do aminoácido em qualquer valor de pH.

Generalizando, o pH onde predomina a forma eletricamente neutra é a média aritmética de dois valores de pK_a . Este valor de pH é chamado ponto *isoeletrico* (*pI*) do aminoácido.

$$pI = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}$$

Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} dependem do aminoácido considerado. Para os que não contêm grupamentos ionizáveis na cadeia lateral, utilizam-se os valores de pK_a dos grupamentos amino e carboxila; para aminoácidos com três grupamentos ionizáveis, usam-se os valores de pK_a dos grupamentos com mesmo sinal de carga. A única exceção a esta regra é a *tirosina*, que apresenta valores de pK_a iguais a 2,20 (carboxila), 9,21 (amino) e 10,46 (fenólico). O grupo fenólico apresentará carga negativa em valores de pH maiores do que o pK_a do grupo amino, e o ponto isoeletrico é a média entre o pK_a do grupo carboxila e o do grupo amino.

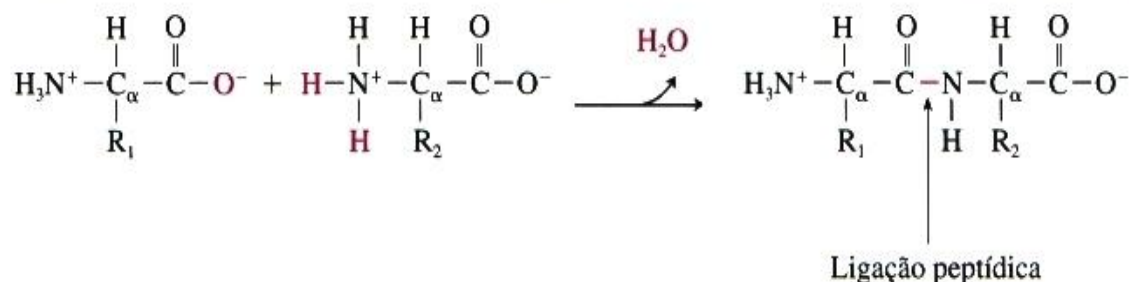
Os aminoácidos não constituem tampões fisiológicos importantes

Uma análise dos valores de pK_a dos aminoácidos (Quadro 2.1) revela que estes não apresentam poder tamponante significativo em pH fisiológico. Todavia, quando os aminoácidos fazem parte de uma proteína, o valor de pK_a de suas cadeias laterais (Quadro 2.1) pode sofrer variações consideráveis — em relação ao seu valor no aminoácido livre — dependendo das características da região da proteína onde essas cadeias estão inseridas, tais como: polaridade, determinada pela proximidade de grupamentos com carga; exclusão de moléculas de água, como ocorre no interior da molécula protéica, e possibilidade de formação de pontes de hidrogênio (p. 20). Assim sendo, resíduos de aminoácidos de certas proteínas participam de maneira decisiva dos sistemas-tampão dos organismos. Um caso importante de alteração de pK_a de aminoácidos, que tem implicações decisivas para o tamponamento do sangue, é o da *hemoglobina*, analisado no Capítulo 3.

2.3 POLÍMEROS DE AMINOÁCIDOS: PEPTÍDIOS E PROTEÍNAS

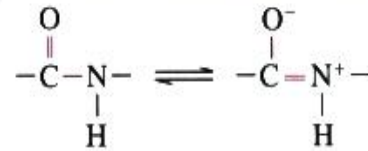
Os aminoácidos ligam-se formando cadeias polipeptídicas

Os aminoácidos podem formar polímeros através da ligação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino de outro. Esta ligação carbono-nitrogênio, chamada *ligação peptídica*, é obtida por exclusão de uma molécula de água. Quimicamente, a formação da ligação peptídica pode ser representada pela seguinte equação:

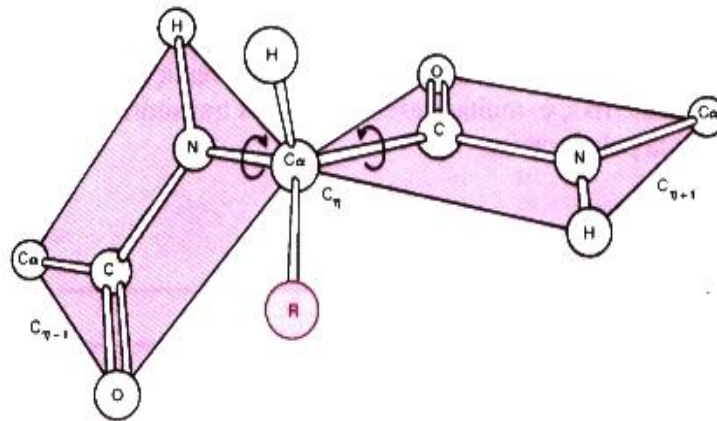
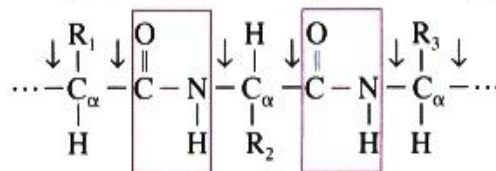


Esta reação, como está escrita, *jamais* ocorre. Nos seres vivos, a união dos aminoácidos por ligação peptídica não é feita por reação direta entre eles, mas através de um complexo aparato de síntese proteica, que inclui ribossomos, ácidos ribonucleicos, várias proteínas e enzimas. A equação mostra, apenas, o resultado líquido do processo.

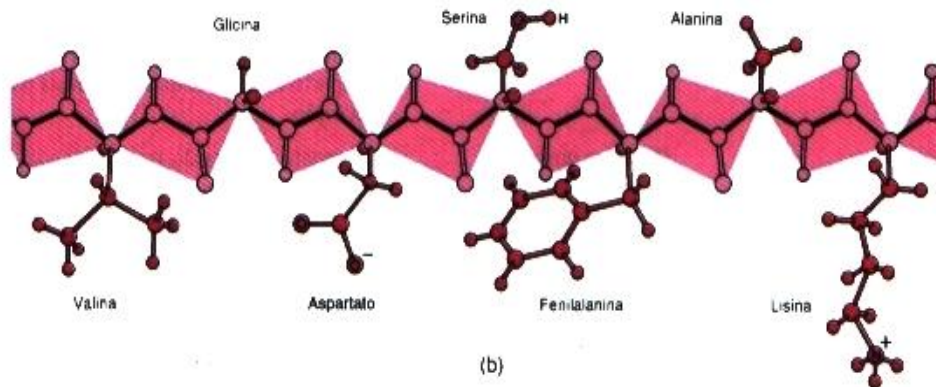
As propriedades da ligação peptídica impõem restrições ao dobramento do polímero formado. A ligação peptídica, apesar de ser representada por um único traço de ligação, tem características intermediárias entre uma ligação simples e uma dupla ligação, devido às interações entre duas formas de ressonância:



A consequência desse caráter parcial de dupla ligação é que não há possibilidade de rotação em torno da ligação peptídica. Assim sendo, os quatro átomos dos grupamentos que participam da ligação peptídica — C, O, N, H — ficam dispostos em um plano rígido, constituindo o que se costuma chamar de *grupo peptídico* ou *unidade peptídica* (cada um dos retângulos no esquema seguinte e na Fig. 2.4 a).



(a)



(b)

Fig. 2.4 a) Esquema mostrando a disposição em um plano dos quatro átomos que compõem a unidade peptídica — as setas indicam as ligações em torno das quais a rotação é possível; b) a cadeia polipeptídica consiste em um arranjo flexível de unidades planas (unidades peptídicas), conectadas por uma articulação: o carbono α . (Figura b — De G. Zubay: Biochemistry, 1983, Addison-Wesley Publishing Co. Reproduzida com permissão da McGraw-Hill Companies.)

Todavia, existem pontos de dobramento entre as unidades peptídicas rígidas, graças à possibilidade de rotação em torno das ligações com o carbono α ($C_\alpha - C$ e $N - C_\alpha$), que são ligações efetivamente simples (indicadas por setas no esquema anterior e na Fig. 2.4 a).

O polímero formado pode, portanto, ser visualizado como uma cadeia constituída por unidades planares (unidades peptídicas), unidas entre si por uma articulação flexível — o carbono α (Fig. 2.4 b). Esta cadeia chama-se *cadeia polipeptídica*.

A cadeia polipeptídica pode conter de dois a milhares de aminoácidos (ou, mais rigorosamente, *resíduos de aminoácidos*, já que, em cada ligação peptídica, foi eliminada uma molécula de água). Quando o número de aminoácidos é igual a 2, o polímero é chamado de *dipeptídio*; com 3 é um *tripeptídio*, e assim por diante. Polímeros contendo até 30 aminoácidos são conjuntamente chamados de *oligopeptídios* ou simplesmente *peptídios*; quando o número é maior, são chamados de *polipeptídios*. Qualquer que seja o número de aminoácidos, os peptídios apresentam um grupamento amino livre em uma das extremidades — amino terminal — e um grupo carboxila livre na outra — carboxila terminal.

Muitos peptídios encontrados na natureza desempenham funções importantes, atuando como hormônios (encefalinas, oxitocina, vasopressina, glucagon), antibióticos (gramicidina), agentes redutores (glutathiona) etc. (Quadro 2.2). Peptídios com aplicação terapêutica são sintetizados em laboratórios industriais; um exemplo é o aspartame, um adoçante artificial, com alto poder edulcorante. O aspartame é um dipeptídio modificado, formado por aspartato e fenilalanina, esterificada a um radical metil.

As *proteínas* podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas; contêm, geralmente, mais de 50 aminoácidos (Quadro 2.3) e desempenham uma função específica. Todas as proteínas, com poucas exceções (colágeno, p. 25), contêm todos os 20 aminoácidos, em proporções que variam muito de proteína para proteína (Quadro 2.4). Cada proteína apresenta uma estrutura espacial definida e característica. Apesar de existirem inúmeras conformações teoricamente possíveis, todas as moléculas de uma dada proteína, ao serem sintetizadas, assumem a mesma conformação espacial, mostrando que esta é a conformação de menor energia livre, ou seja, a conformação energeticamente mais favorável nas condições celulares. Esta conformação, entretanto, não é permanentemente fixa, e, muitas vezes, alterações transitórias da estrutura estão relacionadas com a função desempenhada pela proteína.

Quadro 2.2 Peptídios de importância biológica

Peptídios	Número de aminoácidos	Glândulas/ células produtoras	Efeitos principais
Encefalinas	5	Hipófise anterior e medula adrenal	Analgesia
Oxitocina	9	Hipófise posterior	Contração da musculatura uterina no parto e de glândulas mamárias na lactação
Vasopressina	9	Hipófise posterior	Aumento da pressão sangüínea e da reabsorção de água pelo rim
Glucagon	29	Células α do pâncreas	Aumento da produção de glicose pelo fígado no jejum
Gramicidina	10	Cepas de <i>Bacillus brevis</i>	Antibiótico
Glutathiona	3	Maioria das células	Proteção de radicais $-SH$ de proteínas, manutenção do Fe^{2+} da hemoglobina e dissipação de H_2O_2

Quadro 2.3 Características de composição de algumas proteínas

Proteína	Número de aminoácidos	Número de cadeias polipeptídicas
Insulina (bovina)	51	2
Lisozima (clara de ovo)	129	1
Mioglobina (eqüina)	153	1
Hemoglobina (humana)	574	4
Aspartato transcarbamoilase (<i>E. coli</i>)	2.700	12
RNA polimerase (<i>E. coli</i>)	4.100	5
Apolipoproteína B (humana)	4.536	1

Quadro 2.4 Composição em aminoácidos de três proteínas

Aminoácido	Número de aminoácidos por molécula de proteína		
	Quimotripsinogênio (bovino)	Lisozima (clara de ovo)	Citocromo c (humano)
Glicina	23	12	13
Alanina	22	12	6
Valina	23	6	3
Leucina	19	8	6
Isoleucina	10	6	8
Metionina	2	2	3
Prolina	9	2	4
Fenilalanina	6	3	3
Triptofano	8	6	1
Serina	28	10	2
Treonina	23	7	7
Asparagina	15	13	5
Glutamina	10	3	2
Tirosina	4	3	5
Cisteína	10	8	2
Lisina	14	6	18
Arginina	4	11	2
Histidina	2	1	3
Aspartato	8	8	3
Glutamato	5	2	8
Total	245	129	104

2.4 ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS

A seqüência de aminoácidos determina a estrutura espacial da proteína

A organização espacial da proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. A seqüência dos aminoácidos irá determinar o tipo de interação possível entre as cadeias laterais, que, como já exposto, apresentam características de carga, volume e reatividade com a água muito variáveis. A organização tridimensional de uma proteína, desde a seqüência de aminoácidos, passando pelo enrolamento da cadeia polipeptídica até a associação de várias cadeias, pode ser descrita em níveis estruturais de complexidade crescente.

A estrutura das proteínas pode ser descrita em quatro níveis

A *estrutura primária* é a seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica, que é determinada geneticamente, sendo específica para cada proteína. Por convenção, a estrutura primária é escrita na direção amino terminal → carboxila terminal. Exemplificando, os peptídios hipotéticos Ala-Ser-Lys e Lys-Ser-Ala são diferentes, porque, no primeiro caso é o grupo amino da alanina que está livre e, no segundo caso, é o da lisina.

A *estrutura secundária* descreve as estruturas regulares bidimensionais formadas por segmentos da cadeia polipeptídica. Duas organizações são particularmente estáveis: o enrolamento da cadeia ao redor de um eixo e a interação lateral de segmentos de uma cadeia polipeptídica ou de cadeias diferentes. Estas conformações são denominadas, respectivamente, de α -hélice e folha β pregueada, porque foram descobertas nesta ordem. A extensão do trecho da cadeia polipeptídica que se organiza nessas duas configurações pode variar de alguns a dezenas de aminoácidos, conforme a proteína. A α -hélice e a folha β pregueada estabilizam-se por *pontes de hidrogênio*¹ entre o nitrogênio e o oxigênio dos grupos -NH e -C=O, constituintes das unidades peptídicas. Embora a ponte de hidrogênio seja uma ligação fraca, o elevado número destas ligações confere grande estabilidade a essas estruturas.

A α -hélice é mantida por pontes de hidrogênio entre uma unidade peptídica e a quarta unidade peptídica subsequente. Estas pontes de hidrogênio dispõem-se paralelamente ao eixo da hélice. A α -hélice tem um passo de 0,54 nm e apresenta 3,6 resíduos de aminoácidos por volta (Fig. 2.5). As cadeias laterais dos aminoácidos

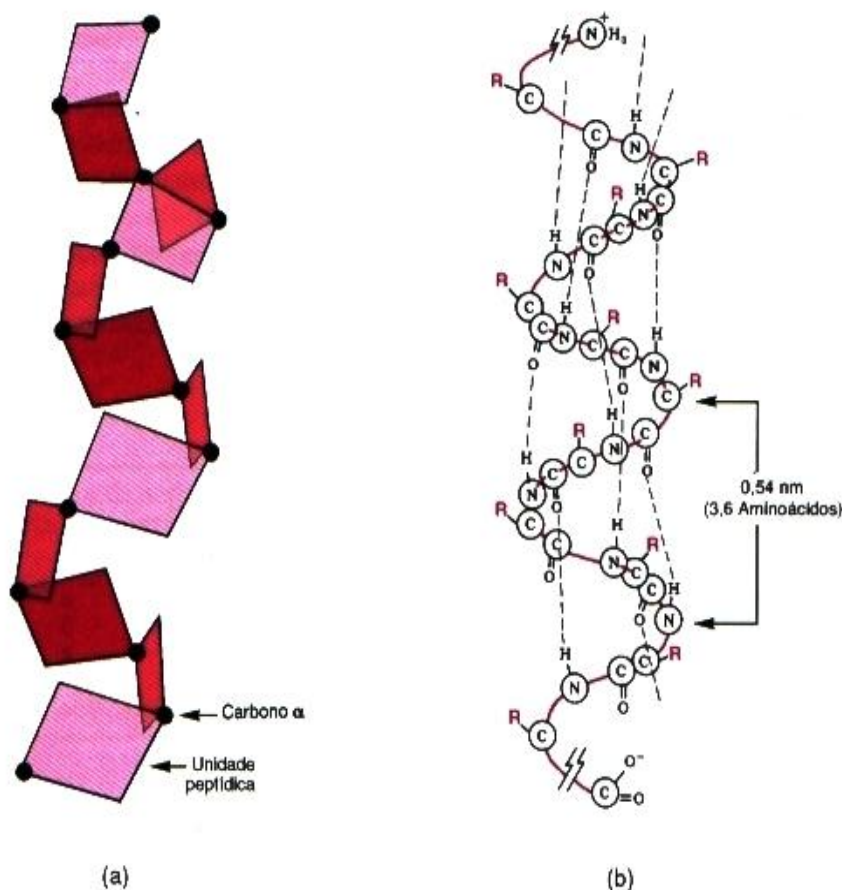


Fig. 2.5 Um particular arranjo espacial das unidades peptídicas forma a α -hélice (a), estabilizada por pontes de H entre átomos que participam das ligações peptídicas (b). (Figura a — De G. Zubay: *Biochemistry*, 1983, Addison-Wesley Publishing Co. Reproduzida com permissão da McGraw-Hill Companies. Figura b — De J.M. Orten & O.W. Neuhaus: *Human Biochemistry*, 1982, The C.V. Mosby Co.)

¹**Pontes de hidrogênio:** Um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a um átomo eletronegativo apresenta carga parcial positiva e pode associar-se a um outro átomo eletronegativo, formando uma ligação, mais fraca, não-covalente, chamada de *ponte de hidrogênio* (*ponte de H*). Nos sistemas biológicos, os átomos eletronegativos são, geralmente, oxigênio e nitrogênio e, menos freqüentemente, enxofre. A energia de formação de uma ponte de hidrogênio (4 a 30 kJ · mol⁻¹) é cerca de 20 vezes menor que a energia de formação de ligações covalentes.

estão projetadas para fora da hélice e, evidentemente, não participam das pontes de hidrogênio, estabelecidas unicamente entre os grupamentos das unidades peptídicas. Por esta razão, a estabilidade da α -hélice independe, até certo ponto, do tipo de cadeia lateral, e muitas seqüências diferentes de aminoácidos podem adotar esta configuração. Todavia, certas seqüências de aminoácidos não podem organizar-se em α -hélice. Isto ocorre, por exemplo, quando a cadeia polipeptídica contém vários aminoácidos adjacentes de mesma carga, que se repelem fortemente. Assim, polilisina em solução a pH 7 não forma α -hélice, pois apresenta as cadeias laterais carregadas positivamente. Em pH 12, contudo, a maioria das cadeias laterais está desprotonada e a polilisina forma α -hélice espontaneamente. A prolina, quando participa da ligação peptídica, não apresenta o átomo de hidrogênio no grupo imino e, portanto, não pode formar ponte de hidrogênio — este aminoácido é geralmente encontrado entre segmentos em α -hélice.

A *folha β pregueada* é uma estrutura também mantida por pontes de hidrogênio entre as unidades peptídicas. Neste caso, entretanto, as ligações são estabelecidas entre cadeias polipeptídicas diferentes ou entre segmentos distantes de uma mesma cadeia. Estas cadeias, ou segmentos de cadeia, exibem uma conformação mais distendida que a α -hélice e dispõem-se lado a lado, o que dá à estrutura formada o aspecto de uma folha pregueada. As pontes de hidrogênio são perpendiculares ao eixo das cadeias, e os grupos R dos aminoácidos projetam-se para cima e para baixo do plano da folha pregueada (Fig. 2.6).

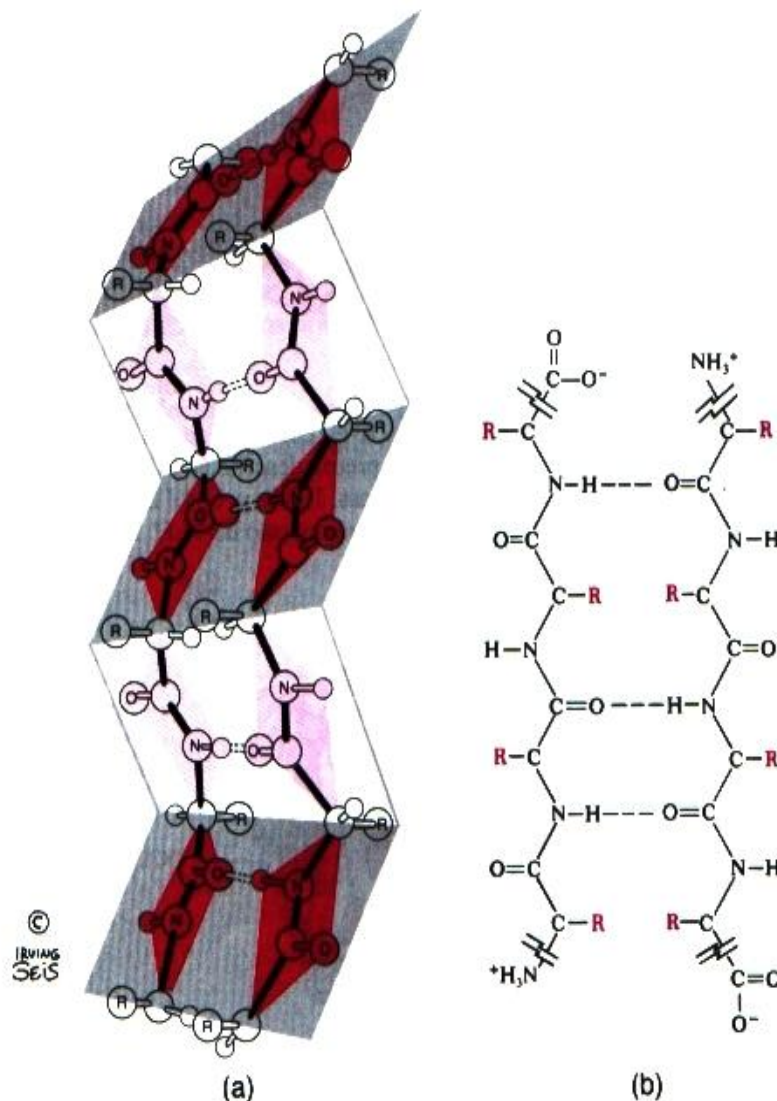


Fig. 2.6 Organização de duas cadeias polipeptídicas em folha β pregueada (a), estabilizada por pontes de H intercadeias (b). (Figura a — De G. Zubay: *Biochemistry*, 1983, Addison-Wesley Publishing Co. Reproduzida com permissão da McGraw-Hill Companies. Figura b — De J.M. Orten & O.W. Neuhaus: *Human Biochemistry*, 1982, The C.V. Mosby Co.)

Os dois tipos principais de estruturas secundárias regulares (α -hélice e folha β pregueada) ocorrem nas proteínas em proporções muito variáveis. Um exemplo extremo é a *mioglobina* — uma proteína de músculo transportadora de oxigênio — que apresenta 80% da cadeia polipeptídica organizada em α -hélice. Sua molécula é formada por oito segmentos em α -hélice, separados por trechos sem estrutura regular, que permitem o dobramento da cadeia (“cotovelos”), alguns deles resultantes da presença de prolina (Fig. 2.7). No outro extremo, proteínas como a *concanavalina A* — proteína vegetal, que tem alta afinidade por determinados carboidratos — têm alto conteúdo de folha β pregueada e não formam α -hélice (Fig. 2.8). A maioria das prote-

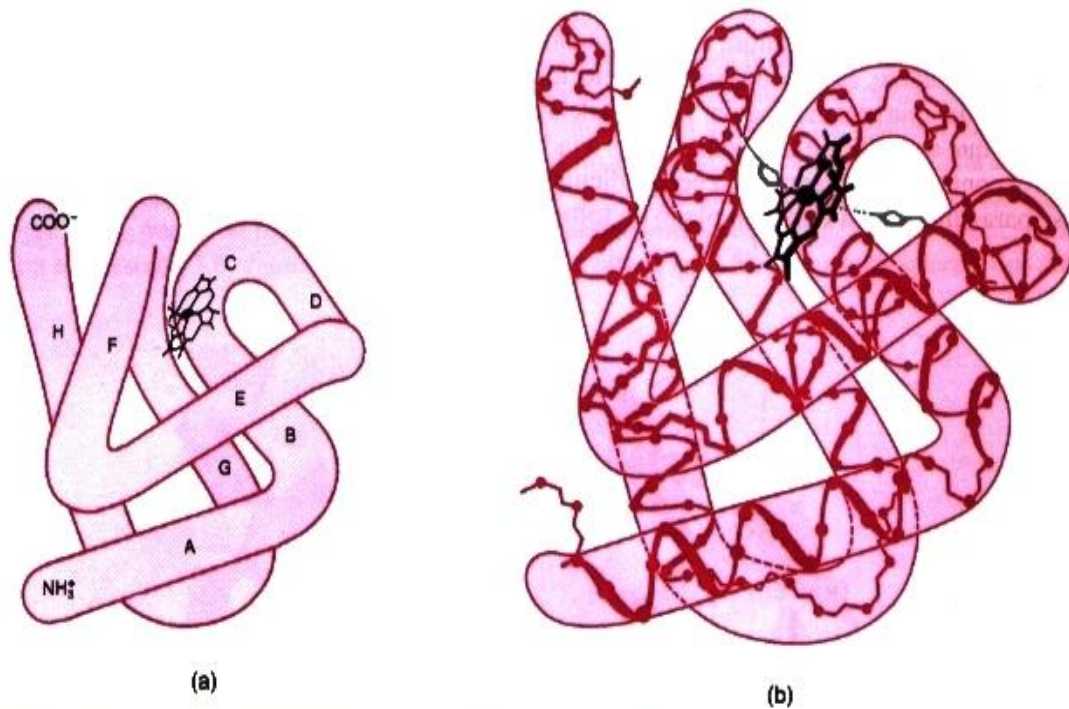


Fig. 2.7 Modelo da mioglobina mostrando os oito segmentos (A-H) em α -hélice (a) e estruturas desenroladas nos “cotovelos” (b). A cadeia polipeptídica liga-se ao grupo heme (em preto), descrito no Capítulo 3. [Segundo R.E. Dickerson. Em *The Proteins*, H. Neurath, ed., 2nd ed., vol. 2 (Academic Press, 1964), p. 634.] De *Biochemistry*, 4th ed. By Lubert Stryer. © 1975, 1981, 1988, 1985 by Lubert Stryer. Usada com permissão da W.H. Freeman and Company.

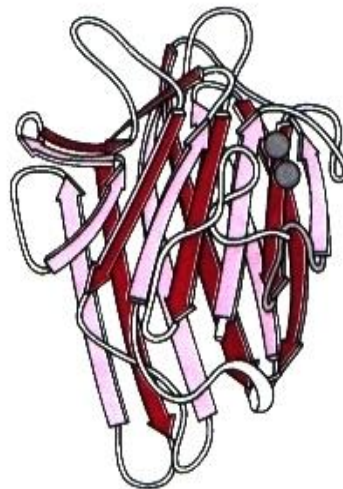


Fig. 2.8 A estrutura secundária da concanavalina A é do tipo folha β pregueada. Os trechos da cadeia polipeptídica com esta configuração são representados por setas que apontam na direção amino terminal \rightarrow carboxila terminal; as esferas representam cofatores metálicos. (Reproduzida de Devlin, T.M.: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley-Liss Inc., 1992.)

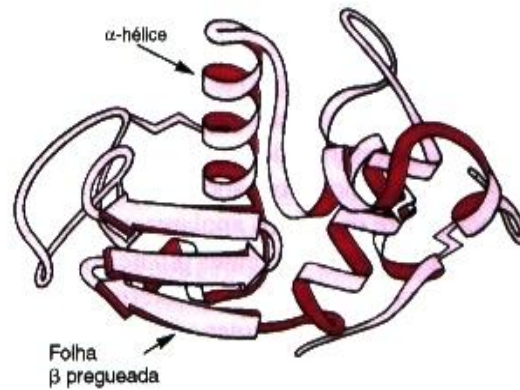


Fig. 2.9 Estrutura da lisozima do ovo, que apresenta segmentos em α -hélice, em folha β pregueada e sem estrutura regular. (De G. Zubay: Biochemistry, 1983, Addison-Wesley Publishing Co. Reproduzida com permissão da McGraw-Hill Companies.)

ínas exibem os dois tipos de estrutura secundária, como acontece com a *lisozima* (Fig. 2.9) — enzima presente na clara de ovo e nas lágrimas, que hidrolisa componentes da parede celular de bactérias, atuando, portanto, como bactericida.

A *estrutura terciária* descreve o dobramento final da cadeia polipeptídica por interação de regiões com estrutura regular (α -hélice ou folha β pregueada) ou de regiões sem estrutura definida (Figs. 2.7-2.9). Neste nível de organização, segmentos distantes da estrutura primária podem aproximar-se e interagir, através de ligações não-covalentes entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Estas ligações são consideradas fracas ($4\text{-}30\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), quando comparadas a ligações covalentes ($200\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Como discutido anteriormente para as pontes de hidrogênio da estrutura secundária, é o grande número de ligações individualmente fracas que permite a manutenção dos dobramentos da estrutura terciária das proteínas. Estas ligações podem ser de diferentes tipos (Fig. 2.10):

1. *Pontes de hidrogênio* — estabelecidas entre grupos R de aminoácidos polares com ou sem carga. Por exemplo, serina e treonina, que apresentam grupo hidroxila, podem formar ponte de hidrogênio com asparagina

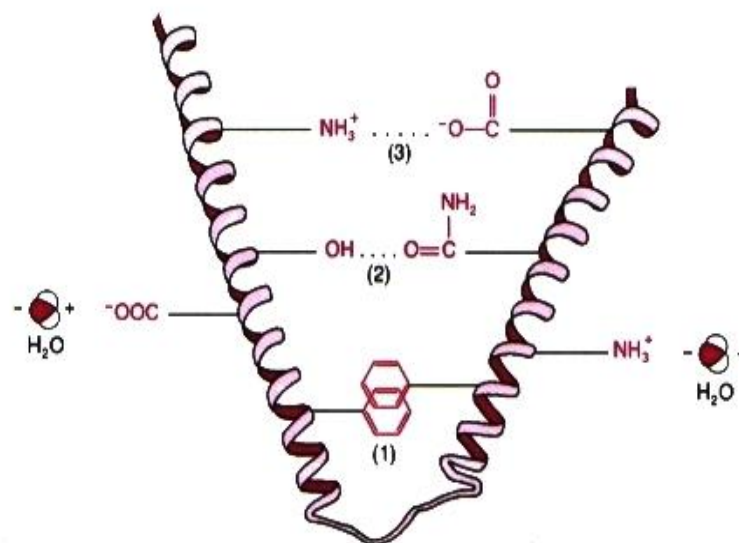


Fig. 2.10 Esquema de um "cotovelo" da estrutura terciária de uma proteína globular, formado graças à interrupção de dois segmentos em α -hélice e estabilizado por ligações não-covalentes: interação hidrofóbica (1), ponte de H (2) e interação eletrostática (3). Estão mostradas, ainda, as interações eletrostáticas entre cadeias carregadas e dipolos da água.

ou glutamina, que apresentam grupo carbonila. As pontes de hidrogênio da estrutura terciária, naturalmente, não apresentam um padrão regular de disposição, ao contrário do que ocorre com as pontes de hidrogênio da estrutura secundária, com as quais não devem ser confundidas.

2. *Interações hidrofóbicas* — formadas entre as cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos apolares. Estas cadeias não interagem com a água, determinando uma retração das moléculas de água ao seu redor. Os grupos hidrofóbicos aproximam-se, reduzindo a área apolar exposta ao solvente. As interações hidrofóbicas não resultam de qualquer atração entre os grupos apolares, mas sim, de propriedades do solvente: são características de um ambiente aquoso, e outros solventes polares não propiciam a sua formação. Naturalmente, a maioria das cadeias hidrofóbicas localizam-se no interior apolar da molécula proteica. As interações hidrofóbicas são as mais importantes para a manutenção da conformação espacial das proteínas, dado o grande número (oito) de aminoácidos hidrofóbicos.
3. *Ligações eletrostáticas* ou *iônicas* — incluem-se, nesta categoria, interações de grupos com cargas opostas, como os presentes nos aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) e ácidos (aspartato e glutamato). Estas ligações têm importância fundamental para o dobramento da cadeia polipeptídica, quando ocorrem no interior apolar da proteína. Todavia, esta situação não é muito freqüente: a maioria dos grupos carregados de uma proteína localizam-se na sua superfície, estabelecendo interações íon-dipolo com a água, que forma uma camada organizada em volta da molécula proteica, a *camada de solvatação*.

Além das ligações não-covalentes já descritas, os dobramentos de uma cadeia polipeptídica podem ser estabilizados por uma ligação covalente, a *ponte dissulfeto* ($-S-S-$), formada entre dois resíduos de cisteína por uma reação de oxidação. Pontes dissulfeto são raramente encontradas em proteínas intracelulares, provavelmente devido à presença de altas concentrações citoplasmáticas de glutatona (p. 162), que rompem estas ligações. A grande maioria das proteínas contendo pontes dissulfeto localizam-se na superfície celular ou são secretadas para o meio extracelular. Este é o caso da insulina, que apresenta três pontes dissulfeto (Fig. 19.13).

A *estrutura quaternária* descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades), para compor uma proteína funcional oligomérica. A estrutura quaternária é mantida por ligações não-covalentes entre as subunidades, dos mesmos tipos que mantêm a estrutura terciária. As subunidades que constituem uma proteína podem ser iguais ou diferentes. A molécula de *hemoglobina*, por exemplo, é formada por quatro cadeias polipeptídicas, iguais duas a duas, chamadas α e β , associadas sobretudo por interações hidrofóbicas, com contribuição menor de pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas (Fig. 2.11).

Os diferentes níveis de organização estrutural descritos nesta seção são encontrados nas proteínas globulares (Seção 2.5).

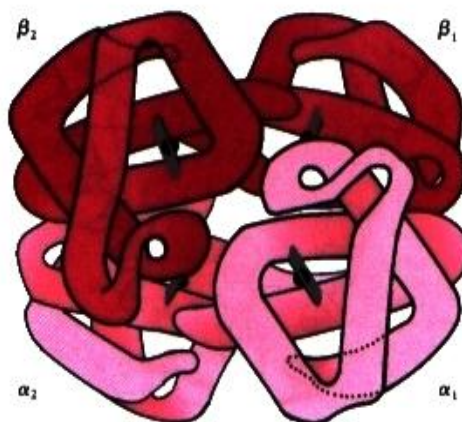


Fig. 2.11 A estrutura quaternária da hemoglobina consiste na associação de duas cadeias α e duas cadeias β , cada uma associada a um grupo heme. (Reproduzida de Biochemistry por Mathews, © 1990 by Benjamin/Cummings Pub. Co. Com permissão de The Estate of Irving Geis.)

A estrutura terciária pode ser formada por domínios

Muitas vezes, pode-se distinguir na estrutura terciária de uma proteína monomérica, ou na estrutura terciária das subunidades componentes de uma proteína polimérica, regiões diferenciadas, chamadas *domínios*. Cada domínio tem uma organização espacial compacta, com o interior hidrofóbico e a superfície externa polar. Geralmente, cadeias polipeptídicas longas (com mais de 200 resíduos de aminoácidos) são as que se dobram em dois ou mais domínios. O grau de interação entre domínios pode variar desde domínios independentes, ligados por um segmento flexível da cadeia polipeptídica, ou domínios separados por uma fenda estreita, até aqueles que estabelecem um contato muito íntimo. Em qualquer um dos casos, os domínios podem movimentar-se, uns em relação aos outros. Esta flexibilidade é fundamental para que a molécula de proteína possa ligar-se eficientemente a outros compostos. Por exemplo, em muitas enzimas, a ligação com a molécula de substrato ocorre em fendas situadas entre domínios; estes aproximam-se, encaixando o substrato na molécula da enzima (Fig. 5.5). Os domínios de uma proteína com diversas funções podem estar associados, cada um, com uma função diferente.

2.5 PROTEÍNAS GLOBULARES E FIBROSAS

As proteínas são chamadas de globulares ou fibrosas, segundo sua forma. As proteínas que apresentam uma ou mais cadeias polipeptídicas organizadas em uma forma final aproximadamente esférica são chamadas *globulares*. São geralmente solúveis e desempenham várias funções dinâmicas, exemplificadas no início deste capítulo.

As *proteínas fibrosas* apresentam forma alongada, são geralmente insolúveis e desempenham um papel basicamente estrutural nos sistemas biológicos. Ao contrário das globulares, são formadas pela associação de módulos repetitivos, possibilitando a construção de grandes estruturas. O componente fundamental das proteínas fibrosas são cadeias polipeptídicas muito longas com estrutura secundária regular: α -hélice nas α -queratinas, folha β pregueada nas β -queratinas e uma hélice característica no colágeno.

Nas α -queratinas, duas ou três cadeias em α -hélice associam-se lateralmente, formando longos cabos helicoidais, que, reunidos, formam fibrilas e fibras. As α -queratinas são o componente principal da epiderme dos vertebrados e de estruturas relacionadas, como: cabelo, lã, chifres, unhas, cascos, bicos e penas. Nestas proteínas, é freqüente a formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína de cadeias polipeptídicas ou fibrilas adjacentes, conferindo grande resistência às fibras. O padrão de distribuição dessas pontes determina o grau de ondulação do cabelo e da lã. A tropomiosina, uma proteína componente das miofibrilas, também é formada por associação de cadeias polipeptídicas em α -hélice.

Nas β -queratinas, as fibras são formadas por empilhamento de folhas β pregueadas, como acontece na fibroína da seda e das teias de aranha.

No caso do *colágeno*, as cadeias polipeptídicas apresentam uma conformação helicoidal típica, derivada da sua composição exótica em aminoácidos — alto conteúdo de glicina, prolina e o aminoácido modificado hidroxiprolina — e da grande regularidade na estrutura primária, sendo freqüente a seqüência glicina-prolina-hidroxiprolina. Estas características, diferentes da maioria das proteínas, permitem a associação íntima de três cadeias, que formam uma hélice tripla, o *tropocolágeno*, o módulo estrutural básico do colágeno. As moléculas de tropocolágeno associam-se, formando as fibrilas de colágeno, que são estabilizadas por ligações covalentes entre as cadeias componentes do tropocolágeno ou entre moléculas de tropocolágeno adjacentes (Fig. 2.12). O colágeno é a molécula mais abundante dos vertebrados. Suas fibras são responsáveis pelas funções mecânicas e de sustentação do tecido conjuntivo, que se distribui pelas cartilagens, tendões e matriz óssea; localiza-se, ainda, sob a pele e mantém a forma do sistema cardiovascular, fígado, pulmão e outros órgãos. O número de ligações covalentes do colágeno aumenta com a idade do animal (o que explica a maior rigidez da carne de animais mais velhos) e varia conforme a atividade fisiológica do tecido considerado. A estrutura do colágeno é rompida por aquecimento, originando uma proteína desenrolada, mais solúvel, chamada *gelatina*. Este é o princípio da fabricação industrial desta proteína, muito freqüente na dieta humana. O valor nutricional da gelatina será analisado no Capítulo 18.

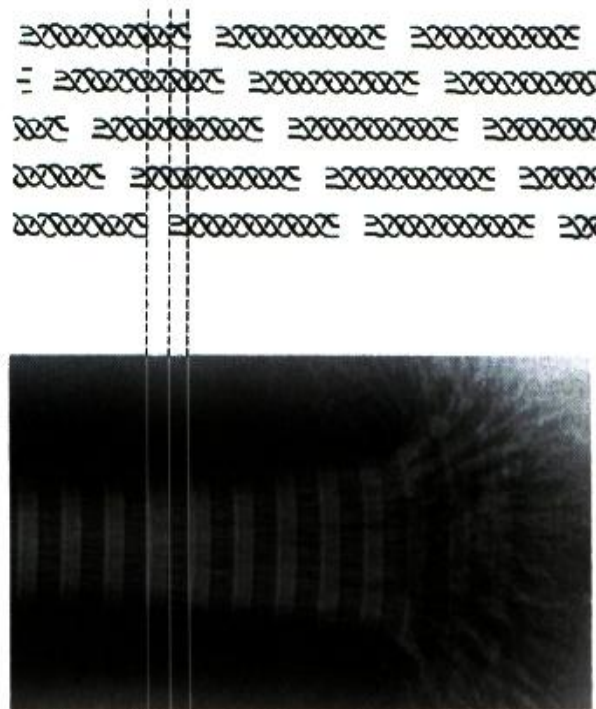


Fig. 2.12 Associação de moléculas de tropocolágeno para formar fibrilas de colágeno: as moléculas ficam deslocadas umas em relação às outras, o que atribui, à fibrila de colágeno, um aspecto estriado ao microscópio eletrônico. As ligações covalentes que estabilizam o colágeno não estão mostradas. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J.: Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

2.6 PROTEÍNAS CONJUGADAS

As proteínas podem apresentar aminoácidos modificados ou componentes não-proteicos

Muitas proteínas contêm resíduos de determinados aminoácidos modificados, além dos 20 usuais. Esses aminoácidos exóticos formam-se por alteração enzimática de aminoácidos usuais, após incorporação na cadeia polipeptídica, durante a síntese da proteína.

No colágeno, por exemplo, é freqüente a hidroxilação das cadeias laterais de prolina e lisina. Estes resíduos de aminoácidos modificados participam das ligações cruzadas que estabilizam essa proteína. A reação enzimática que produz as hidroxilações requer a presença de *ácido ascórbico (vitamina C)*. No homem, a deficiência de ácido ascórbico na dieta causa o *escorbuto*. As manifestações clínicas desta doença correlacionam-se com a síntese de moléculas de colágeno menos estáveis e com a sua distribuição nos tecidos: interrupção do crescimento dos ossos em crianças, má cicatrização de ferimentos e aumento da fragilidade de vasos sanguíneos, resultando em hemorragias na pele e gengivas, principalmente.

Em outras proteínas, pode ocorrer acetilação do grupo amino de lisina ou fosforilação de serina, treonina e tirosina. A adição e a remoção de grupos fosfato é um fenômeno cíclico freqüentemente encontrado em proteínas com função enzimática. A fosforilação altera profundamente a atividade destas enzimas (ver Regulação por modificação covalente, p. 261).

As proteínas podem, ainda, apresentar moléculas orgânicas não-proteicas, ligadas à cadeia polipeptídica. Estes componentes são designados *grupos prostéticos*, e as proteínas, neste caso, são chamadas *proteínas conjugadas*. O grupo prostético é de natureza variável, podendo ligar-se à cadeia polipeptídica covalente ou não-covalentemente. Na mioglobina (Fig. 2.7), a cadeia polipeptídica liga-se não-covalentemente a um grupo prostético chamado *heme*, o mesmo acontecendo com cada uma das quatro cadeias da hemoglobina (Fig. 2.11); a estrutura do grupo heme será descrita no Capítulo 3. O grupo prostético pode ser um carboidrato ou um lipídio, covalentemente ligados, e a proteína conjugada chama-se glicoproteína ou lipoproteína, respectivamente.

Glicoproteínas são encontradas em todos os compartimentos celulares, mas constituem, principalmente, as proteínas secretadas pelas células e aquelas localizadas na sua superfície externa. Exemplos de glicoproteínas secretadas são as mucinas das secreções mucosas e muitas proteínas do sangue, como as que participam da coagulação sanguínea e as imunoglobulinas. As glicoproteínas da membrana plasmática funcionam como marcadores biológicos, que permitem a comunicação entre as células. Proteínas estruturais importantes, como o colágeno, contêm carboidratos; o interferon e alguns hormônios também são glicoproteínas. A própria hemoglobina pode ligar-se à glicose, formando a *hemoglobina glicosilada*, quando a concentração de glicose no sangue (*glicemia*) aumenta. Esta condição ocorre em pacientes com diabetes, e a evolução da doença pode ser monitorada através de medidas da concentração de hemoglobina glicosilada.

Quanto às *lipoproteínas*, deve-se distinguir entre proteínas que apresentam algumas moléculas de lipídios covalentemente ligados, das chamadas lipoproteínas plasmáticas. As primeiras são proteínas conjugadas no sentido estrito, como, por exemplo, as lipoproteínas da parede celular de certas bactérias, que contêm moléculas de ácidos graxos covalentemente ligados. Por outro lado, as lipoproteínas plasmáticas são partículas de alto peso molecular, formadas por inúmeras moléculas de lipídios e algumas poucas moléculas de proteína, associadas por ligações não-covalentes. Estas partículas atuam no transporte de lipídios pelo sangue.

2.7 CARGA ELÉTRICA E SOLUBILIDADE DAS PROTEÍNAS

O valor do pI de uma proteína reflete a sua composição em aminoácidos

A carga elétrica total de uma proteína é o somatório das cargas apresentadas pelos radicais dos aminoácidos que a compõem. A carga destes radicais depende, por sua vez, do valor de seu pK_a e do pH da solução. Para cada proteína existe um determinado valor de pH — chamado *ponto isoelétrico (pI)* — no qual o número de cargas positivas equivale ao número de cargas negativas. Neste pH, a molécula é eletricamente neutra, como acontece com as moléculas de aminoácidos. Todavia, o pI de proteínas não pode ser calculado a partir dos valores de pK_a dos aminoácidos componentes, devido ao seu grande número e, principalmente, porque o valor de pK_a dos aminoácidos varia conforme a sua localização na estrutura da proteína (Quadro 2.1). O pI das proteínas é determinado experimentalmente: é o valor de pH no qual elas não migram, quando submetidas a um campo elétrico (ver Eletroforese, p. 35).

As proteínas exibem valores de pI característicos que refletem a proporção entre aminoácidos ácidos e básicos em sua composição (Quadro 2.5). De fato, para a pepsina, por exemplo, que tem muito mais aminoácidos ácidos (28%) que aminoácidos básicos (2%), a neutralidade será obtida quando a grande maioria dos aminoácidos ácidos estiverem protonados (sem carga) e apenas uma pequena fração desprotonada (com carga negativa), que compensará a carga positiva dos aminoácidos básicos. Esta situação é encontrada em um valor de pH muito ácido (pI = 1). No caso do citocromo *c*, cuja porcentagem de aminoácidos básicos é aproximadamente o dobro daquela de aminoácidos ácidos, o pI corresponde ao valor de pH em que cerca da metade

Quadro 2.5 Ponto isoelétrico (pI) de algumas proteínas e sua composição em aminoácidos ácidos e básicos

Proteínas	pI	Aminoácidos (%)					$\frac{\text{Ácidos}}{\text{Básicos}}$
		Ácidos		Básicos			
		Asp	Glu	Arg	His	Lys	
Pepsina	1,0	16,6	11,3	1,0	0,5	0,4	15
Albumina	4,8	10,4	17,4	6,2	3,5	12,3	1,3
Mioglobina	7,0	4,7	8,3	1,9	7,5	12,8	0,6
Citocromo <i>c</i>	10,6	3,6	5,9	2,2	2,5	15,2	0,5

dos aminoácidos básicos estão desprotonados, ou seja, um pH alcalino ($pI = 10,6$). Proteínas com pI maior que 7 são chamadas de *proteínas básicas*, e aquelas com pI menor que 7, de *proteínas ácidas*.

O pI é, portanto, um pH em que a proteína apresenta o mesmo número de grupos ácidos desprotonados e grupos básicos protonados. O abaixamento de pH resulta sempre em aumento da carga positiva da proteína, por ganho de carga positiva (protonação de grupamentos básicos) ou perda de carga negativa (protonação de grupamentos ácidos); portanto, em pH menor do que o pI , a proteína apresenta uma carga líquida positiva, tanto maior quanto mais afastado do pI for o pH. Por um raciocínio análogo, conclui-se que, acima do pI , a proteína apresenta carga negativa (grupos ácidos desprotonados adquirem carga negativa e grupos básicos desprotonados perdem carga positiva).

A solubilidade das proteínas é influenciada pela composição do meio aquoso

A solubilidade das proteínas é determinada, fundamentalmente, pela estrutura primária, que define a relação espacial entre os aminoácidos na estrutura tridimensional e sua interação com a água. Por outro lado, características do meio, tais como o pH, a concentração de sais e a constante dielétrica do solvente, interferem na solubilidade.

A variação da carga líquida de uma proteína tem implicações na sua solubilidade. No pI a solubilidade é menor do que em outros valores de pH, onde as moléculas têm todas a mesma carga e se repelem eletrostaticamente, estabilizando-se em solução (Fig. 2.13).

As proteínas apresentam também alteração da solubilidade em função da concentração de sais. Muitas proteínas globulares são insolúveis em água e tornam-se cada vez mais solúveis conforme se aumenta a adição de sal (Fig. 2.13), até certas concentrações limitantes, que dependem da proteína e do tipo de sal escolhido (trecho ascendente das curvas da Fig. 2.14). Este fenômeno é chamado "*salting in*". Acredita-se que os íons adicionais (positivos e negativos), presentes em solução, interagem com os grupos carregados das moléculas de proteína, atenuando a interação entre elas. Deste modo, o efeito eletrostático de íons em soluções salinas diluídas é um fator adicional para o aumento da solubilidade das proteínas, além da sua camada de solvatação.

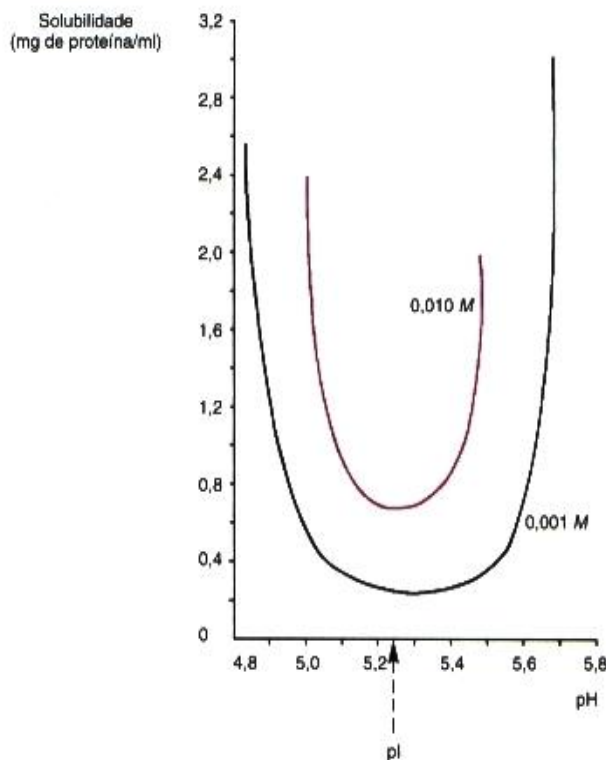


Fig. 2.13 Solubilidade de uma proteína globular em função do pH, em duas concentrações de NaCl. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J.: Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

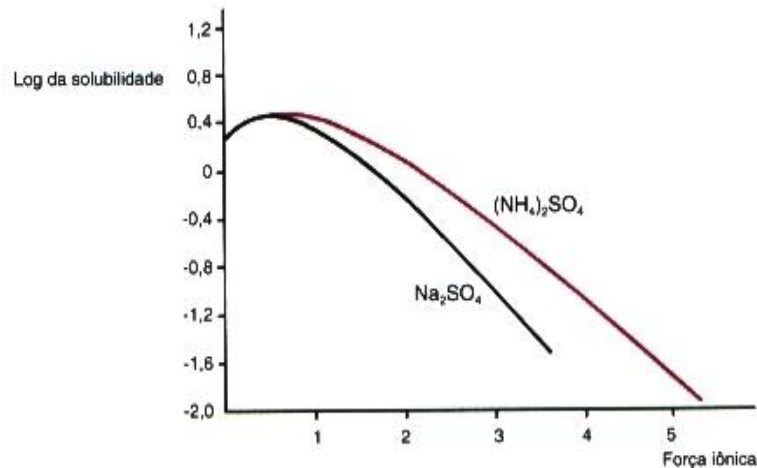


Fig. 2.14 Solubilidade da hemoglobina equina, em função da concentração de dois sais — Na_2SO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — expressa em termos da força iônica da solução. (De Smith, E.L.; Hill, R.L.; Lehman, I.R.; Lefkowitz, R.J.; Handler, P. & White, A.: Principles of Biochemistry: General Aspects, 7th ed., 1985. Reproduzida com permissão da McGraw-Hill Companies.)

Por outro lado, quando a concentração de sal atinge valores muito elevados, a solubilidade das proteínas diminui (trecho descendente das curvas da Fig. 2.14) até sua precipitação. Este efeito, chamado de “*salting out*”, ocorre com sais di ou trivalentes, que competem com a proteína por moléculas de água para solvatação. Em altas concentrações desses sais, há tantos íons solvatados, que a quantidade de água disponível torna-se insuficiente para dissolver todos os solutos: as interações proteína-proteína tornam-se mais fortes que as interações proteína-solvente, a proteína sofre agregação e precipita. Como cada proteína precipita em uma concentração salina característica (Fig. 2.15), o *salting out* pode ser empregado para separar proteínas. De fato, esta técnica costuma ser a etapa inicial de processos de purificação de proteínas. O sal mais utilizado é o sulfato de amônio — $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — devido à sua alta solubilidade, que permite obter soluções muito concentradas; além disso, este sal, por razões desconhecidas, estabiliza a estrutura nativa das proteínas, possibilitando que elas precipitem sem sofrer desnaturação.

Solventes orgânicos solúveis em água, como acetona e etanol, diminuem a solubilidade das proteínas, devido ao baixo valor de suas constantes dielétricas e porque eles também sofrem hidratação. Em soluções aquosas

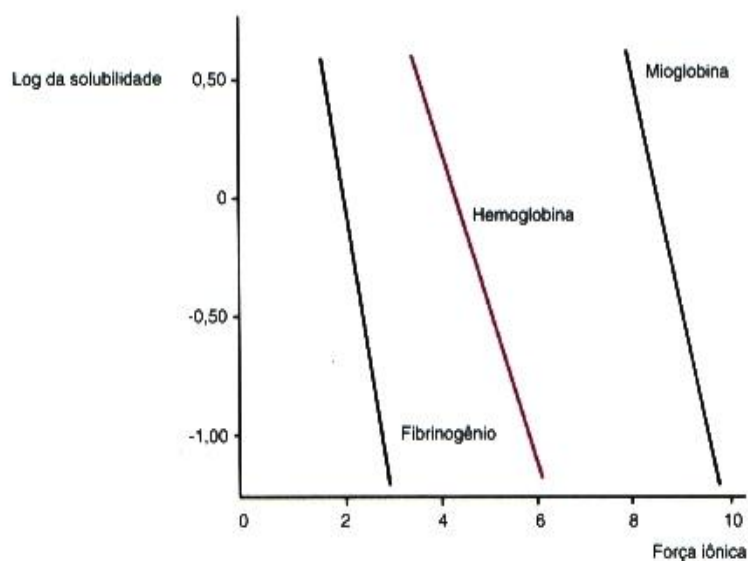


Fig. 2.15 Solubilidade de algumas proteínas em soluções contendo altas concentrações de sulfato de amônio, expressa em termos da força iônica da solução. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J.: Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

desses compostos, moléculas contendo grupos com carga, como as proteínas, sofrem menor hidratação e interação tão fortemente que precipitam. Procedimentos experimentais que utilizam a adição de solventes orgânicos para precipitar proteínas devem ser realizados a 0°C, porque, em temperaturas mais altas, eles provocam a desnaturação das proteínas.

2.8 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DAS PROTEÍNAS

A desnaturação de proteínas acarreta a perda de sua estrutura original

Quando uma proteína é sintetizada na célula, sua estrutura primária dobra-se espontaneamente, originando as estruturas secundária e terciária. Se a proteína em questão possuir estrutura quaternária, esta também se organiza espontaneamente, assim que a estrutura terciária das subunidades componentes é formada. A proteína assume a conformação denominada *nativa*. Esta é a conformação mais estável que a molécula pode assumir naquelas condições e reflete um equilíbrio delicado entre as interações ocorridas no interior da molécula proteica e entre esta e seu meio ambiente.

Ao proceder-se ao isolamento e purificação de uma proteína, a partir das células onde ela é encontrada, são introduzidas alterações físicas e químicas no seu meio ambiente, que podem afetar sua estrutura espacial a ponto de ocasionar a perda de sua função biológica. A proteína é dita, então, *desnaturada*: sua conformação nativa é destruída devido à quebra de ligações não-covalentes (as ligações peptídicas são mantidas) e o resultado é uma cadeia polipeptídica distendida.

A desnaturação pode ser provocada, experimentalmente, por vários tipos de tratamento, que ocasionam o rompimento de ligações não-covalentes, como, por exemplo, o aquecimento da proteína. A temperatura de desnaturação da maioria das proteínas situa-se abaixo de 100°C, com exceção das proteínas de *bactérias termofílicas* que habitam fontes térmicas, onde a temperatura é próxima de 100°C; um fato curioso é que a estrutura espacial dessas proteínas termoestáveis apresenta apenas diferenças sutis em relação à estrutura de proteínas com estabilidade térmica normal. Valores de pH muito baixos ou muito altos, afetando a ionização dos grupamentos da proteína, conferem à molécula uma elevada carga positiva (ou negativa), ocasionando repulsão intramolecular, com exposição do interior hidrofóbico. A adição de solventes orgânicos polares e de compostos com grande capacidade de formar pontes de hidrogênio (uréia) determina a desnaturação da proteína porque estes últimos agentes estabelecem pontes de hidrogênio com radicais da proteína, substituindo ligações que mantinham a estrutura nativa, e os solventes orgânicos por diminuírem a constante dielétrica do meio. A desnaturação também pode ser ocasionada por detergentes e sabões, que são compostos anfipáticos, ou seja, apresentam uma cadeia longa apolar, ligada a um grupo terminal carregado.

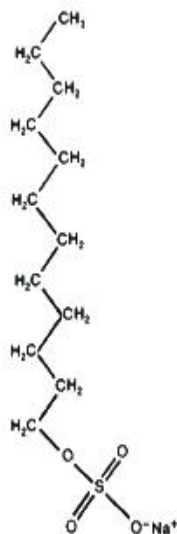


Fig. 2.16 O detergente dodecil sulfato de sódio (SDS).

Estes agentes são desnaturantes porque sua cauda hidrofóbica se introduz no interior da molécula proteica e se associa com radicais apolares, rompendo interações hidrofóbicas que mantêm a estrutura nativa. Um detergente freqüentemente empregado é o dodecil sulfato de sódio (SDS) (Fig. 2.16).

A desnaturação pode ser irreversível: algumas proteínas, quando desnaturadas, tornam-se insolúveis. É o caso da albumina do ovo, quando aquecida, e da caseína, quando o leite é acidificado, por exemplo, por crescimento bacteriano.

Proteínas desnaturadas podem renaturar

Retiradas as condições desnaturantes, muitas proteínas podem reassumir sua conformação nativa — este processo chama-se *renaturação*. A renaturação demonstra que a estrutura tridimensional de uma proteína é uma consequência de sua estrutura primária. Todavia, a velocidade e a eficiência da renaturação *in vitro* são muito menores que o dobramento das cadeias polipeptídicas até atingirem a sua conformação nativa, conforme estão sendo sintetizadas dentro da célula. Isto acontece devido à presença, nas células, de determinadas proteínas que assessoram a proteína durante a “montagem” de sua estrutura nativa, determinada, unicamente, por sua seqüência de aminoácidos. Um exemplo destas proteínas são as *chaperoninas*¹ que ligam-se a proteínas nascentes, impedindo ou revertendo interações inadequadas entre regiões potencialmente complementares. O mecanismo de ação das chaperoninas ainda não está totalmente elucidado; muitas delas catalisam hidrólise de ATP, provendo energia para direcionar o dobramento correto das cadeias polipeptídicas. Outros tipos de proteínas assessorias possibilitam a estabilização de proteínas em condições desfavoráveis, como, por exemplo, altas temperaturas; elas atuam revertendo a desnaturação e a agregação das moléculas que ocorrem nessas condições. Este é o caso da proteína bacteriana *hsp70* (de *heat shock protein*), cuja concentração aumenta muito, quando as células são submetidas a choque térmico. As proteínas assessorias são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas desde em bactérias até em mamíferos.

A substituição de aminoácidos pode alterar a função das proteínas

A desnaturação, como descrito anteriormente, é o rompimento da estrutura nativa, que leva à perda da função da proteína. Todavia, alterações menos drásticas da estrutura da proteína podem inativá-la. Uma mutação que resulte na substituição de um aminoácido em uma posição crítica na molécula da proteína pode ter consequências danosas para o desempenho da sua função. O exemplo clássico é a substituição, nas cadeias β da hemoglobina, de um resíduo de glutamato, cujo radical polar negativo localiza-se na superfície externa da molécula, por valina, com grupo R apolar. As moléculas de hemoglobina substituída, quando desoxigenadas, agregam-se através de ligações hidrofóbicas envolvendo os radicais apolares de valina. Os agregados formam um precipitado fibroso que distorce as hemácias, que adquirem forma de foice — *sickle*, em inglês — e, por isso, a hemoglobina alterada é chamada de *hemoglobina S*, em contraposição à hemoglobina normal, a *hemoglobina A*. Estas células deformadas obstruem os capilares, impedindo a oxigenação adequada dos tecidos; também são mais frágeis que as normais, ocasionando anemia grave. Esta doença é conhecida como *anemia falciforme*, e manifesta-se somente quando a mutação ocorre em homozigose: indivíduos heterozigotos são normais. Hemoglobinas mutantes serão ainda analisadas no próximo capítulo.

2.9 ESTRATÉGIA GERAL PARA A PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A purificação de uma proteína inicia-se com a liberação da proteína do material biológico onde ela ocorre — órgãos, tecidos ou células isoladas, como hemácias, bactérias e leveduras — através do rompimento destas estruturas, que pode ser obtido por metodologias diversas. A homogenização mecânica em meio isotônico, por exemplo, produz o maceramento dos tecidos (ou órgãos) e a lise das células, originando um *extrato celular*, constituído por pedaços de membrana plasmática, organelas (núcleos, mitocôndrias etc.) e o citossol. Os

¹ Denominação originada do termo francês *chaperon*, utilizado para designar uma senhora que, antigamente, acompanhava e vigiava moças solteiras.

diversos componentes celulares podem ser separados por um procedimento denominado *fracionamento celular*, que consiste em centrifugar o extrato celular em velocidades progressivamente maiores. Geralmente, quanto menor for uma estrutura, maior será a força centrífuga necessária para sedimentá-la; como os componentes celulares diferem em tamanho, eles sedimentarão em velocidades diferentes, podendo, assim, ser separados uns dos outros. Quando a proteína desejada localiza-se apenas em uma das frações obtidas — mitocôndrias, por exemplo — o fracionamento celular propicia uma purificação inicial considerável.

Uma vez conseguida uma preparação contendo a proteína, esta pode ser separada de outras proteínas e de outros tipos de moléculas através de métodos que se baseiam em propriedades características, tais como: solubilidade, tamanho, carga elétrica e afinidade por determinados compostos. O método de purificação a ser escolhido dependerá da particular proteína que se pretende isolar, e, usualmente, empregam-se combinações sequenciais de diferentes métodos. Frequentemente, o primeiro passo empregado para a separação de proteínas de extratos brutos é a precipitação por adição de sais (sulfato de amônio) ou solventes orgânicos miscíveis com água — a separação, neste caso, baseia-se em diferenças de solubilidade apresentadas pelas proteínas. Todavia, estas técnicas permitem apenas uma purificação parcial e devem ser seguidas de outras, mais seletivas, como cromatografia e eletroforese. A purificação da proteína deve ser monitorada ao longo das diferentes etapas de separação e, para isso, é necessário dispor de um método que permita detectar e quantificar unicamente a proteína de interesse. Esta situação será exemplificada no Capítulo 5, com a purificação de uma enzima.

A estratégia descrita para o isolamento de proteínas aplica-se, basicamente, à purificação de muitas outras moléculas biológicas.

Atualmente, proteínas podem ser obtidas por um caminho totalmente diferente, graças ao desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante. O gene que codifica a proteína desejada pode ser isolado das células de origem e expresso em organismos com crescimento rápido, como bactérias e leveduras. Muitas vezes, a proteína heteróloga, que na célula original ocorria em concentrações da ordem de 0,002%, passa a representar de 30 a 40% do conteúdo proteico das células recombinantes. Obviamente, esta alta concentração facilita muito o isolamento da proteína.

2.10 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

2.10.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Na *cromatografia em coluna*, uma amostra da mistura de proteínas é aplicada no topo de uma coluna formada por uma matriz hidratada, que pode ser constituída de diversos tipos de materiais, denominados conjuntamente *resinas*. A coluna é, então, eluída (lavada) com uma solução apropriada para a separação da proteína de interesse. As diferentes proteínas migrarão através da coluna com velocidades diferentes que dependerão do grau de interação com a matriz, o que permite a sua separação. Os vários métodos de cromatografia em coluna disponíveis diferem quanto à matriz utilizada e são classificados de acordo com a propriedade das proteínas que é discriminada pela matriz: tamanho (cromatografia de exclusão), carga iônica (cromatografia de troca iônica) e especificidade de ligação (cromatografia de afinidade).

Cromatografia de exclusão (filtração em gel)

A *cromatografia de exclusão*, também chamada de *cromatografia por filtração em gel*, separa moléculas que diferem quanto ao tamanho, como acontece com as proteínas, cujo peso molecular varia de alguns milhares (5.733 para insulina) a milhões (2.800.000 para hemocianina, uma proteína transportadora de oxigênio de certos invertebrados). A matriz, nesta técnica, é um gel constituído por esferas com poros de tamanho definido. As moléculas menores do que o diâmetro dos poros podem penetrar nas esferas, ao passo que as maiores, não: são “excluídas”. Deste modo, as moléculas menores percorrem, ao longo de uma coluna com esse material, um trajeto muito maior do que as moléculas maiores, que sairão da coluna em primeiro lugar (Fig. 2.17). Um material comumente empregado para a fabricação de géis cromatográficos é *dextrana*, um polímero de glicose, comercialmente disponível com o nome de *Sephadex*; este produto é sintetizado com diversos tamanhos de poros, permitindo a exclusão de moléculas com um largo intervalo de peso molecular.

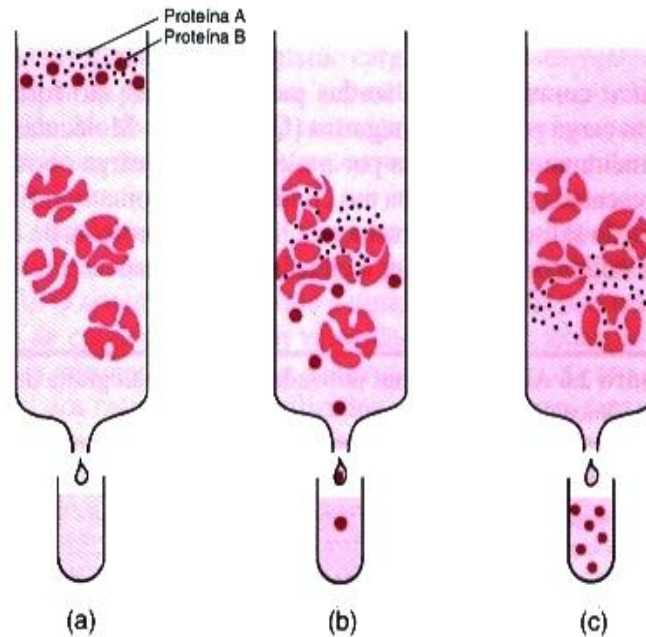


Fig. 2.17 Filtração em gel. Uma mistura formada por duas proteínas (A e B), com pesos moleculares diferentes, é aplicada sobre o gel formado por esferas porosas (a). As moléculas da proteína menor (proteína A) podem penetrar nos poros das esferas, percorrendo a coluna mais lentamente (b); a proteína maior (proteína B) é, então, recolhida primeiramente (c). Para maior clareza, estão representadas apenas quatro esferas de resina.

A filtração em gel também pode ser empregada para diminuir a concentração de sais de uma solução de proteína, por exemplo, quando ela é precipitada por adição de altas concentrações de sulfato de amônio. Para tanto, deve-se fazer a filtração em um gel que exclua a proteína, que será eluída primeiramente. Um outro processo rotineiramente utilizado para separar proteínas de substâncias de baixo peso molecular é a diálise. A *diálise* não é uma técnica cromatográfica, mas é um tipo de filtração molecular. A mistura de proteína e moléculas pequenas é colocada dentro de um saco de material semipermeável, como o celofane (acetato de celulose). Quando o saco de diálise é imerso em tampão, as moléculas proteicas ficam retidas, enquanto as moléculas pequenas ou íons atravessam a membrana de diálise (Fig. 2.18).

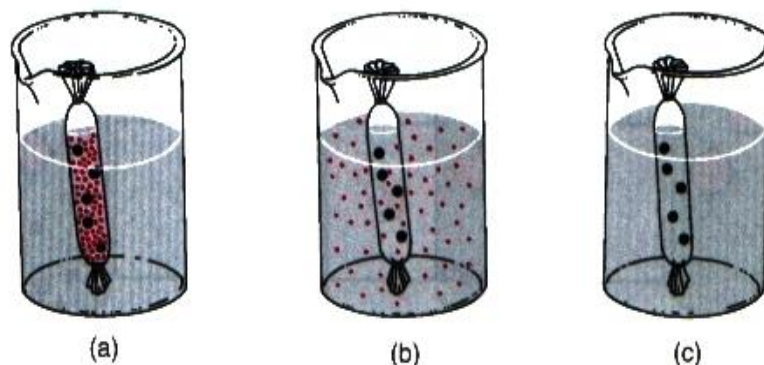


Fig. 2.18 Diálise. O saco de diálise contendo a mistura de proteína e moléculas pequenas é imerso em um volume grande de solução tampão (a). Como a membrana semipermeável permite a passagem apenas das moléculas pequenas, sua concentração dentro e fora do saco tende a se igualar (b). Após várias trocas de tampão, restam apenas as moléculas de proteína dentro do saco de diálise (c). (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J.: *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

Cromatografia de troca iônica

As resinas de troca iônica comumente utilizadas para proteínas são formadas por celulose ligada covalentemente a grupos com carga positiva ou negativa (Quadro 2.6). Moléculas com carga de mesmo sinal que a resina são eluídas primeiramente, seguidas por moléculas com carga oposta, em uma ordem definida pela magnitude da carga apresentada pela proteína nas condições da cromatografia. Geralmente, escolhem-se valores de pH e de concentração salina que determinem a ligação da proteína de interesse à resina escolhida; seguem-se alterações dessas condições que levem à eluição da proteína.

Quadro 2.6 Algumas resinas utilizadas para cromatografia de troca iônica de proteínas

Resina	Grupo ionizável
Fosfocelulose	$-\text{PO}_3^{2-}$
Carboximetilcelulose	$-\text{CH}_2-\text{COO}^-$
Dietilaminoetilcelulose	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$

Cromatografia de afinidade

Muitas proteínas ligam-se específica e não-covalentemente a determinadas moléculas: enzimas, hormônios e anticorpos ligam-se, respectivamente, a substratos, receptores ou antígenos. Tais proteínas podem ser purificadas por *cromatografia de afinidade*. O princípio do método consiste em ligar a molécula pela qual a proteína tem afinidade (ligante) a uma matriz insolúvel, sendo a mais utilizada a *agarose*, um polímero de açúcares encontrado em algas vermelhas. A mistura de proteínas é passada por uma coluna preparada com esse material: a proteína de interesse fica adsorvida à coluna, graças à interação com o ligante, e as outras proteínas passam livremente. A proteína adsorvida pode ser eluída da coluna por adição de solução concentrada do ligante (Fig. 2.19). Se a proteína for uma enzima, o ligante pode ser o substrato, o produto ou o inibidor competitivo. No caso de purificação de anticorpos, o ligante utilizado é o antígeno. O receptor de insulina, uma proteína da superfície celular, foi isolado por cromatografia de afinidade em agarose contendo insulina covalentemente ligada. A cromatografia de afinidade tem, obviamente, um poder de resolução muito maior do que os outros métodos cromatográficos (ver Quadro 5.6), embora seja restrita a uma classe especial de proteínas.

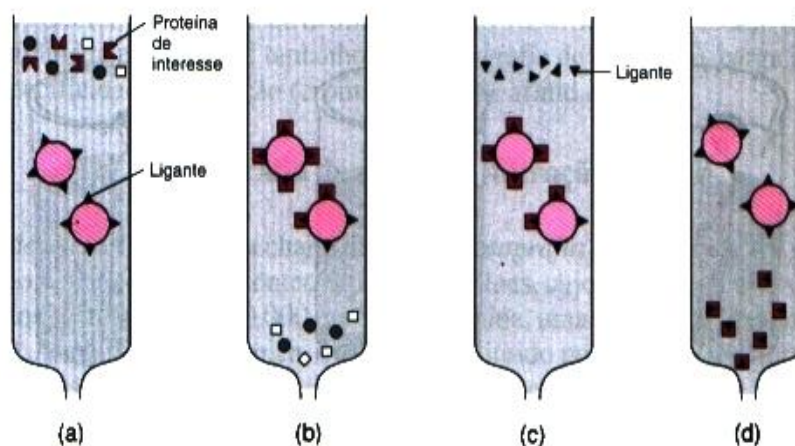


Fig. 2.19 Cromatografia de afinidade. Uma mistura de proteínas é passada através de uma coluna contendo uma matriz insolúvel, à qual foi ligada uma molécula (ligante), pela qual a proteína de interesse tem afinidade (a); somente esta proteína é retida pela coluna (b); a eluição é feita com uma solução concentrada de ligante (c), que, competindo com suas moléculas ligadas à matriz, libera a proteína (d). Para maior clareza, estão representadas apenas duas esferas de resina.

2.10.2 ELETROFORESE

Em um mesmo pH, proteínas diferentes apresentarão cargas líquidas diferentes, o que determinará velocidades de migração diferentes, se as proteínas forem submetidas a um campo elétrico. Este é o princípio da *eletroforese*. As diferentes técnicas de eletroforese empregam, invariavelmente, um suporte sólido — como papel ou gel — que evita a mistura das proteínas por convecção e permite utilizar pequenas quantidades de material.

Na *eletroforese em papel*, a amostra é aplicada sobre uma tira de papel ou de acetato de celulose, saturada com solução tampão. As extremidades da tira são imersas em reservatórios distintos contendo tampão, onde ficam os eletrodos (Fig. 2.20). O sistema é submetido a uma diferença de potencial apropriada e as proteínas migram em direção ao pólo de carga oposta, com velocidades proporcionais às suas cargas. Depois que o solvente migrar uma distância adequada, a posição das proteínas é revelada por coloração específica.

A *eletroforese em gel* é um dos métodos mais utilizados para analisar misturas de proteínas ou outras macromoléculas. Os géis utilizados como suporte — agarose e poliacrilamida — podem ser preparados com porosidade variável, propiciando separação das moléculas segundo o seu tamanho, além da sua carga. Proteínas menores migram mais depressa que as maiores, formando uma série de bandas definidas, que podem ser visualizadas por coloração específica (Fig. 2.21). Uma variante desta técnica, conhecida pela sigla *SDS-PAGE*, emprega um gel de poliacrilamida, em presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS liga-se a radicais hidrofóbicos das proteínas, causando sua desnaturação. Esta associação, com a maioria das proteínas, segue o mesmo padrão: uma molécula de SDS a cada dois resíduos de aminoácidos. Além disso, cada molécula de detergente ligada atribui uma carga negativa à proteína desnaturada, mascarando a carga intrínseca da molécula nativa. O resultado, qualquer que seja a proteína, é a formação de um complexo com forma alongada, com uma densidade de cargas negativas proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica. Este

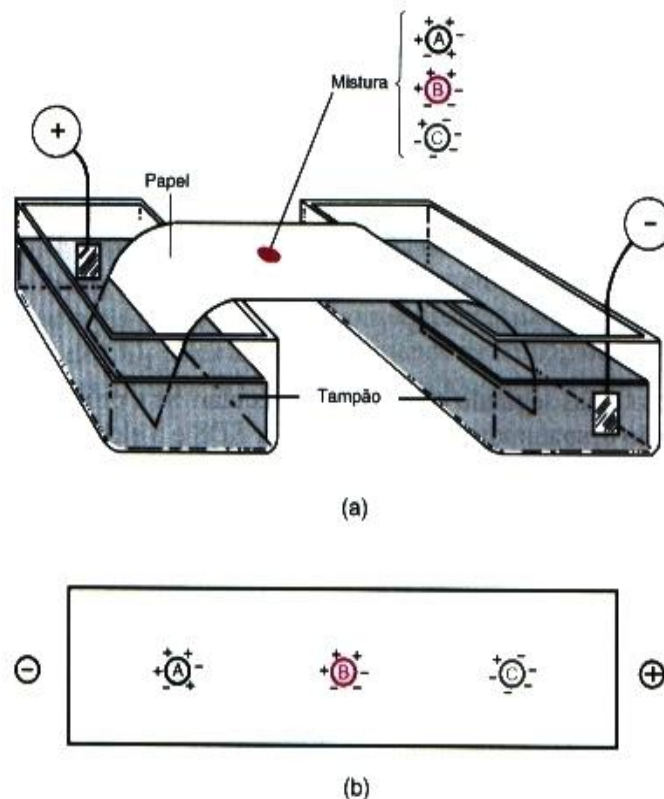
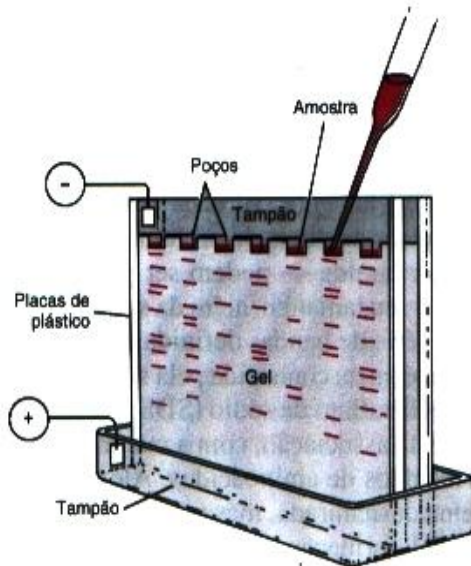
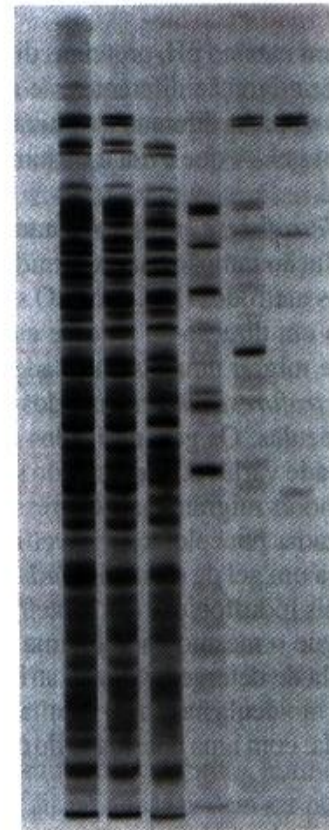


Fig. 2.20 Eletroforese em papel. Uma mistura de três proteínas hipotéticas — A, B e C — é aplicada sobre uma tira de papel ou acetato de celulose, umedecida com tampão. A tira é colocada em um aparato apropriado e um campo elétrico é aplicado ao sistema (a). As proteínas migram de acordo com a carga apresentada no pH do tampão utilizado. Depois de algum tempo, a eletroforese é interrompida e a posição das proteínas é revelada (b). (Figura a — Reproduzida de Voet, D. & Voet, J.: *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 1995.)



(a)



(b)

Fig. 2.21 Eletroforese em gel. As amostras são colocadas em pequenas depressões (poços) formadas na parte superior do gel, contido entre placas de plástico e imerso em tampão (a). As proteínas migram, formando bandas: quanto menor o peso molecular da proteína, maior a distância migrada. Em (b), a fotografia de um gel cujas bandas foram reveladas por coloração específica para proteínas. Neste gel, foram aplicadas amostras das etapas de purificação da RNA polimerase de *Escherichia coli*, desde o extrato celular bruto (primeira coluna à esquerda), até a enzima purificada (última coluna à direita), que contém quatro subunidades. (Figura a — Reproduzida de Voet, D. & Voet, J.: *Biochemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 1995. Figura b — Reproduzida de Lehninger, A.L.; Nelson, D.L. & Cox, M.M.: *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, Inc., 1993.)

método, portanto, separa proteínas segundo o seu peso molecular. Se a proteína apresentar estrutura quaternária, suas subunidades serão desnaturadas e dissociadas por SDS e a eletroforese determinará o peso molecular de cada uma delas. O emprego da eletroforese em gel, ao longo das diferentes etapas de um processo de purificação de proteínas, além de permitir a sua separação, fornece informações adicionais, tais como: o número de proteínas presentes na preparação, o seu peso molecular e de quantas subunidades são formadas.

3

HEMOGLOBINA — TRANSPORTE DE OXIGÊNIO E TAMPONAMENTO DO PLASMA

O metabolismo das células aeróbias depende do recebimento contínuo de oxigênio, usado na oxidação de nutrientes. Por outro lado, o CO_2 resultante desta oxidação deve ser removido constantemente. Nos organismos em que estas trocas não podem ser feitas diretamente com o meio por simples difusão, de modo eficiente, existem sistemas especializados incumbidos desta função. Este é o caso dos organismos pluricelulares complexos, como os vertebrados, onde este papel é exercido por elementos componentes do sangue. O transporte de oxigênio dos pulmões aos tecidos é efetuado pela hemoglobina presente nas hemácias. O CO_2 produzido pelos tecidos é convertido a ácido carbônico, que se ioniza em bicarbonato e H^+ . O bicarbonato é transportado pelo sangue até os pulmões, onde é eliminado como CO_2 ; os íons H^+ são removidos pela hemoglobina.

A hemoglobina, além de transportar oxigênio, exerce, portanto, um poderoso efeito tampão, impedindo que os íons H^+ possam alterar o pH do sangue, com conseqüências danosas para o organismo. Deste modo, embora haja grande produção de CO_2 pelos tecidos, a presença da hemoglobina restringe as variações de pH a apenas centésimos de unidades, mantendo o sangue e os tecidos em meio notavelmente constante.

3.1 ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA

As quatro cadeias da hemoglobina associam-se em dímeros

A hemoglobina dos seres humanos adultos (Hb A) é formada por quatro subunidades: duas α (141 resíduos cada uma) e duas β (146 resíduos). Os dois tipos de subunidades apresentam estrutura terciária semelhante, que também é muito parecida com a da mioglobina.¹

A estrutura quaternária da hemoglobina é mantida por ligações não-covalentes, que são muito mais numerosas entre subunidades diferentes — α/β — do que entre subunidades iguais — α/α e β/β (Fig. 3.1 a). O resultado desta

¹ As quatro cadeias polipeptídicas da hemoglobina contêm oito segmentos em α -hélice, convencionalmente designados por letras (A-H), como no caso da mioglobina, sendo que as subunidades α não possuem o segmento curto D. Os resíduos de aminoácidos são referidos como A1, A2 etc., segundo a hélice à qual pertencem e segundo a posição ocupada, na hélice, no sentido amino terminal → carboxila terminal. Os segmentos desenrolados são identificados pelas letras das hélices que eles separam; por exemplo, o segmento CD fica entre as hélices C e D. Existem, ainda, duas outras regiões sem estrutura regular: a região NA, que fica entre o grupo amino terminal e a hélice A, e a região HC, entre a hélice H e o grupo carboxila terminal. Alternativamente, pode-se adotar, para cada subunidade, a convenção genérica que numera os resíduos de 1 a n, a partir do amino terminal.

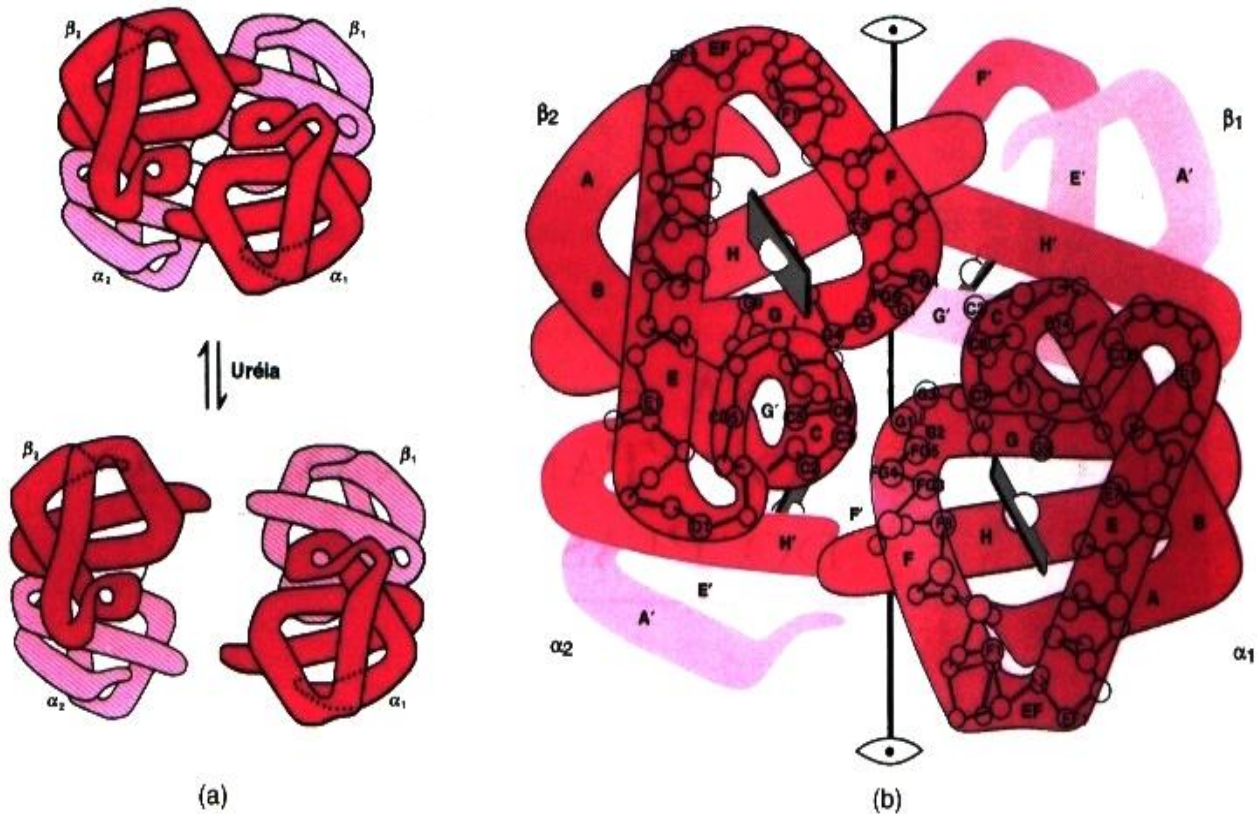


Fig. 3.1 Estrutura quaternária da hemoglobina. a) A associação entre subunidades diferentes é mais forte que entre subunidades iguais: quando a hemoglobina é suspensa em determinadas concentrações de uréia, os tetrâmeros dissociam-se em dímeros $\alpha\beta$; os grupos heme não estão mostrados. b) Esquema enfocando as áreas de contato entre os dímeros, com a interface $\alpha_1\beta_2$ à frente (esta interface está detalhada na Fig. 3.4). Cada grupo heme fica alojado em um bolsão hidrofóbico, delimitado pelas hélices E e F, principalmente. (Figura a — Reproduzida de *Biochemistry* por Mathews, © 1990 por Benjamin/Cummings Pub. Co. Com permissão de Estate of Irving Geis. Figura b — Reproduzida de Devlin, T.M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss Inc., 1992.)

associação desigual é uma molécula tetramérica, composta por dois dímeros, denominados $\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$, dispostos simetricamente ao redor de um eixo central. Os dois dímeros estabelecem contato através da interface entre a subunidade α de um dímero e a subunidade β adjacente do outro dímero: interface $\alpha_1\beta_2$ e sua equivalente simétrica, $\alpha_2\beta_1$. Em cada uma destas interfaces (Fig. 3.1 b e Fig. 3.4), a hélice C e o segmento FG da subunidade α interage com o segmento FG e a hélice C da subunidade de β . As interfaces entre os dímeros sofrem modificações importantes durante a oxigenação e a desoxigenação da hemoglobina, como será discutido adiante. As subunidades iguais — α/α e β/β — são separadas por uma cavidade central preenchida pelo solvente (Fig. 3.5).

3.2 MECANISMO DA LIGAÇÃO DO OXIGÊNIO À HEMOGLOBINA

O grupo prostético heme é o sítio de ligação do oxigênio

Cada cadeia da hemoglobina está associada a um grupo prostético chamado *heme*. O heme é uma molécula de porfirina contendo um átomo de ferro, que, na mioglobina e hemoglobina, permanece no estado ferroso, Fe^{2+} . As porfirinas são formadas por um anel plano, resultante da ligação de quatro núcleos pirrólicos, que podem apresentar diferentes radicais substituintes. No tipo de porfirina encontrado na hemoglobina (protoporfirina IX), estes substituintes são: dois radicais vinil, dois propionil e quatro metil, dispostos como mostrado na Fig. 3.2. O heme confere à hemoglobina e à mioglobina sua cor característica. Outras proteínas, como a catalase e os citocromos, também contêm heme.

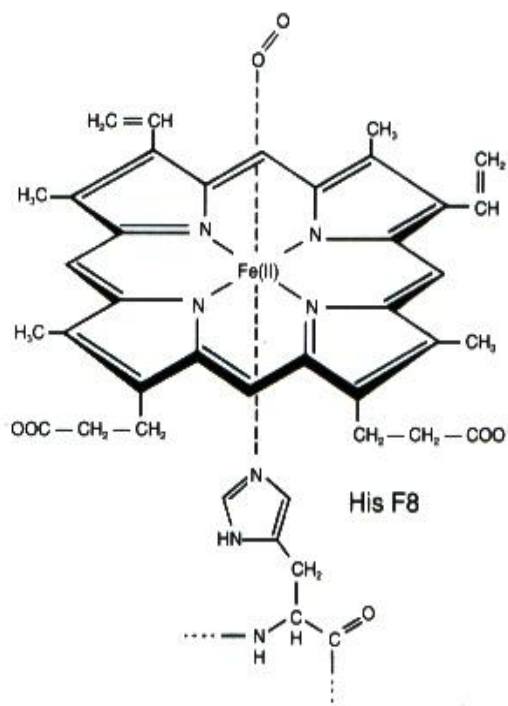


Fig. 3.2 Estrutura do grupo heme da hemoglobina oxigenada, mostrando as ligações estabelecidas pelo átomo de ferro com o oxigênio e o radical imidazólico da His proximal (His F8). (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

O grupo heme, em cada subunidade, localiza-se dentro de uma cavidade hidrofóbica, delimitada por aminoácidos apolares das hélices E e F, principalmente (Fig. 3.1 b), que estabelecem interações hidrofóbicas com o anel porfirínico. Este ambiente apolar torna possível a ligação reversível do oxigênio ao ferro (Fe^{2+}), sem que ele seja oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}).

O átomo de ferro fica no centro do grupo heme, formando seis ligações: liga-se aos quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico, à cadeia polipeptídica — através de um resíduo de histidina do segmento F, a His F8 (His 87), chamada de *histidina proximal* — e pode, ainda, ligar-se reversivelmente a uma molécula de oxigênio (O_2). Estas duas últimas ligações são perpendiculares ao plano do anel, situando-se, cada uma delas, em lados opostos do plano do heme (Fig. 3.2). O oxigênio, além de ligar-se ao ferro do grupo heme, estabelece uma ponte de hidrogênio com a His E7 (His 58), chamada *histidina distal*, que fica oposta à histidina proximal. A molécula de oxigênio fica, portanto, “prensada” entre o átomo de ferro e o anel imidazólico da histidina distal. A este sítio, aparentemente tão específico, podem ligar-se, ainda, outras moléculas pequenas, como CO, NO e H_2S , com afinidade ainda maior que o oxigênio, que é, portanto, excluído. Estes compostos ligam-se ao ferro do grupo heme de mioglobina, hemoglobina e citocromos, o que explica sua alta toxidez para organismos aeróbios.

Uma molécula de hemoglobina totalmente oxigenada contém, portanto, quatro moléculas de O_2 e é denominada *oxi-hemoglobina* (*oxi-Hb* ou HbO_2), em contraposição à forma desprovida de oxigênio, chamada *desoxi-hemoglobina* (*desoxi-Hb* ou *Hb*). A ligação do oxigênio ao grupo heme altera a cor da hemoglobina, que passa de azulada (sangue venoso) a vermelha (sangue arterial).

A ligação com oxigênio desencadeia alterações na conformação da hemoglobina

A hemoglobina oxigenada e a desoxigenada têm estruturas tão diferentes, que apresentam formas cristalinas distintas. A oxigenação não afeta a interação entre as subunidades que compõem os dímeros, provavelmente devido ao grande número de ligações que mantêm essa associação. As grandes mudanças ocorrem nas áreas de contato entre os dímeros, que, efetivamente, se deslocam, um em relação ao outro. Como será descrito a seguir, essas mudanças são desencadeadas pela ligação do oxigênio ao grupo heme.

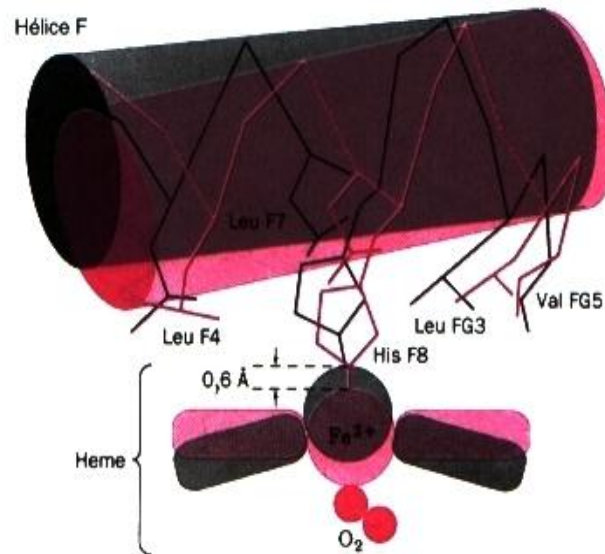


Fig. 3.3 Alterações na estrutura do grupo heme e na região adjacente da molécula de hemoglobina, devidas à ligação com oxigênio. Na desoxi-Hb (em cinza), o átomo de ferro fica 0,6 Å acima do anel porfirínico, com forma côncava; na oxi-Hb (em vermelho), o Fe desloca-se para o plano do heme, que se torna mais achatado, deslocando a His proximal (His F8) e a hélice F. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

A oxigenação da hemoglobina determina alterações estruturais seqüenciais. Na desoxi-Hb, cada átomo de ferro está situado fora do plano do grupo heme e o anel porfirínico é ligeiramente côncavo. Quando o oxigênio se liga ao heme de uma das subunidades, o ferro se desloca para o plano do grupo heme, que se torna mais achatado, arrastando a His F8 à qual está ligado e, conseqüentemente, a própria hélice F (Fig. 3.3). A movimentação da hélice F desloca o segmento contíguo FG, ocasionando o rompimento de várias ligações não-covalentes com a hélice C da subunidade adjacente (Fig. 3.4), ou seja, ligações das interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$, entre os dímeros; são ligações iônicas e pontes de hidrogênio, responsáveis pela estabilização da desoxi-Hb. Há uma movimentação dos dímeros, que resulta em estreitamento do bolsão entre as subunidades β . Deste modo, os deslocamentos em uma subunidade se propagam, produzindo uma alteração na conformação da subunidade em questão, que é transmitida para as outras subunidades, através das áreas de contato entre elas. Em resumo, o pequeno deslocamento do ferro (cerca de 0,6 Å), causado pela ligação do oxigênio ao grupo heme de uma subunidade, dispara uma seqüência de eventos mecanicamente transmitidos, que alteram a estrutura quaternária da hemoglobina (Fig. 3.5).

A hemoglobina liga-se ao oxigênio cooperativamente

A ligação do oxigênio, como foi descrito, implica em rearranjos moleculares seqüenciais, já que, uma subunidade não pode mudar sua conformação independentemente das outras. Estes movimentos coordenados determinam a dinâmica de oxigenação da hemoglobina: a ligação da primeira molécula de oxigênio facilita o preenchimento dos outros grupos heme. As novas conformações assumidas pela molécula de hemoglobina devido às sucessivas ligações com o oxigênio têm afinidades crescentes pelo oxigênio, de tal maneira que a ligação da quarta molécula de oxigênio é 300 vezes mais fácil do que a ligação da primeira. A esse fenômeno dá-se o nome de *cooperatividade*. A cooperatividade resulta da influência exercida por um sítio sobre outros localizados em subunidades diferentes de uma mesma molécula, e, portanto, só pode ser apresentada por proteínas oligoméricas, como a hemoglobina e as enzimas alostéricas. No caso da mioglobina, por exemplo, que apresenta uma única cadeia polipeptídica e um único grupo heme, a cooperatividade, evidentemente, não é observada.

A diferença no mecanismo de oxigenação de mioglobina e hemoglobina está traduzida nas curvas de oxigenação destas proteínas: enquanto a mioglobina apresenta uma curva hiperbólica, a hemoglobina exhibe uma curva sigmoidal. Estas curvas mostram a porcentagem de proteína oxigenada em função da pressão parcial de oxigênio, pO_2 (Fig. 3.6). A forma hiperbólica é aquela esperada para uma proteína com um único sítio de ligação e, portanto, a ligação de uma molécula de oxigênio a uma molécula de mioglobina não afeta a

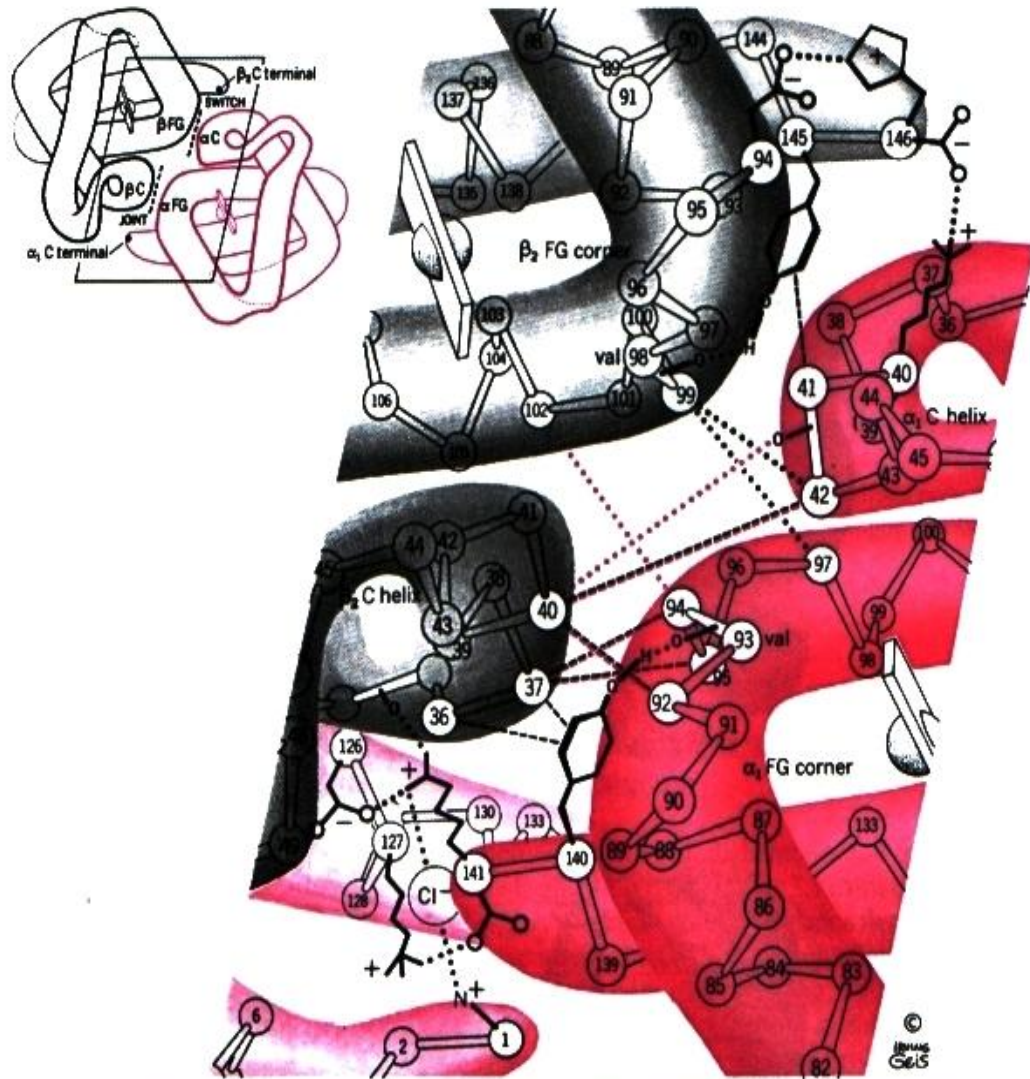


Fig. 3.4 Interface $\alpha_1\beta_2$ da molécula de hemoglobina. À esquerda, estão esquematizadas as subunidades α_1 e β_2 com um retângulo delimitando a interface $\alpha_1\beta_2$, que está detalhada à direita. As ligações não-covalentes que compõem a interface são representadas em preto na desoxi-Hb e em vermelho na oxi-Hb. Todas as ligações em preto são rompidas quando a hemoglobina é oxigenada. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

ligação de outras moléculas de oxigênio a outras moléculas de mioglobina. A curva sigmoidal indica que a ligação das moléculas de oxigênio aos quatro heme não é independente, e que o preenchimento de um heme aumenta a afinidade dos outros heme, não ocupados, por oxigênio.

A cooperatividade exibida pela hemoglobina proporciona uma resposta mais sensível a variações na concentração de oxigênio, adequando-se, com perfeição, à sua função de transportar este gás nos vertebrados. No sangue arterial que sai dos pulmões, a pO_2 é alta (100 mmHg, em média) e a hemoglobina fica 98% saturada com oxigênio; nos tecidos extrapulmonares, onde a pO_2 é baixa (sangue venoso), ela libera grande parte do oxigênio. Por exemplo, a pO_2 nos capilares que irrigam um músculo em atividade é cerca de 20 mmHg, e a hemoglobina permanece 33% saturada, liberando 65% do oxigênio associado. A mioglobina seria um transportador bem menos eficiente, já que menos de 10% do seu oxigênio seria liberado nessas condições. Todavia, sua alta afinidade por oxigênio, mesmo em baixa pO_2 , permite que ela desempenhe eficientemente a função de reservatório de oxigênio nos músculos de mamíferos, onde é encontrada em abundância. A mioglobina tem afinidade por oxigênio maior que a hemoglobina em qualquer pO_2 , o que permite que ele seja transferido do sangue para o músculo, onde fica associado à mioglobina e pode ser utilizado pelas mitocôndrias das células musculares.

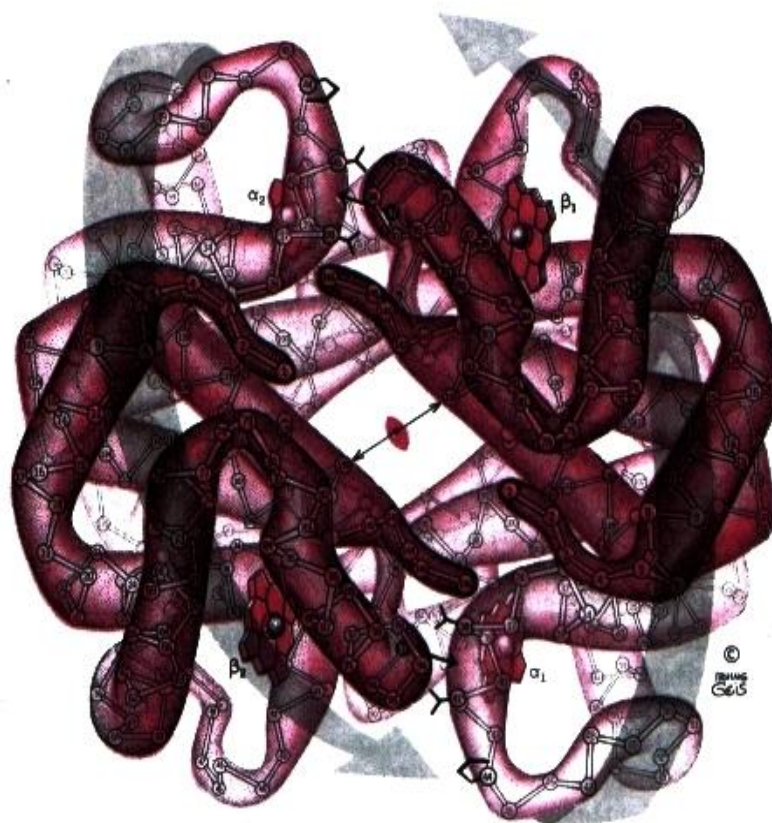
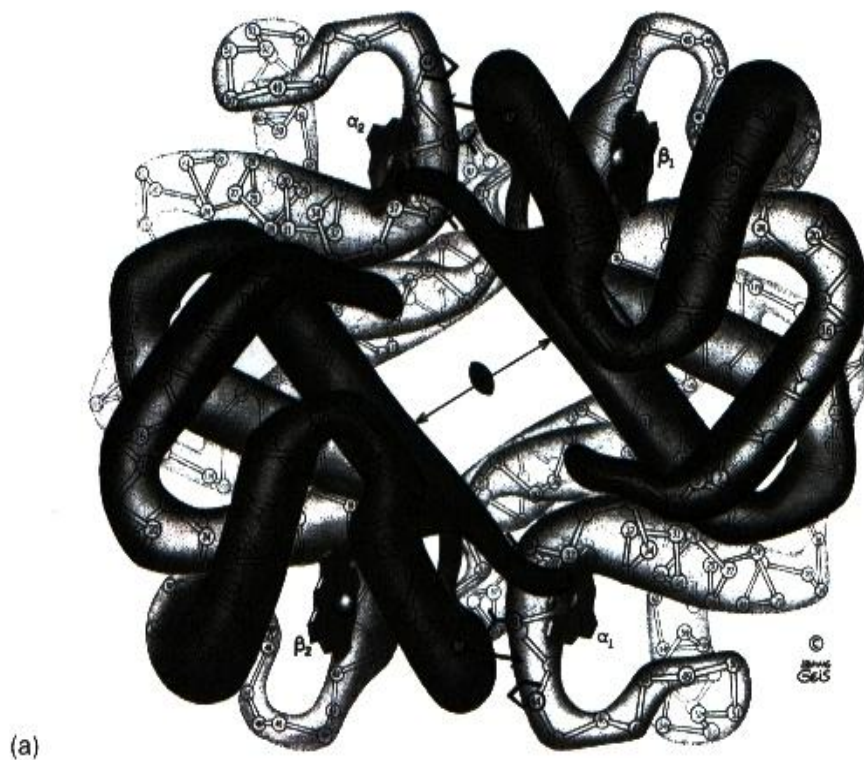


Fig. 3.5 Estrutura tridimensional da desoxi-Hb (a) e oxi-Hb (b), vistas perpendicularmente ao eixo de simetria (indicado no centro das estruturas), com as cadeias β em primeiro plano. Na transformação desoxi-Hb \rightarrow oxi-Hb, há a movimentação de um dímero em relação ao outro, simbolizada pelas setas sobre a molécula de desoxi-Hb e pela mudança da posição relativa de alguns aminoácidos; ocorre, ainda, um estreitamento da cavidade central entre as cadeias β , indicado pelas setas duplas. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

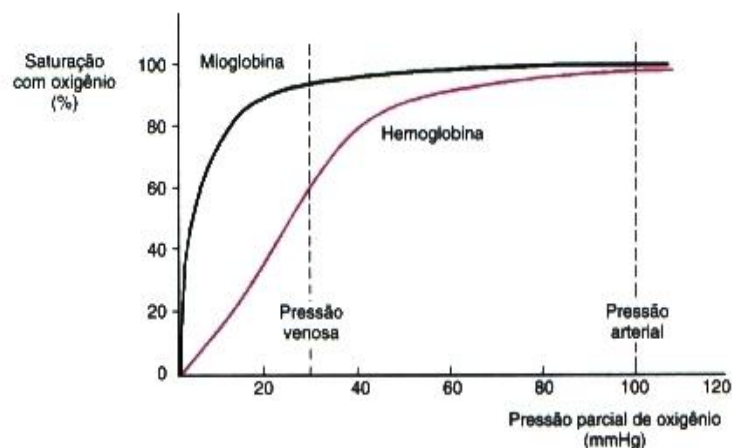


Fig. 3.6 Curva de saturação com oxigênio de mioglobina e hemoglobina; estão indicados os valores normais, ao nível do mar, da pO_2 venosa (pO_2 do sangue que retorna dos tecidos aos pulmões) e pO_2 arterial (pO_2 do sangue que sai dos pulmões).

3.3 FATORES QUE INTERFEREM NA LIGAÇÃO COM OXIGÊNIO

As hemácias contêm um composto que diminui a afinidade da hemoglobina por oxigênio

A hemoglobina de mamíferos, quando presente nas hemácias, tem afinidade menor por oxigênio que quando purificada; estas células contêm altos níveis de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) (Fig. 3.7), um composto sintetizado a partir de 1,3-bisfosfoglicerato, um intermediário da glicólise. A relação entre estes dados ficou esclarecida quando se adicionou BPG à hemoglobina purificada e observou-se uma redução da sua afinidade por oxigênio, traduzida por um deslocamento para a direita na sua curva de saturação com oxigênio (Fig. 3.8).

O BPG liga-se preferencialmente à desoxi-Hb, que apresenta a cavidade entre as subunidades β , suficientemente grande para alojá-lo. Esta cavidade é circundada por radicais carregados positivamente, que interagem com os grupos negativos do BPG (Fig. 3.9). Na oxi-Hb, a cavidade é menor (Fig. 3.5), o que dificulta a ligação do BPG. O resultado da ação do BPG é a predominância da forma desoxigenada da hemoglobina, o

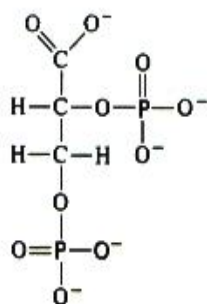


Fig. 3.7 Estrutura do 2,3-bisfosfoglicerato (BPG).

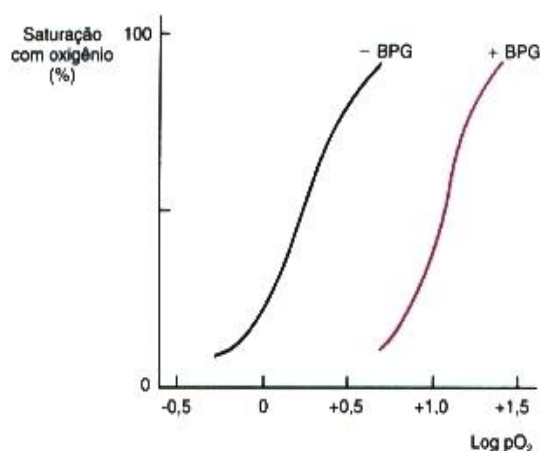


Fig. 3.8 Efeito do BPG sobre a saturação da hemoglobina com oxigênio. A saturação foi medida na ausência (curva à esquerda) e na presença de BPG (à direita).

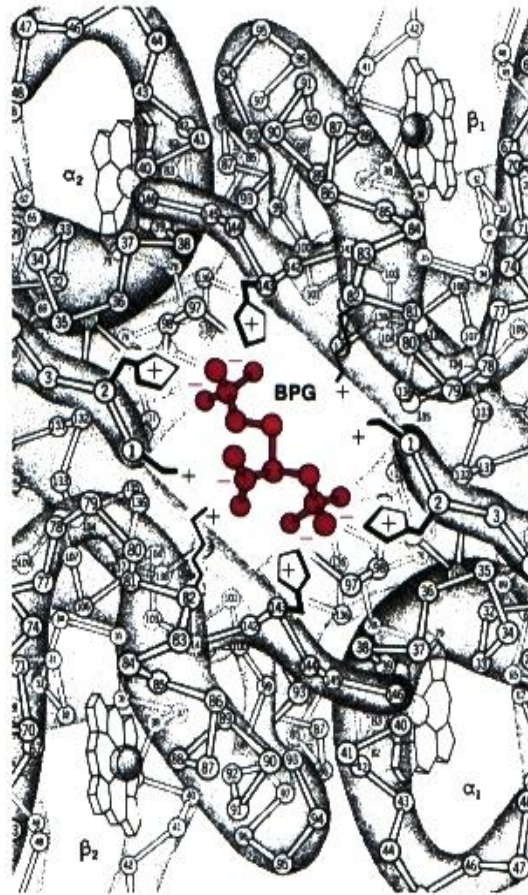
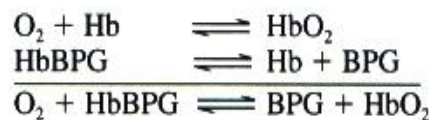


Fig. 3.9 Ligação do BPG à cavidade entre as cadeias β da desoxi-Hb. Os grupos com carga positiva (em preto) que interagem com os grupos negativos do BPG são: aminoterminal (Val 1), imidazólico (His 2 e His 143) e amino (Lys 82), pertencentes a aminoácidos das duas cadeias β , ou seja, oito grupamentos. A desoxi-Hb é observada sob o mesmo ângulo que na Fig. 3.5 a. (Reproduzida de Lehninger, A. L., *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Inc., 1982.)

que equivale a um decréscimo na sua afinidade por oxigênio. Em pressões elevadas de oxigênio, esta situação pode ser revertida, como mostrado nas equações seguintes:



Assim, nas condições de alta $p\text{O}_2$ dos pulmões, a hemoglobina fica saturada com oxigênio, mesmo na presença de BPG. O seu papel fisiológico é aumentar substancialmente a liberação de oxigênio nos tecidos extrapulmonares, onde a $p\text{O}_2$ é baixa.

O nível de BPG nas hemácias aumenta em condições associadas com hipóxia tissular (oxigenação deficiente dos tecidos) prolongada, como em anemias, insuficiência cardiorrespiratória e altas altitudes. Este mecanismo adaptativo tenta compensar a menor disponibilidade de oxigênio para os pulmões existente nessas situações, com um aumento na liberação do gás para os tecidos.

O papel do BPG nos mamíferos é desempenhado, em alguns organismos, por outros polifosfatos orgânicos: adenosina trifosfato (ATP) em peixes e anfíbios, e inositol hexafosfato em aves. Estes compostos têm diversas cargas negativas e, como o BPG, ligam-se à cavidade central da desoxi-hemoglobina.

A curva de saturação com oxigênio também é deslocada para a direita quando as medidas são feitas em temperaturas mais elevadas (Fig. 3.10). Este efeito da temperatura tem grande importância fisiológica porque permite maior disponibilidade de oxigênio quando a demanda de energia é alta, devido ao aumento do metabolismo celular, como acontece na febre e em grupos musculares sob contração intensa.

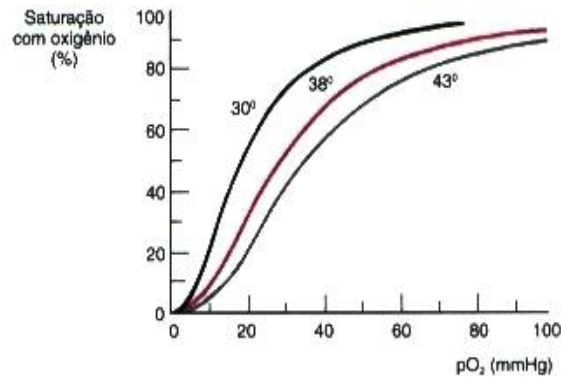


Fig. 3.10 Curvas de saturação com oxigênio de hemoglobina em diferentes temperaturas. (Reproduzida de Devlin, T. M., *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss Inc., 1992.)

A ligação do oxigênio à hemoglobina depende do pH: efeito Bohr

Para cada valor de pO_2 considerado, a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio varia com o pH, mesmo dentro dos estreitos limites fisiológicos de variação do pH: é tanto menor quanto menor o pH (Fig. 3.11). Os íons H^+ (como acontece com o BPG), ligam-se preferencialmente à desoxi-Hb, que passa, então, a constituir a forma predominante: o resultado é uma diminuição na afinidade da hemoglobina por oxigênio. A associação preferencial dos íons H^+ à desoxi-Hb evidencia que esta forma da proteína é uma base de Brønsted mais forte do que a forma oxigenada. Esta diferença de comportamento ácido-base é consequência da movimentação das subunidades da hemoglobina, devido à associação/dissociação de oxigênio (Fig. 3.5), que modifica a relação espacial entre determinados aminoácidos.

Uma alteração importante refere-se à posição relativa de dois resíduos de aminoácidos das subunidades β , localizados nas interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$, His146 e Asp94: quando a hemoglobina é desoxigenada, estes resíduos ficam mais próximos do que eram na oxi-Hb. Esta aproximação promove a formação de uma ligação iônica entre o radical carboxila (carga negativa) do Asp94 e o radical imidazólico (carga positiva) da His146, que é uma das ligações da desoxi-Hb (Fig. 3.4). A interação iônica estabiliza a forma protonada da His146, tornando mais “difícil” a

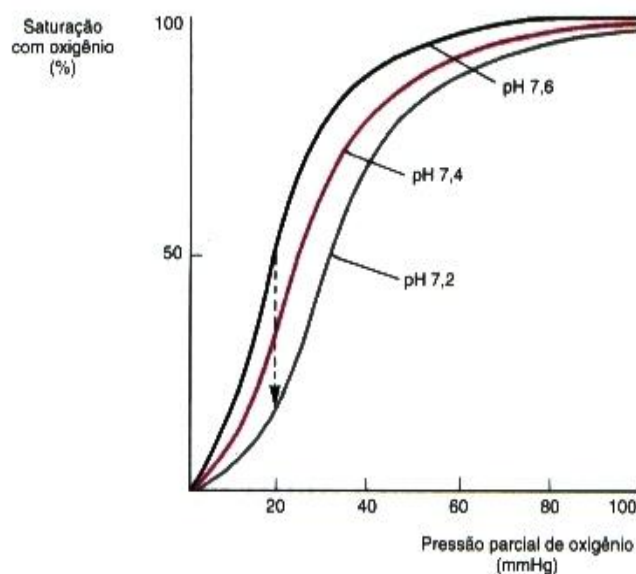
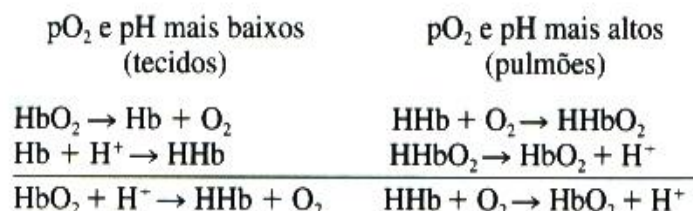


Fig. 3.11 Efeito do pH sobre a saturação da hemoglobina com oxigênio. O pH normal do sangue é $7,4 \pm 0,05$ nos pulmões e 7,2 (ou menor) nos tecidos extrapulmonares. A porcentagem de moléculas de hemoglobina oxigenada diminui com o aumento da concentração de H^+ (ver seta no gráfico).

dissociação de seu próton: o valor do pK_a do grupo imidazólico passa de 6,5 a 8,0 aproximadamente, ou seja, converte-se em uma base de Brønsted mais forte, ficando protonada no pH do sangue venoso (7,2). Quando a hemoglobina é oxigenada, há um distanciamento entre His146 e Asp94 e a interação eletrostática entre eles não mais se estabelece; o valor do pK_a da His146 cai para 6,5, ou seja, converte-se em um ácido de Brønsted mais forte e, no pH do sangue arterial (7,4), fica predominantemente desprotonado. Outros resíduos de aminoácidos comportam-se como a His146: sofrem alteração no valor de pK_a , devido a mudanças no seu microambiente, perdendo prótons quando a hemoglobina é oxigenada e ganhando prótons quando ela é desoxigenada. Estas alterações explicam o efeito do pH sobre a afinidade da hemoglobina por oxigênio.

Em resumo, a conversão de oxi-Hb em desoxi-Hb é acompanhada pela captação de prótons, que são liberados na sua oxigenação. A influência do pH sobre a oxigenação da hemoglobina tem grande importância fisiológica, porque, nos organismos, um decréscimo no pH está sempre associado a uma maior demanda de oxigênio, como será discutido adiante.

O conjunto dos fenômenos relacionados com o aumento do caráter ácido da hemoglobina quando ela se liga ao oxigênio e o aumento do caráter básico causado por sua desoxigenação constitui o *efeito Bohr*, que pode ser representado pelas equações:



A análise destas equações revela o papel fundamental desempenhado pela hemoglobina na manutenção do pH plasmático: à medida que a pO_2 diminui e a concentração de H^+ aumenta, a hemoglobina libera O_2 e capta H^+ . Quando a pO_2 aumenta e a concentração de H^+ diminui, ela se liga a O_2 e libera H^+ . Estas são as condições encontradas a nível dos tecidos e dos alvéolos pulmonares, respectivamente.

Nos tecidos, o CO_2 produzido pelo metabolismo celular difunde-se até as hemácias, onde é hidratado rapidamente em uma reação catalisada pela anidrase carbônica (AC). No pH do sangue (7,4-7,2), o H_2CO_3 dissocia-se em HCO_3^- e H^+ :



A ocorrência destas duas reações consecutivas explica por que um aumento na concentração de CO_2 causa uma diminuição do pH. Este aumento de acidez, associado à baixa pO_2 tecidual, faz com que a hemoglobina libere O_2 e capte H^+ , impedindo que ocorram grandes variações de pH. O HCO_3^- , produzido nas hemácias, difunde-se para o plasma (Fig. 3.12).

Nos pulmões a situação inverte-se. A alta pO_2 leva à oxigenação da hemoglobina e à liberação de H^+ . Esta liberação de prótons corrige o valor de pH que, de outro modo, tenderia a aumentar. De fato, com a baixa pCO_2 alveolar, o CO_2 é eliminado na atmosfera, consumindo H^+ e HCO_3^- :



Em resumo, a manutenção do pH fisiológico, imprescindível para o desempenho de qualquer das funções vitais, é obtida pela ação coordenada do sistema Hb/ HbO_2 e do sistema HCO_3^-/H_2CO_3 (ver também Capítulo 1).

3.4 HEMOGLOBINA FETAL

O feto humano, e de outros mamíferos, tem uma hemoglobina diferente da HbA, a principal hemoglobina dos adultos. Na *hemoglobina fetal* (HbF), as duas subunidades β são substituídas por outras cadeias polipeptídicas, chamadas γ . A estrutura da HbF é, portanto, $\alpha_2\gamma_2$, em contraposição à estrutura $\alpha_2\beta_2$ da HbA.

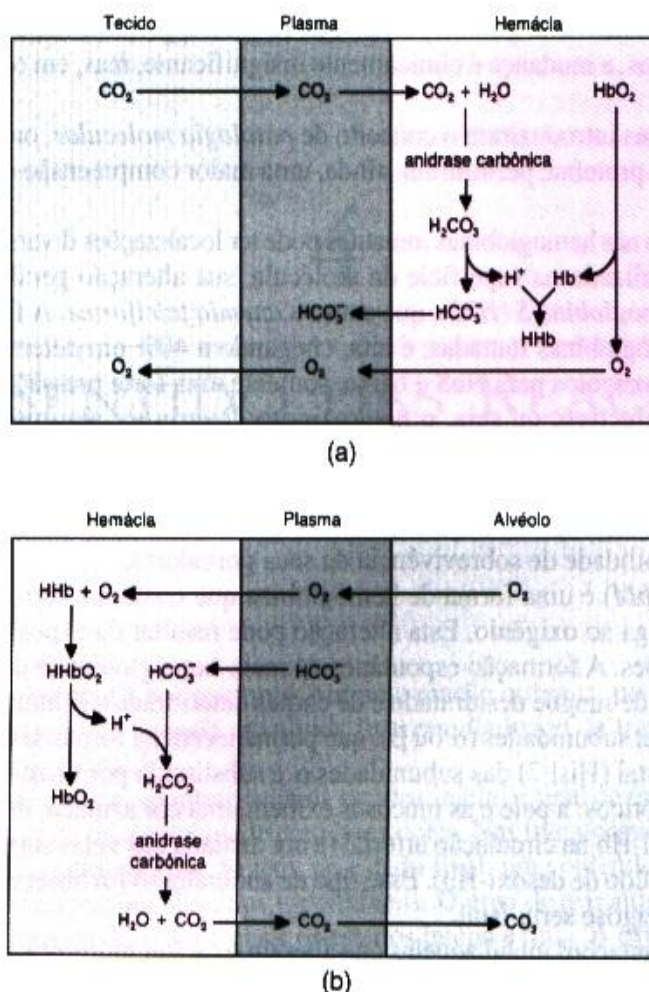


Fig. 3.12 Esquema dos processos que ocorrem nos tecidos (a) e pulmões (b) e possibilitam a manutenção do pH plasmático.

A HbF tem maior afinidade por oxigênio que a HbA: sua curva de saturação com oxigênio é deslocada para a esquerda em relação à curva de saturação da HbA (Fig. 3.6). Graças a esta propriedade, o feto pode obter oxigênio do sangue da mãe, através da placenta. Efetivamente, HbF é oxigenada à custa da HbA materna.

A diferença de afinidade por oxigênio entre HbF e HbA é devida à força de ligação de BPG aos dois tipos de hemoglobina. As cadeias β e γ têm o mesmo número de resíduos de aminoácidos (146), dispostos em uma sequência semelhante, exceto que, na posição 143, HbA tem uma histidina e HbF, uma serina, ou seja, um radical imidazólico com carga positiva foi substituído por um grupo polar sem carga. Conseqüentemente, na molécula de HbF existe um par a menos de grupos positivos na cavidade onde ocorre a ligação de BPG (Fig. 3.9), que, portanto, liga-se mais fracamente que na HbA. Como a concentração de BPG é igual nos sistemas circulatórios da mãe e do feto, e a HbF liga-se menos eficientemente ao BPG disponível, a forma desoxigenada desta hemoglobina fica menos estável e a sua afinidade por oxigênio aumenta: o oxigênio flui da oxi-Hb da mãe para a desoxi-Hb do feto.

3.5 HEMOGLOBINAS ANORMAIS

A hemoglobina dos seres humanos adultos (HbA) pode sofrer alterações químicas transitórias, resultantes de processos endógenos, como é o caso de sua glicosilação, ou da ação de drogas e poluentes ambientais. Em contrapartida, anomalias hereditárias determinam a síntese de hemoglobinas com estrutura anormal. Foram

descritas centenas das chamadas *hemoglobinopatias*, que resultam, geralmente, da substituição de um único aminoácido. Em alguns casos, a mudança é clinicamente insignificante, mas, em outros, pode causar doenças graves.

As hemoglobinas mutantes introduziram o conceito de *patologia molecular*, ou seja, uma doença causada pela alteração de uma única proteína; permitiram, ainda, uma maior compreensão da relação estrutura/função nas proteínas.

O aminoácido modificado nas hemoglobinas mutantes pode ter localizações diversas, trazendo conseqüências variáveis. Quando está localizado na superfície da molécula, sua alteração geralmente é inócua. A grande exceção a esta regra é a *hemoglobina S (HbS)*, que causa a *anemia falciforme*. A freqüência do gene de HbS, ao contrário de outras hemoglobinas mutadas, é alta, chegando a 40% em determinadas regiões da África. Como a sobrevivência dos homozigotos para HbS é baixa, somente uma forte pressão seletiva poderia explicar a alta incidência do gene defeutivo, ou seja, o heterozigoto deveria ter alguma vantagem em relação ao homozigoto normal. De fato, os portadores do gene mutado são resistentes a uma forma letal de *malária*. A incidência desta doença e a freqüência do gene para HbS na África são altamente correlacionadas. A anemia falciforme demonstra claramente que mutações deletérias podem constituir ferramentas da evolução, determinando uma maior probabilidade de sobrevivência de seus portadores.

A *meta-hemoglobina (HbM)* é uma forma de hemoglobina que contém o ferro do grupo heme no estado férrico (Fe^{3+}), que não se liga ao oxigênio. Esta alteração pode resultar da exposição a reagentes oxidantes, como nitritos, ou de mutações. A formação espontânea de meta-hemoglobina (e de metamioglobina) explica a cor marrom característica de sangue desidratado e de carnes deterioradas. A mutação que estabiliza a forma férrica pode ocorrer nas duas subunidades (α ou β), que permanecem na forma desoxigenada; na *Hb Boston*,² por exemplo, a histidina distal (HisF7) das subunidades α é substituída por tirosina. Pacientes portadores de HbM são, geralmente, cianóticos: a pele e as mucosas exibem uma cor azulada, devido à concentração anormalmente elevada de desoxi-Hb na circulação arterial (a cor azulada das veias superficiais é uma conseqüência normal do seu alto conteúdo de desoxi-Hb). Esse tipo de anomalia só foi observada na forma heterozigota, certamente porque a homozigose seria fatal.

Uma outra categoria de mutações inclui aquelas que alteram o caráter hidrofóbico da cavidade onde se aloja o grupo heme. Na *Hb Hammersmith*, a PheCD1 (cadeia lateral apolar) da cadeia β é trocada por serina (grupo R polar), impedindo a ligação do grupo heme.

Algumas mutações em sítios distantes do heme determinam a síntese de hemoglobinas instáveis, com estrutura terciária distorcida. Um exemplo é a *Hb Bibba* que tem prolina — aminoácido que interrompe α -hélice — na posição da LeuH19 da cadeia α .

Hemoglobinas contendo alterações nas interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ exibem cooperatividade menor quando se ligam ao oxigênio, o que demonstra, mais uma vez, a participação dessas interfaces na transmissão das alterações estruturais desencadeadas pela oxigenação/desoxigenação da Hb. Estas hemoglobinas têm, também, afinidade anormal por oxigênio. Ela é maior quando a mutação ocasiona rompimento de ligações que estabilizam a forma desoxigenada que, assim, mais facilmente se converte em oxi-hemoglobina. Este é o caso da *Hb Kempsey* e da *Hb Yakima*, que, na posição ocupada por Asp99 na cadeia β , contêm asparagina e histidina, respectivamente. O aminoácido substituído participa de uma ponte de hidrogênio da desoxi-Hb (Fig. 3.4). Ao contrário, mutações que diminuem a estabilidade da forma oxigenada reduzem a afinidade por oxigênio. Na *Hb Kansas*, a Asn102 da cadeia β , que faz uma ponte de hidrogênio da oxi-Hb (Fig. 3.4), é trocada por treonina prevalecendo a forma desoxigenada. Indivíduos com *Hb Kansas* apresentam cianose.

Um outro grupo de lesões genéticas é caracterizado pela síntese não-estequiométrica das subunidades da hemoglobina: são as *talassemias*, que têm alta incidência na região do mar Mediterrâneo (*thalassa*, em grego, significa mar). Nas α -*talassemias*, geralmente causadas por deleção gênica, não há produção das cadeias α , enquanto nas β -*talassemias*, resultantes de mutações pontuais, faltam as cadeias β . Os homozigotos apresentam anemia intensa e essa condição é denominada talassemia maior; os heterozigotos são assintomáticos (talassemia menor) e, como acontece na anemia falciforme, apresentam uma certa proteção contra a malária.

² As hemoglobinas mutantes recebem, geralmente, o nome da cidade onde foram descobertas.

4

O SENTIDO DAS REAÇÕES

Uma transformação, representada, por exemplo, por uma reação química, pode ser analisada sob dois aspectos fundamentais: a variação de energia envolvida (a *termodinâmica* da transformação) e a velocidade com que ocorre (a *cinética* da reação).

Em relação ao aspecto energético, só interessam os estados inicial e final da transformação, não importando o processo pelo qual ela se dá ou a velocidade com que ocorre. Nas transformações em que há liberação de energia, o sistema que sofreu a transformação tem, no estado final, um conteúdo energético menor do que o do estado inicial; estas transformações são ditas *espontâneas*. O grau de espontaneidade das transformações é avaliado pelo valor da diferença de energia entre os estados inicial e final. A expressão “espontânea”, quando aplicada a reações químicas, precisa ser bem compreendida. O fato de uma reação ser espontânea **não** significa que ela ocorrerá imediatamente, tão logo se ponham em contato os reagentes; significa, tão-somente, que, se ocorrer, haverá liberação de energia. Em outras palavras, a espontaneidade da reação está completamente desvinculada de parâmetros cinéticos, como a velocidade. A transformação de diamante em grafite, por exemplo, é espontânea (porque, quando ocorre, libera energia) e, no entanto, os diamantes são bastante estáveis. A quantidade de energia liberada por uma reação não guarda, portanto, relação alguma com o tempo consumido no processo. A reação de oxidação de glicose por oxigênio é espontânea, por liberar energia quando ocorre. Entretanto, é possível manter glicose em contato com oxigênio sem que ocorra reação em tempo mensurável. Neste caso, a reação é espontânea, mas sua velocidade é praticamente igual a zero.

Sobre os parâmetros termodinâmicos dos processos, não há interferência biológica possível: como só interessam os estados inicial e final, a quantidade de energia liberada na oxidação da glicose é a mesma, quer se processe *in vitro*, ou através das complexas reações celulares. A espontaneidade de uma reação depende exclusivamente do tipo de compostos que a constituem, de sua concentração e da temperatura. Sobre a velocidade com que o fenômeno ocorre, todavia, os organismos têm recursos para interferir, acelerando-o através de *catalisadores* (*enzimas*).

Neste capítulo, serão abordados alguns conceitos termodinâmicos, de forma operacional, de modo a permitir a compreensão de certas características das reações que se processam nos seres vivos. O próximo capítulo — Enzimas — tratará do aspecto cinético das reações biológicas.

4.1 VARIAÇÃO DE ENERGIA LIVRE: CRITÉRIOS DE ESPONTANEIDADE

ΔG° só indica o sentido da reação em condições-padrão

Qualquer reação química é acompanhada de uma variação de energia livre, referente à diferença entre o conteúdo energético dos produtos e reagentes. A *variação de energia livre* — a quantidade de energia capaz

de realizar trabalho a temperatura e pressão constantes — é representada por ΔG . Quando medido a 25°C e sob pressão de uma atmosfera, seu valor depende das espécies químicas que tomam parte na reação e de suas concentrações iniciais. Ainda mais, o sinal atribuído a ΔG reflete o sentido em que a reação ocorre. No caso de uma reação simples, do tipo



o valor de ΔG pode ser obtido medindo-se a quantidade de energia liberada desde o estado inicial até o final, que corresponde ao equilíbrio da reação. Se, para chegar ao equilíbrio, a reação aconteceu no sentido $A \rightarrow B$ (no sentido em que está escrita), o sinal de ΔG é negativo; se aconteceu no sentido $B \rightarrow A$ (no sentido oposto ao que está escrita), o sinal de ΔG é positivo.

Para ilustrar como varia o ΔG em função das concentrações iniciais dos componentes de uma reação, suponha que a reação indicada tenha constante de equilíbrio igual a 2 ($K_{eq} = 2$); no equilíbrio, a relação $[B]/[A]$ deve, portanto, ser igual a 2. Algumas situações iniciais hipotéticas, numeradas de I a V, encontram-se no Quadro 4.1. Em todas essas situações, o equilíbrio será atingido quando a concentração de B for igual a 8 (unidades de concentração, por exemplo, moles por litro) e a de A for igual a 4. Na situação I, onde a reação é iniciada com 8 de A e 4 de B, a reação deve processar-se no sentido $A \rightarrow B$, até que seja atingida a concentração 8 de B, restando 4 de A. A partir desse ponto, não há mais transformação, a reação atingiu o equilíbrio: o valor de ΔG pode, então, ser aferido e terá sinal negativo, já que a reação ocorreu no sentido em que está escrita. Na situação II, quando a reação é iniciada com 6 de A e 6 de B, o equilíbrio final será o mesmo, mas a “quantidade” de transformação terá sido menor, apenas 2 de A terão sido convertidos em 2 de B; o valor de ΔG será menor e também negativo. A situação III — concentrações iniciais de A e B iguais a 4 e 8 respectivamente — é especial: nesse caso, não há transformação, porque as concentrações iniciais já correspondem às do equilíbrio; o valor de ΔG será zero. Se, por outro lado, a concentração inicial de A for 2 e a concentração de B for 10 (situação IV), o equilíbrio será alcançado com 2 de B transformando-se em 2 de A, isto é, a transformação ocorrerá no sentido oposto às anteriores: o valor absoluto de ΔG será o mesmo da situação II, mas terá sinal positivo. Um resultado análogo será verificado na situação V.

Quadro 4.1 Sinal de ΔG para algumas situações (I a V) de concentrações iniciais hipotéticas de A e B, na reação $A \rightarrow B$, com $K_{eq} = 2$

Situação	Concentrações iniciais		“Reação” ocorrida	Sinal do ΔG
	[A]	[B]		
I	8	4	$4A \rightarrow 4B$	Negativo
II	6	6	$2A \rightarrow 2B$	Negativo
III	4	8	—	Zero
IV	2	10	$2B \rightarrow 2A$	Positivo
V	0	12	$4B \rightarrow 4A$	Positivo

Resumindo, para uma mesma reação ($A \rightleftharpoons B$), existirão vários valores de ΔG dependendo das concentrações iniciais de A e B e a reação poderá ocorrer no sentido $A \rightarrow B$ ou $B \rightarrow A$, também dependendo das concentrações iniciais de A e B. Por convenção, o valor de ΔG tem sinal negativo quando a transformação chegou ao equilíbrio com a reação processando-se no sentido em que foi escrita ($A \rightarrow B$) e tem sinal positivo, quando o equilíbrio foi atingido com a reação processando-se no sentido contrário a este ($B \rightarrow A$).

Também para uma reação mais complexa, do tipo



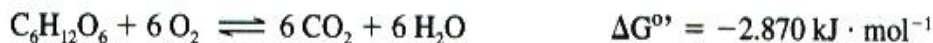
as mesmas considerações são válidas, havendo vários valores de ΔG , dependendo das concentrações iniciais de A, B, C e D.

A variação de energia livre (ΔG), por apresentar tantos valores diferentes, não é útil para comparar reações. Para tornar possível e cômoda esta comparação, define-se a *variação de energia livre padrão*, representada por ΔG° . A variação de energia livre padrão é um dos valores de variação de energia livre, obtida em

condições padronizadas: concentrações iniciais de reagentes e produtos (A, B, C e D, no último exemplo) iguais a 1 M, temperatura de 25°C, pressão de 1 atmosfera e pH = 0. O valor de ΔG^0 é, portanto, a variação de energia livre entre o instante inicial, dentro das condições padronizadas, e o momento em que a reação entre em equilíbrio. Para os interesses da Bioquímica, introduz-se ainda uma pequena alteração: as medidas são efetuadas a pH = 7 em lugar de pH = 0; neste caso, para indicar esta diferença, as notações são $\Delta G'$ para concentrações quaisquer das espécies envolvidas, e $\Delta G^{0'}$, para concentrações 1 M.

Como ocorre para quaisquer concentrações (p. 50), partindo-se das condições-padrão, uma reação química pode levar o sistema até o equilíbrio, processando-se no sentido em que foi escrita ou no sentido contrário; analogamente ao $\Delta G'$, o sinal convencionado para $\Delta G^{0'}$ é negativo no primeiro caso e positivo, no segundo.

Considerando-se uma reação hipotética $A + B \rightleftharpoons C + D$, quando, no equilíbrio, a concentração de C e a concentração de D são *maiores* que 1 M e, portanto, a reação ocorreu no sentido em que foi escrita, o $\Delta G^{0'}$ é negativo. Esse é o caso, por exemplo, da oxidação da glicose por oxigênio:



Para uma outra reação, pode ocorrer o inverso, isto é, as concentrações de C e D no equilíbrio são *menores* do que 1 M, o equilíbrio foi, portanto, obtido com a reação se processando no sentido contrário ao que foi escrito e o sinal de $\Delta G^{0'}$ é positivo. É o caso da reação de hidrólise de ATP:



Naturalmente, esta reação pode ser escrita no sentido oposto. Como se trata da *mesma* reação, partindo da *mesma* concentração inicial de todos os componentes (1 M), o equilíbrio atingido será o mesmo, com aumento das concentrações de ADP e P_i . Neste caso, entretanto, o sinal de $\Delta G^{0'}$ deverá ser negativo, porque a reação processou-se no sentido em que foi escrita.



O sinal de $\Delta G^{0'}$ indica, portanto, o sentido em que a reação tende a ocorrer em condições-padrão.

O valor de $\Delta G^{0'}$ está relacionado com a constante de equilíbrio da reação

O valor de $\Delta G'$ de uma reação depende das concentrações iniciais de reagentes e produtos, e do valor de $\Delta G^{0'}$, segundo a fórmula

$$\Delta G' = \Delta G^{0'} + 2,3 RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

onde R é a constante dos gases ($8,31 \text{ J} \cdot \text{k}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) e T é a temperatura absoluta em Kelvin.

Quando uma reação atinge o equilíbrio, não há mais variação de energia e, portanto,

$$\Delta G' = 0$$

donde

$$\Delta G^{0'} = -2,3 RT \log \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Na situação de equilíbrio, a fração da equação corresponde ao valor da constante de equilíbrio (K_{eq}):

$$K_{eq} = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Portanto,

$$\Delta G^{0'} = -2,3 RT \log K_{eq}$$

A variação de energia livre padrão está, pois, relacionada com a constante de equilíbrio da reação. Os valores de energia livre padrão e da constante de equilíbrio de diferentes reações (Quadro 4.2) permitem verificar que, quanto maior a constante de equilíbrio de uma reação, maior a quantidade de energia liberada em condições-padrão, para atingir o equilíbrio. E este equilíbrio pode ser atingido com a reação “caminhando” em dois sentidos diferentes:

- No equilíbrio, a concentração de produtos é **maior** que a dos reagentes ($K_{eq} > 1$). Neste caso, o logaritmo de K_{eq} é positivo e o sinal de $\Delta G^{0'}$ é negativo, ou seja, a reação processou-se no sentido em que foi escrita.
- No equilíbrio, a concentração de produtos é **menor** que a dos reagentes ($K_{eq} < 1$). Neste caso, o logaritmo de K_{eq} é negativo e o sinal de $\Delta G^{0'}$ é positivo, ou seja, a reação processou-se no sentido oposto ao escrito.

As reações podem ocorrer no sentido oposto ao previsto pelo sinal de $\Delta G^{0'}$

Ficou estabelecido até aqui que, quando se trata de concentrações de reagentes e produtos fixadas em 1 M, o sentido da reação é previsto pelo sinal de $\Delta G^{0'}$. Vamos demonstrar que, neste caso, o valor de $\Delta G^{0'}$ coincide com o valor de $\Delta G'$. Tomemos, como exemplo, a reação



com K_{eq} igual a 10^{-2} e, portanto, com $\Delta G^{0'}$ igual a $+11,4 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Quadro 4.2). Como visto, o valor de $\Delta G'$ é dado por

$$\Delta G' = \Delta G^{0'} + 2,3 RT \log \frac{[B]}{[A]}$$

Na condição considerada, as concentrações de A e B são iguais a 1 M e, portanto, $[B]/[A] = 1$ e $2,3 RT \log [B]/[A] = 0$.

Teremos, então,

$$\Delta G' = \Delta G^{0'}$$

e a reação considerada ocorre no sentido previsto por $\Delta G^{0'}$ e $\Delta G'$, ou seja, de B para A ($B \rightarrow A$).

Quadro 4.2 Relação entre os valores da constante de equilíbrio e a variação de energia livre padrão a pH 7

K_{eq}	$\Delta G^{0'}$ ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
10^{-4}	22,8
10^{-3}	17,2
10^{-2}	11,4
10^{-1}	5,7
1	0
10^1	-5,7
10^2	-11,4
10^3	-17,2
10^4	-22,8

Analisemos agora, para a mesma reação, a situação em que a concentração inicial de reagente é significativamente maior do que a de produto, por exemplo $[A] = 1 \text{ M}$ e $[B] = 10^{-3} \text{ M}$. A relação $[B]/[A]$ será 10^{-3} e o sinal de $\Delta G'$ será negativo:

$$\begin{aligned}\Delta G' &= \Delta G^{0'} + 2,3 RT \log 10^{-3} \\ \Delta G' &= \Delta G^{0'} + 2,3 (8,31 \times 10^{-3} \times 298) \times (-3) \\ \Delta G' &= \Delta G^{0'} - 17,08 \\ \Delta G' &= 11,4 - 17,08 \\ \Delta G' &= -5,68 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\end{aligned}$$

Neste caso, a reação ocorrerá no sentido previsto por $\Delta G'$, ou seja, de A para B ($A \rightarrow B$), contrário ao sentido previsto por $\Delta G^{0'}$.

Generalizando, o sentido das reações é estabelecido pelo sinal de $\Delta G'$; no caso das condições-padrão, seu valor coincide com o de $\Delta G^{0'}$. Quando as concentrações iniciais dos reagentes e produtos são diferentes de 1 M, a reação poderá ocorrer em um sentido ou no oposto, dependendo dos valores dessas concentrações e, portanto, de $\Delta G'$. As reações com $\Delta G^{0'}$ positivo poderão ocorrer no sentido da formação do produto, desde que a relação das concentrações iniciais de produtos e reagentes seja menor do que a constante de equilíbrio.

A grande utilidade do conceito e dos valores de $\Delta G^{0'}$ para a Bioquímica é estabelecer um padrão que permite comparações entre diferentes reações. Como o $\Delta G'$ de cada reação varia com as concentrações iniciais de reagentes e produtos, tais comparações somente podem ser feitas através dos valores de $\Delta G^{0'}$ das diferentes reações.

Algumas reações não podem ser revertidas nas condições celulares

Como já foi discutido, é possível, teoricamente, inverter o sentido da reação previsto pelo valor de $\Delta G^{0'}$. Biologicamente, no entanto, nem sempre isto é viável. Examinemos o caso do ATP (adenosina trifosfato), um composto fundamental das reações metabólicas (Fig. 4.1). A reação de hidrólise do ATP produz ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4), representado por P_i , e tem $\Delta G^{0'}$ negativo:

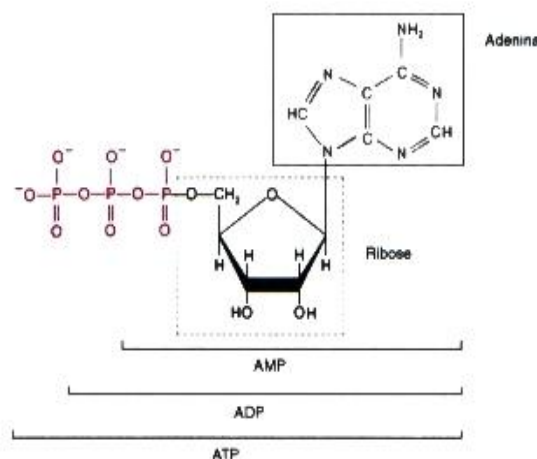


Fig. 4.1 Estrutura da adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP). Estes compostos, designados *nucleotídeos*, são constituídos por uma base nitrogenada (adenina), um açúcar (ribose) e, pelo menos, um grupo fosfato. O fosfato está ligado à ribose por ligação éster ($\Delta G^{0'}$ de hidrólise = $-15 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$), e a ligação entre os grupos fosfato é tipo anidrido ($\Delta G^{0'}$ de hidrólise = $-31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). O grupo fosfato terminal pode ser transferido enzimaticamente para moléculas aceptoras; em outros casos, o ATP pode ser clivado em AMP e pirofosfato inorgânico $\text{HP}_2\text{O}_7^{3-}$ (PP_i).

A constante de equilíbrio da reação é, pois, muito grande e, conseqüentemente, para que a reação pudesse ocorrer no sentido da síntese de ATP, seria necessário que as concentrações iniciais de ADP e P_i fossem exageradamente altas. Tais valores de concentração nunca são encontrados nas células e, portanto, a reação, simplesmente como foi escrita, jamais é utilizada para a síntese de ATP *in vivo*.

Na verdade, reações de hidrólise de compostos ricos em energia, como o ATP, raramente são encontradas nas células, apesar de terem $\Delta G^{0'}$ tão favoráveis. Vale lembrar, neste ponto, que o fato de o valor de $\Delta G^{0'}$ ser negativo e alto significa tão-somente que, se a reação ocorrer, haverá grande liberação de energia. A reação de hidrólise ocorre lentamente na ausência de um catalisador. Dito de outra forma, a reação de hidrólise de ATP é muito favorável termodinamicamente, mas desfavorável cineticamente. É também pertinente considerar que a presença de uma enzima que catalisasse indiscriminadamente esta hidrólise tornaria qualquer célula inviável, uma vez que este composto fundamental seria prontamente hidrolisado sempre que produzido. As enzimas capazes de promover a hidrólise de ATP, as *ATPases*, têm sua atividade sob rigoroso controle celular e atuam sempre associando este processo a transporte de compostos através de membranas ou a outras transformações que requerem energia.

Os valores de $\Delta G^{0'}$, além de possibilitarem comparar reações, são muito úteis para avaliar os conteúdos energéticos de diferentes compostos. Para tanto, analisa-se a reação de hidrólise de uma única e específica ligação (muitas vezes, a ligação da qual faz parte o grupo fosfato) presente no composto (Quadro 4.3). Quando o $\Delta G^{0'}$ da reação de hidrólise é negativo e tem valor absoluto maior do que $25 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, o composto é classificado como *composto rico em energia* (Quadro 4.4).

Como foi assinalado, os compostos ricos em energia não sofrem hidrólise nas células, mas apresentam uma alta capacidade de transferência do grupo fosfato para moléculas aceptoras, esta sim, uma reação freqüente no metabolismo:

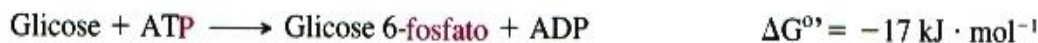


Nesta reação, assim como nas demais reações deste texto, o símbolo P representa o grupo PO_3^{2-} .

Através da sua capacidade de transferência do grupo fosfato, o ATP cumpre um papel fundamental no metabolismo, o de permitir a síntese de compostos fosforilados que não podem ser produzidos diretamente por reação com fosfato. O metabolismo de glicose em todas as células inicia-se com a transformação deste açúcar em glicose 6-fosfato. Entretanto, a reação



tem $\Delta G^{0'} = +14 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. É, portanto, termodinamicamente inviável. O recurso biológico para a obtenção de glicose 6-fosfato é a utilização de *outra* reação, da qual participa o ATP, e que tem $\Delta G^{0'}$ negativo:



Neste sentido, costuma-se dizer, com pouco rigor, que o ATP “doa” energia para tornar possíveis reações termodinamicamente inviáveis. Como foi visto neste exemplo, o ATP não “doa” energia — este composto apenas participa de uma reação viável.

Na célula, reações com $\Delta G^{0'}$ positivo são acopladas a reações com $\Delta G^{0'}$ negativo

Ao longo das seqüências que compõem o metabolismo celular, encontram-se reações cujo valor de $\Delta G^{0'}$ é positivo. Apesar disto, as reações procedem no sentido da formação do produto, porque estão acopladas a uma reação subsequente que tem $\Delta G^{0'}$ negativo. O acoplamento consiste no fato de pelo menos um dos produtos da primeira reação ser usado como reagente da segunda reação. Por exemplo:



Quadro 4.3 Classificação de ligações através dos produtos de sua hidrólise e valores aproximados de $\Delta G^{0'}$ das reações. Reações de hidrólise de ATP, ADP e AMP

Tipo de ligação	Reação de hidrólise	$\Delta G^{0'}$ (kJ · mol ⁻¹)
Fosfoenol	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{C}-\text{O}-\text{P} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{CH}_3 \\ \text{cetona} \end{array} + \text{P}_i \quad \text{ácido}$	-60
Anidrido fosfórico	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{C}-\text{O}-\text{P} \\ \\ \text{O} \end{array} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{O} \\ \text{ácido} \end{array} + \text{P}_i \quad \text{ácido}$	-35
Éster fosfórico	$\text{R}-\text{O}-\text{P} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{OH} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">álcool ácido</p>	-15
Tioéster	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{S CoA} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} + \text{HS-CoA}$ <p style="text-align: center;">ácido tioálcool</p>	-30
Anidrido fosfórico	$\text{Adenosina}-\text{P}-\text{P}-\text{P} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Adenosina trifosfato ATP ácido ácido</p>	-31
Anidrido fosfórico	$\text{Adenosina}-\text{P}-\text{P} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{AMP} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Adenosina difosfato ADP ácido ácido</p>	-31
Éster fosfórico	$\text{Adenosina}-\text{P} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{A}-\text{OH} + \text{P}_i$ <p style="text-align: center;">Adenosina monofosfato AMP (Adenosina) álcool ácido</p>	-15

A classificação de uma dada ligação é obtida por análise dos tipos de compostos produzidos pela hidrólise daquela ligação. Por exemplo, se os compostos resultantes forem ácido fosfórico e álcool, a ligação é classificada como éster fosfórico; se os compostos resultantes da hidrólise forem dois ácidos, a ligação é classificada como anidrido fosfórico. Note-se que a classificação refere-se à ligação e não ao composto como um todo.

P_i = fosfato inorgânico = HPO_4^{2-} (pH = 7,4); P = PO_3^{2-}

Quadro 4.4 Variação de energia livre padrão a pH 7 da hidrólise de compostos fosforilados, alguns dos quais podem ser classificados como *ricos em energia*

Composto	$\Delta G^{0'}$ (kJ · mol ⁻¹)
Fosfoenolpiruvato	-62
1,3-Bisfosfoglicerato	-49
Fosfocreatina	-43
ATP (a ADP + P _i)	-31
Glicose 1-fosfato	-21
Frutose 6-fosfato	-14

O consumo contínuo de C pela segunda reação, que tem $\Delta G^{0'}$ negativo, estabelece, para a primeira reação, uma razão $[B][C] / [A]$ sempre menor do que a do equilíbrio, tornando negativo o sinal de $\Delta G'$ da primeira reação e “obrigando” a reação a processar-se no sentido $A \rightarrow B + C$, apesar do valor positivo de $\Delta G^{0'}$ para esta reação. O processo global



apresenta, então, $\Delta G^{0'}$ negativo.

4.2 REAÇÕES DE ÓXIDO-REDUÇÃO

A variação de energia livre de reações de óxido-redução é aferida pela variação do potencial de óxido-redução

Muitas das reações do metabolismo processam-se com redução e oxidação dos compostos participantes. A oxidação de um composto consiste na perda de elétrons de sua forma reduzida, que se converte na forma oxidada:



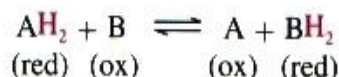
As formas oxidada e reduzida do composto (A_{ox}/A_{red}) constituem um sistema chamado *par redox*. A redução é a conversão da forma oxidada na forma reduzida de um composto, por ganho de elétrons:



Redução e oxidação são processos acoplados, ou seja, um composto oxida-se reduzindo um outro, e, por isso, este tipo de reação é chamado de *reação de óxido-redução*.



Nas reações de óxido-redução biológicas, os elétrons transferidos são geralmente acompanhados de prótons, ou seja, há transferência de átomos de hidrogênio:



A tendência de um par redox (A_{ox}/A_{red}) em perder ou ganhar elétrons é expressa pelo seu *potencial de oxidação-redução*, representado por E . Analogamente ao valor de ΔG , este potencial depende não só das espécies envolvidas, mas, para cada espécie, das concentrações da forma oxidada e da forma reduzida. Define-se também o *potencial de oxidação-redução padrão*, E^0 , para concentração 1 M da forma oxidada e 1 M da forma reduzida. Assim, haverá valores diferentes para o E de um par redox, mas um só valor para o seu E^0 .

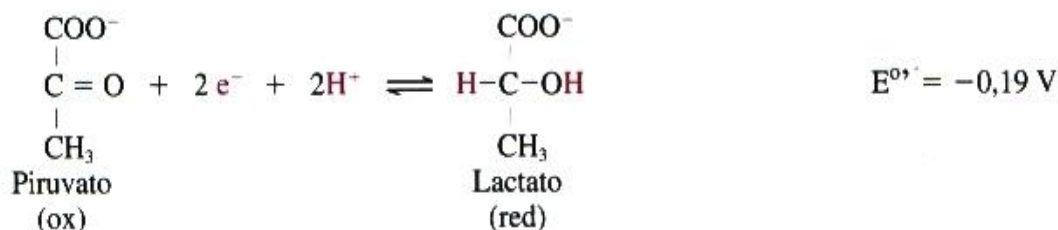
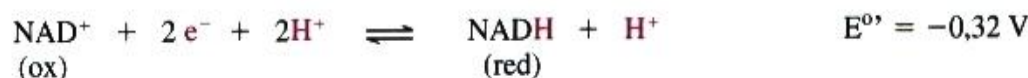
As medidas de E^0 são obtidas por comparação com um par redox assumido como padrão ($2 H^+/H_2$), componente do eletrodo-padrão. O *eletrodo-padrão* consiste em uma solução 1 M de H^+ em equilíbrio com gás hidrogênio ($2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons H_2$) com uma atmosfera de pressão e tem, por convenção, E^0 igual a zero volt. Para medir o E^0 de um par redox (A_{ox}/A_{red}), utiliza-se uma solução de concentração 1 M da forma oxidada (A_{ox}) e 1 M da forma reduzida (A_{red}), e $pH = 0$. Quando este sistema é conectado ao eletrodo-padrão, é gerada entre eles uma força eletromotriz, medida em volts, cujo valor absoluto é o E^0 do composto. A este valor é atribuído, *por convenção*, o sinal + ou o sinal -, se o par redox receber elétrons do eletrodo-padrão ou doar elétrons para o eletrodo-padrão. Como no caso do ΔG , as medidas de E^0 e de E em $pH = 7$ recebem a notação E^0' e E' .

Quando as concentrações das formas oxidada e reduzida forem diferentes de 1 M, o potencial de oxidação-redução do sistema (E') será função dessas concentrações e do potencial de oxidação-redução padrão (E^0'):

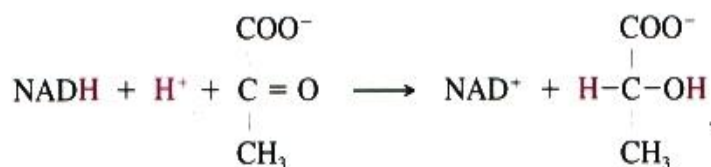
$$E' = E^0' + \frac{2,3RT}{n\mathcal{F}} \log \frac{[\text{forma oxidada}]}{[\text{forma reduzida}]}$$

onde aparecem as concentrações das formas oxidada e reduzida. Esta é a *equação de Nernst*.

O valor de E^0' é uma medida da afinidade de um par redox por elétrons, ou seja, quanto maior o potencial, maior esta afinidade. Portanto, quando dois pares com E^0' diferentes são acoplados, o par de E^0' menor reduzirá o par de E^0' maior. Considerem-se dois pares redox:



Misturando-se as quatro espécies, cada uma com concentração igual a 1 M, o par com E^0' menor (NAD^+/NADH) doa elétrons para o par com E^0' maior (piruvato/lactato). A reação que se processa é:



na qual, o par NAD^+/NADH é o redutor e o par piruvato/lactato é o oxidante. A variação de potencial de oxidação-redução padrão ($\Delta E^0'$) ocorrida é:

$$\begin{aligned} \Delta E^0' &= E^0' \text{ do oxidante} - E^0' \text{ do redutor} \\ \Delta E^0' &= -0,19 - (-0,32) \\ \Delta E^0' &= +0,13 \text{ V} \end{aligned}$$

De fato, essa transformação é espontânea. Nas reações de óxido-redução, a variação de energia livre padrão pode ser determinada através da variação do potencial de óxido-redução padrão ($\Delta E^{0'}$):

$$\Delta G^{0'} = -n\mathcal{F} \Delta E^{0'}$$

onde n é o número de elétrons transferidos e \mathcal{F} é a constante de Faraday ($96,5 \text{ kJ} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$).

A transferência de elétrons é sempre acompanhada de queda de energia livre ($\Delta E^{0'}$ positivo e $\Delta G^{0'}$ negativo). A variação de energia livre padrão da reação considerada é, portanto:

$$\begin{aligned} \Delta G^{0'} &= -n\mathcal{F} \Delta E^{0'} \\ \Delta G^{0'} &= -2 \times 96,5 \times 0,13 \\ \Delta G^{0'} &= -25,09 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \end{aligned}$$

Na verdade, foi o valor positivo de $\Delta E^{0'}$ o determinante do valor negativo de $\Delta G^{0'}$ e, portanto, da viabilidade da transformação.

Na reação tomada como exemplo, à medida que a transferência de elétrons se processa, diminui a concentração de NADH (o elemento do par redox NAD^+/NADH efetivamente capaz de doar elétrons) e aumenta a concentração de NAD^+ , pois cada molécula de NADH que doa elétrons transforma-se em NAD^+ . Portanto, a relação NAD^+/NADH deixa de ser 1 M/1 M, assumindo valores gradativamente maiores e o valor de E' vai aumentando. Por outro lado, os elétrons cedidos pelo par NAD^+/NADH são recebidos pelo piruvato, o elemento do par piruvato/lactato capaz de receber elétrons. À medida que a passagem de elétrons é feita, diminui a concentração de piruvato e aumenta a concentração de lactato e, portanto, a relação de concentração piruvato/lactato também deixa de ser 1 M/1 M, gradativamente assume valores menores e o E' vai diminuindo.

Em consequência dessas variações, os potenciais de óxido-redução (E') dos dois pares vão ficando cada vez mais próximos, ou seja, o valor de $\Delta E'$ torna-se cada vez menor, diminuindo, paralelamente, o valor de $\Delta G'$. Quando o E' dos dois pares se igualarem, $\Delta E'$ torna-se igual a zero, $\Delta G'$ também reduz-se a zero, não há mais deslocamento de elétrons e a reação "para", isto é, a reação atingiu o equilíbrio.

5

ENZIMAS

A manutenção da vida celular depende da contínua ocorrência de um conjunto de reações químicas, que devem atender duas exigências fundamentais: precisam ser altamente *específicas*, de modo a gerar produtos definidos, e devem ocorrer a *velocidades adequadas* à fisiologia celular — a insuficiência na produção ou na remoção de metabólitos pode levar a condições patológicas.

Quando se examina a composição química de uma célula simples como a de *Escherichia coli* (Quadro 5.1), uma bactéria freqüente no trato intestinal humano, pode parecer improvável obter a exatidão das reações necessárias para a manutenção e reprodução desta bactéria frente à grande variedade de compostos ali presentes. Em células de eucariotos, o número de compostos químicos é ainda maior e, mesmo considerando a compartimentalização em diferentes estruturas celulares, cada organela contém uma formidável diversidade de compostos, potencialmente capazes de reagir uns com os outros. Por outro lado, nas temperaturas relativamente baixas em que vivem as células, as velocidades destas reações são desprezíveis, e as moléculas presentes, praticamente inertes. Uma reação química pode ser termodinamicamente viável ou espontânea (conteúdo energético dos produtos menor do que o dos reagentes — Capítulo 4), mas ter velocidade igual a zero ou muito próxima de zero. Por exemplo, cristais ou soluções de glicose podem ser mantidos em contato com oxigênio, sem que ocorra oxidação do açúcar, apesar da oxidação de glicose ser uma reação que libera grande quantidade de energia. A velocidade com que esta transformação ocorre, em tempo mensurável, é igual a zero.

A presença de *enzimas* dirigindo todas as reações celulares permite a solução simultânea das duas dificuldades apresentadas. Para se ter uma idéia do papel indispensável das enzimas, basta lembrar que mesmo re-

Quadro 5.1 Composição química aproximada de uma célula de *E. coli*

Substâncias	% do peso celular	Número de tipos diferentes
Água	70	1
Íons inorgânicos (Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻)	1	20
Proteínas	15	2.500
Aminoácidos e seus precursores	0,5	100
Carboidratos e seus precursores	3	200
Lipídios e seus precursores	2	50
DNA	1	1
RNA	6	1.000
Nucleotídeos e seus precursores	0,5	200
Outras moléculas	0,2	200

ações que têm água como reagente (e a concentração da água é 55,5 M) são catalisadas por enzimas. Como *catalisadores*, as enzimas aumentam de várias ordens de grandeza a velocidade das reações que catalisam e por serem altamente específicas, “selecionam”, entre todas as reações potencialmente possíveis, aquelas que efetivamente irão ocorrer. A oxidação de glicose por oxigênio através de uma seqüência de reações catalisadas por enzimas pode ser feita nas células em minutos.

Até recentemente, admitia-se que todos os catalisadores biológicos fossem proteicos. Há pouco mais de uma década, entretanto, foram caracterizadas certas reações celulares que têm como catalisadores moléculas especiais de RNA. A descoberta foi surpreendente e este tipo especial de catalisador recebeu o nome de *ribozima*. Comporta-se de forma semelhante às proteínas enzimáticas, obedecendo também à cinética de Michaelis-Menten (Seção 5.6). Seu emprego nas reações metabólicas, entretanto, está restrito a alguns casos especiais, conquanto importantes, e as considerações que serão feitas daqui para diante referem-se exclusivamente às enzimas “proteicas”.

5.1 ATUAÇÃO DAS ENZIMAS NA CINÉTICA DAS REAÇÕES

As enzimas aceleram a velocidade da reação por diminuir sua energia de ativação

Tomando o exemplo simples da conversão irreversível de uma substância A em B ($A \rightarrow B$), a *velocidade da reação* (v) será:

$$v = \frac{d[B]}{dt} \quad \text{ou} \quad v = - \frac{d[A]}{dt}$$

A unidade de v é moles por litro por segundo, se $[B]$ e $[A]$ representarem as concentrações molares de B e de A.

A última equação mostra que a velocidade da reação diminui à medida que a reação prossegue e a concentração de A diminui. A velocidade é, portanto, proporcional à concentração de A:

$$v = k[A]$$

A constante k é chamada *constante de velocidade* da reação, com unidade de seg^{-1} . Esta é uma reação de *primeira ordem*, já que sua velocidade depende da concentração do reagente com expoente 1.

A maior parte das reações químicas processadas nos organismos são mais complexas, por envolverem, pelo menos, três moléculas diferentes e por serem, geralmente, reversíveis. São reações de *segunda ordem*, representadas, por exemplo, por



para as quais, pode-se demonstrar, as velocidades de reação serão, respectivamente,

$$v = k[A]^2 \quad \text{e} \quad v = k[A][B]$$

Nestes casos, a velocidade da reação é explicada pela *teoria das colisões*. Esta teoria estabelece que, para reagir, as moléculas presentes em uma solução devem colidir com orientação apropriada e que a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir um estado reativo, chamado *estado de transição*. Para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado de transição, necessita-se de uma quantidade de energia definida como *energia de ativação*. Esta energia é, portanto, a barreira que separa os reagentes dos produtos. A velocidade de uma reação será diretamente proporcional ao número de moléculas com energia igual ou maior do que a energia do estado de transição.

Em uma população de moléculas, nem todas têm o mesmo conteúdo energético. Algumas têm conteúdo muito pequeno, outras, muito grande, e a maioria apresenta um conteúdo médio, característico da temperatura na qual a população se encontra. Quando se eleva a temperatura de um sistema, as moléculas, no seu conjunto, adquirem um conteúdo energético maior, mas é respeitado o mesmo padrão de distribuição de energia entre elas (Fig. 5.1).

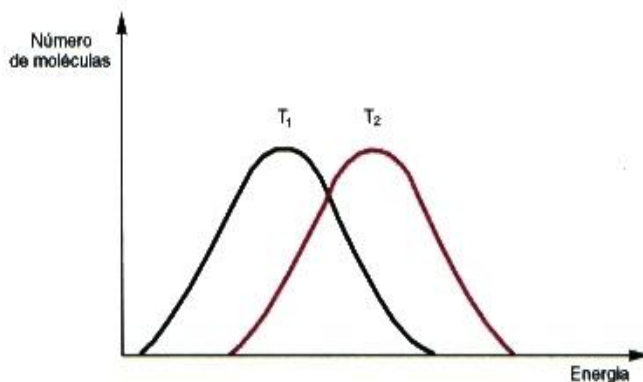
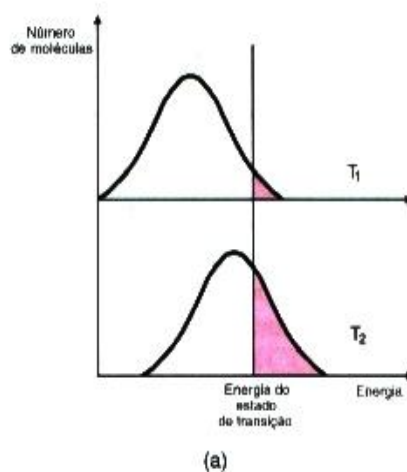


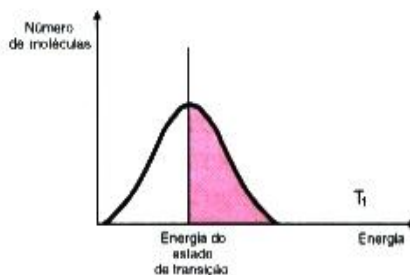
Fig. 5.1 Representação do conteúdo energético das moléculas de uma população em duas temperaturas, sendo $T_2 > T_1$.

A decorrência direta do exposto acima é que a velocidade das reações pode ser aumentada pelo menos de três maneiras diferentes:

1. aumentando o número de moléculas em solução, ou seja, sua concentração, como previsto pela equação da velocidade;
2. aumentando a população de moléculas com energia necessária para reagir, o que pode ser obtido pelo *aumento da temperatura* — com a elevação da temperatura um número maior de moléculas atinge a energia de ativação, e a velocidade da reação aumenta (Fig. 5.2 a);
3. diminuindo a barreira imposta pela energia de ativação — com a *diminuição da energia de ativação*, mesmo mantida a temperatura inicial, um número maior de moléculas estará em condições de reagir (Fig. 5.2 b).



(a)



(b)

Fig. 5.2 a) Distribuição de energia entre as moléculas de uma população em duas temperaturas ($T_2 > T_1$). b) Alteração da distribuição de energia na presença de um catalisador. A área colorida representa a fração da população com energia igual ou maior do que a energia do estado de transição.

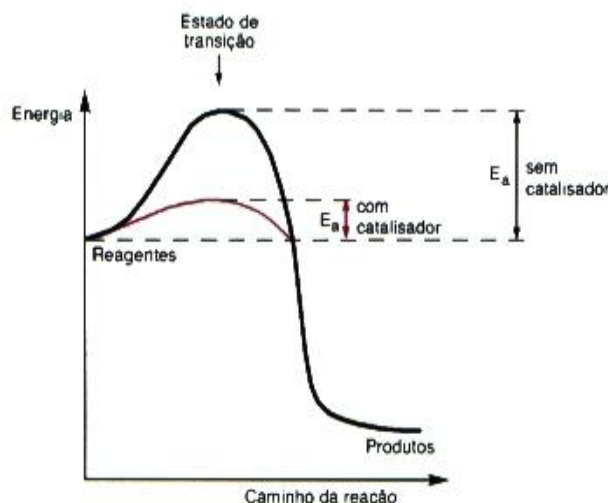


Fig. 5.3 Na presença do catalisador, a reação ocorre através de um novo caminho com energia de ativação (E_a) menor.

A redução no valor da energia de ativação pode ser obtida pela presença de catalisadores, e é o processo empregado pelos seres vivos para acelerar suas reações químicas.

Os *catalisadores* são substâncias que aceleram a velocidade de uma reação, sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem efetivamente consumidos durante o processo. Como sua concentração permanece constante, podem atuar em quantidades mínimas, ditas *catalíticas*, várias ordens de grandeza menores do que as concentrações dos reagentes. O catalisador participa efetivamente da reação, sofrendo alterações de sua estrutura química durante o processo; invariavelmente, porém, retorna à sua forma original no final da reação.

Todas as células dispõem de proteínas capazes de exercer função catalítica: são as *enzimas*, que, na verdade, catalisam praticamente todas as reações químicas que se processam nos seres vivos.

A eficiência da catálise enzimática deriva da ligação do reagente (substrato) à enzima

Os catalisadores criam um novo “caminho” para a reação, com um novo estado de transição, que requer uma energia de ativação menor (Fig. 5.3). Um exemplo simples deste novo caminho é mostrado na Fig. 5.4, através da hidrólise de um éster catalisada por íons H^+ . A reação consiste no ataque do oxigênio (que tem carga residual negativa), pertencente à molécula de água, ao carbono presente no éster (que tem carga residual positiva, em virtude de sua dupla ligação com o oxigênio). A energia de ativação requerida para atingir o estado de transição

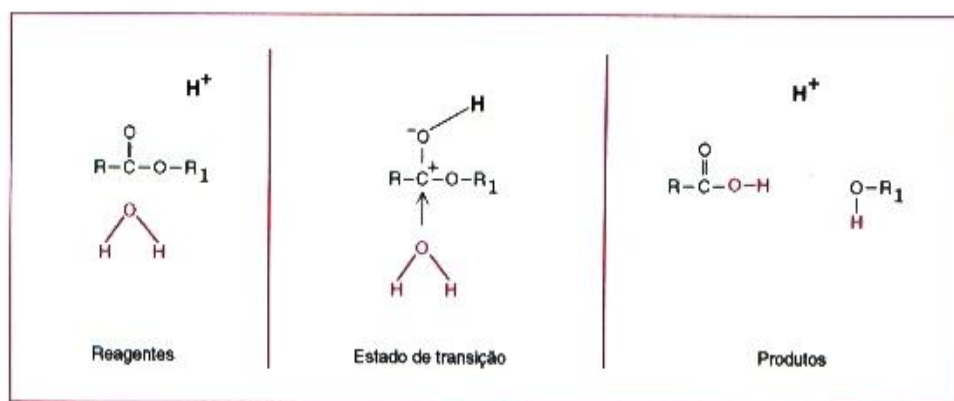


Fig. 5.4 Mecanismo da hidrólise de um éster catalisada por H^+ . A presença do íon altera a distribuição de cargas elétricas do éster, criando um caminho de reação que necessita de energia de ativação menor do que o da reação não catalisada.

é alta. A presença dos íons H^+ cria um caminho alternativo para a reação: o íon H^+ liga-se ao oxigênio presente no éster, aumentando a carga positiva do carbono e tornando-o mais susceptível ao ataque do oxigênio da água. Para este novo caminho a energia necessária é menor e, portanto, em uma mesma temperatura, mais moléculas poderão reagir e a velocidade da reação será aumentada pela presença de H^+ . Seguindo modelo semelhante, muitas reações químicas poderão ser aceleradas por íons OH^- , por íons de metais etc.

No caso da catálise enzimática, a aproximação e a ligação do substrato (em uma reação enzimática, os reagentes são chamados *substratos*) à enzima altera o delicado balanço de forças responsáveis pela manutenção da estrutura tridimensional da enzima, amoldando sua forma à forma do substrato e fazendo-a adquirir uma nova configuração, ideal para a catálise. Os substratos têm sua molécula tensionada e distorcida, aproximando-se da conformação do estado de transição. Além disto, o substrato, corretamente posicionado no sítio ativo (p. 65), está próximo de grupos R decisivos para a catálise. No caso da catálise enzimática, o grupo positivo H^+ da catálise não-enzimática (Fig. 5.4) poderia ser substituído por um radical R positivo de um aminoácido do sítio ativo, passando, portanto, a reação a independe dos choques casuais entre as moléculas dos reagentes. É este conjunto de mecanismos que torna a catálise enzimática tão eficiente, muito mais eficiente do que a catálise inorgânica.

As enzimas apresentam propriedades muito mais interessantes para as células que os catalisadores inorgânicos

As enzimas, como todas as proteínas, são sintetizadas pelas próprias células. Sua presença nas células torna possível a ocorrência, a velocidades apreciáveis, de reações cujas velocidades seriam desprezíveis na sua ausência. A anidrase carbônica, por exemplo, catalisa a hidratação do gás carbônico ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$) a uma velocidade 10^7 vezes maior do que a velocidade da reação não-catalisada. Algumas enzimas provocam aumento de até 10^{14} vezes na velocidade da reação que catalisam. Ainda mais, como as enzimas apresentam alto grau de *especificidade*, ocorrerão em uma célula, dentre todas as reações potencialmente possíveis entre as numerosas substâncias presentes, apenas aquelas para as quais a célula possui enzimas adequadas. Além de catalisarem reações específicas com velocidades várias ordens de grandeza maiores do que os catalisadores inorgânicos, as enzimas apresentam sobre eles outras vantagens: *sua concentração celular e sua atividade podem ser reguladas*, permitindo o ajuste a diferentes condições fisiológicas.

Resumindo, as enzimas (1) diminuem a energia de ativação, levando a altas velocidades de reação, (2) são muito específicas, (3) são sintetizadas pelas próprias células e (4) têm concentração e atividade moduláveis, permitindo um ajuste fino do metabolismo ao ambiente celular. O conjunto destes aspectos favoráveis possibilita a manutenção da vida, justificando o alto investimento energético necessário para a síntese de enzimas.

5.2 CLASSIFICAÇÃO E NOMENCLATURA DAS ENZIMAS

Pelas regras oficiais de classificação e nomenclatura, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (Quadro 5.2). Cada um destes grupos é ainda subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambigüidade. Assim, por exemplo, a enzima que catalisa a remoção de elétrons do etanol (portanto, uma *óxido-redutase*) é designada *álcool:NAD⁺:óxido-redutase* e recebe o número de classificação EC 1.1.1.1. (EC de Enzyme Commission). Esta nomenclatura oficial é, na prática, muitas vezes desobedecida em favor de nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. A enzima citada que catalisa a oxidação do etanol é comumente referida como álcool desidrogenase; a enzima que catalisa a síntese de glicogênio (oficialmente designada *UDPglicose:glicogênio 4- α -D-glicosiltransferase*) é chamada *glicogênio sintase*. Como se vê nestes exemplos, na nomenclatura usual, o nome é dado indicando o substrato, seguido de uma outra palavra terminada em *ase* que especifica o tipo de reação que a enzima catalisa. Mesmo esta forma simplificada de nomenclatura apresenta exceções, como é o caso das enzimas digestivas: *pepsina*, *tripsina* etc., cujos nomes triviais tornaram-se clássicos. Apesar disso, não é necessário memorizar os nomes das enzimas pois, com um pouco de prática, é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa, ou vice-versa.

Quadro 5.2 As seis classes de enzimas e as reações que catalisam

Classe	Tipo de reação	Exemplo
1. Óxido-redutases	<p>Óxido-redução</p> $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$	<p>Etanol Acetaldeído</p>
2. Transferases	<p>Transferência de grupos</p> $A-X + B \rightleftharpoons A + B-X$	<p>Glicose Glicose 6-fosfato</p>
3. Hidrolases	<p>Hidrólise</p> $A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$	<p>Sacarose Glicose Frutose</p>
4. Liasas	<p>Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação</p> $A=B + X-Y \rightleftharpoons \begin{matrix} X & Y \\ & \\ A & - & B \end{matrix}$	<p>Fumarato Malato</p>
5. Isomerases	<p>Rearranjos intramoleculares</p> $\begin{matrix} A-B \\ & \\ X & Y \end{matrix} \rightleftharpoons \begin{matrix} A-B \\ & \\ Y & X \end{matrix}$	<p>Glicose 6-fosfato Frutose 6-fosfato</p>
6. Ligases	<p>Condensação de duas moléculas, associada à hidrólise de uma ligação de alta energia (em geral, do ATP)</p> $A+B \rightleftharpoons A-B$	<p>Piruvato Oxaloacetato</p>

5.3 INTERAÇÃO ENZIMA-SUBSTRATO

As enzimas apresentam graus variáveis de especificidade

Geralmente há uma grande diferença de tamanho entre as moléculas de enzimas e as de seus substratos. As enzimas são macromoléculas proteicas — mesmo as mais simples são formadas de mais de uma centena de aminoácidos — e seus pesos moleculares variam de 10.000 a alguns milhões, enquanto o peso molecular dos substratos é muitas ordens de grandeza inferior (Quadro 5.3).

Embora o total da molécula enzimática seja necessário para o papel catalítico, a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima. Esta região à qual o substrato se liga é chamada *centro ativo* (ou *sítio ativo*) da enzima. O centro ativo é formado por resíduos de aminoácidos, trazidos à proximidade uns dos outros pelos dobramentos da cadeia polipeptídica que definem a estrutura terciária da proteína. O centro ativo, assim organizado, constitui uma cavidade com forma definida, que permite à enzima “reconhecer” seu substrato. De fato, uma molécula, para ser aceita como substrato, deve ter a forma espacial adequada para alojar-se no centro ativo e grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com os radicais do centro ativo. Esta relação substrato-enzima não deve ser entendida como um modelo rígido de chave-fechadura. Este modelo exemplifica a especificidade de uma enzima pelo seu substrato, mas não explica toda a complexidade da relação estabelecida entre eles durante a catálise. Na verdade, a análise da estrutura da enzima na ausência e presença do substrato — feita por difração de raios X e outros métodos — revela com clareza que a aproximação e a ligação do substrato induz, na enzima, uma mudança na sua forma, tornando-a ideal para a catálise (Fig. 5.5).

Como cada enzima possui uma organização estrutural específica, o seu centro ativo permite a ligação apenas do seu substrato, trazendo grande especificidade para a catálise. O nível de especificidade varia com a enzima considerada. Há enzimas, por exemplo, que aceitam como substratos qualquer açúcar de seis carbons; outras só reconhecem um desses açúcares, a glicose. Certas enzimas catalisam reações com vários aminoácidos, enquanto outras exigem um aminoácido determinado. Entretanto, qualquer que seja o grau de especificidade apresentado pelas enzimas, é sempre maior do que o apresentado pelos catalisadores inorgânicos. Os íons H^+ , por exemplo, atuam como catalisadores de um grande número de reações, incluindo a hidrólise de proteínas, polissacarídeos e ésteres. As *enzimas proteolíticas*, ao contrário, são específicas para a hidrólise de proteínas, não atuando sobre carboidratos ou lipídios, para cujas hidrólises são necessárias enzimas próprias. Entre as enzimas proteolíticas aparecem diferentes graus de especificidade: a *pepsina* hidrolisa ligações peptídicas das quais participem grupos carboxílicos de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina) e a *tripsina* reconhece apenas ligações peptídicas formadas por arginina ou lisina. Graus extremos de especificidade podem ser encontrados entre as *L-aminoxidases*, por exemplo. São enzimas capazes de reconhecer isômeros na configuração L, sendo inativas para aminoácidos na forma D.

Quadro 5.3 Pesos moleculares aproximados de enzimas e de seus substratos

Enzima	Substrato	Peso molecular aproximado
Catalase		200.000
	H_2O_2	34
Urease		500.000
	Uréia	60
Fosfofrutoquinase		380.000
	Frutose 6-fosfato	300
Glutamina sintetase		600.000
	Glutamato	150

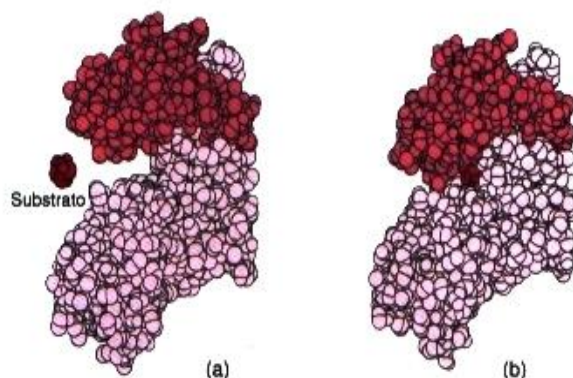


Fig. 5.5 O centro ativo da enzima tem estrutura espacial específica (a); a ligação com o substrato ajusta a conformação enzimática, tornando-a ideal para a catálise (b). No exemplo mostrado, a molécula da enzima consta de dois domínios, que se aproximam, envolvendo o substrato. (Reproduzida de Lehninger, A. L., Principles of Biochemistry. Worth Publishers, Inc., 1982.)

5.4 FATORES QUE INTERFEREM NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA: pH E TEMPERATURA

A eficiência da catálise depende do meio

A estrutura e a forma do centro ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na proteína. Isto torna a atividade enzimática dependente das características do meio, notadamente do pH e da temperatura.

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH para o qual a sua atividade é máxima — a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo, que é característico para cada enzima (Quadro 5.4) mas, com frequência, está próximo do pH neutro. A influência do pH sobre a catálise enzimática pode ser melhor compreendida lembrando que as enzimas apresentam grupos tituláveis nos resíduos de arginina, aspartato, cisteína, glutamato, histidina, lisina e tirosina. Alguns destes grupos podem fazer parte do centro ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. A cada valor de pH, alguns destes grupos apresentam-se protonados ou desprotonados. Existe uma concentração hidrogeniônica que propicia um determinado arranjo de grupos protonados e desprotonados que leva a molécula de enzima à conformação ideal para exercer seu papel catalítico. Este pH ótimo depende, portanto, do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da seqüência em que estão organizados, ou seja, depende de sua estrutura primária. Por outro lado, quando o substrato contém grupos ionizáveis, as variações de pH também poderão afetar suas cargas. A eficiência da catálise dependerá, então, de encontrarem-se, enzima e substrato, com conformação e carga adequadas para permitir a interação.

Como ocorre com a maioria das reações químicas, a velocidade da reação enzimática, que a 0°C apresenta valores próximos de zero, é favorecida pela elevação da temperatura. O gradativo aumento da velocidade só se verifica enquanto a enzima conservar sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das proteínas glo-

Quadro 5.4 pH ótimo de enzimas

Enzima	pH ótimo
Pepsina	1,5
Fosfatase ácida	4,5
Urease	6,5
Tripsina	7,8
Arginase	9,7

bulares — enzimas inclusive — são desnaturadas. A desnaturação provoca drásticas alterações conformacionais na molécula, acarretando a perda do poder de catálise. No intervalo de temperatura mencionado vive a grande maioria dos seres vivos; há, entretanto, exceções, entre as quais a mais notável é representada por bactérias que vivem em águas termais, com temperaturas ao redor de 100°C. A estabilidade térmica das proteínas destes microrganismos constitui um caso excepcional (p. 30).

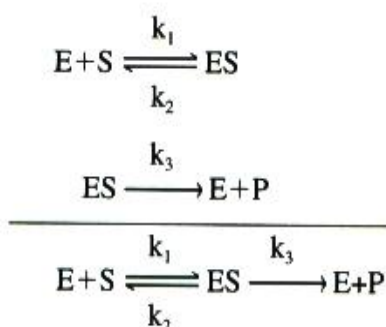
As considerações anteriores, referentes a amplas variações de pH e temperatura, são pertinentes ao estudo da atividade enzimática *in vitro*. Os seres vivos, entretanto, têm suas reações ocorrendo em ambiente tampoadado, já que todas as células dispõem de mecanismos para manutenção do pH. Mesmo assim, microambientes celulares podem apresentar pequenas variações de pH que afetam a atividade das enzimas e que servem, eventualmente, para o controle de sua ação. A temperatura, entretanto, tem influência decisiva sobre a distribuição geográfica dos seres vivos. Microrganismos, vegetais, animais inferiores e peclilotermos têm seu crescimento inteiramente dependentes da temperatura ambiente; aves e mamíferos, de temperatura constante, são menos afetados.

5.5 CINÉTICA DA REAÇÃO ENZIMÁTICA

Enzima e substrato formam um complexo transitório

O estudo das reações enzimáticas e de uma série de propriedades das enzimas baseia-se em medidas da *velocidade* da reação, que é diretamente proporcional à concentração do reagente. Assim, a velocidade da reação $A \rightarrow B$ (p. 60) é: $v = k[A]$. À medida que a reação se processa, ou seja, A transforma-se em B, a concentração de reagente diminui e, portanto, a velocidade da reação também diminui, passando a ser proporcional às novas concentrações de A. Para que se possa ter um valor único para a velocidade de uma reação, efetivamente proporcional à concentração inicial de A, é conveniente adotar a medida de *velocidade inicial* (v_0). Esta velocidade é obtida medindo-se a quantidade de produto formado em tempos suficientemente curtos para que, no máximo, 5% do reagente (substrato) tenham sido transformados em produto e, portanto, a concentração do reagente possa ser considerada aproximadamente constante durante o tempo da medida. Naturalmente o tempo utilizado para esta medida depende da reação considerada, podendo variar de frações de segundos até várias horas.

A reação catalisada enzimaticamente processa-se em duas etapas: na primeira, a enzima (E) liga-se reversivelmente ao substrato (ou substratos) (S), formando um *complexo enzima-substrato* (ES); na segunda fase é liberado o produto (ou produtos) (P) e a enzima volta à forma livre, podendo, então, ligar-se a outra molécula de substrato. Na maioria dos casos em que a reação catalisada é do tipo $A + B \rightarrow C + D$, os substratos A e B devem ligar-se simultaneamente ao centro ativo, onde ocorre a reação, com liberação dos produtos C e D (Fig. 5.6). Para o tratamento da cinética enzimática, será adotado um modelo mais simples ($S \rightarrow P$), em que há apenas um substrato e um produto. É o caso, por exemplo, de algumas reações de isomerização, em que um isômero é transformado em outro.



Em uma reação enzimática típica, a primeira fase da reação (formação do complexo ES) ocorre a velocidades muito maiores do que a segunda (decomposição do complexo ES em E + P); as equações de velocidade para estas fases são

$$\begin{aligned}
 v_1 &= k_1 [E] [S] \\
 v_3 &= k_3 [ES]
 \end{aligned}$$

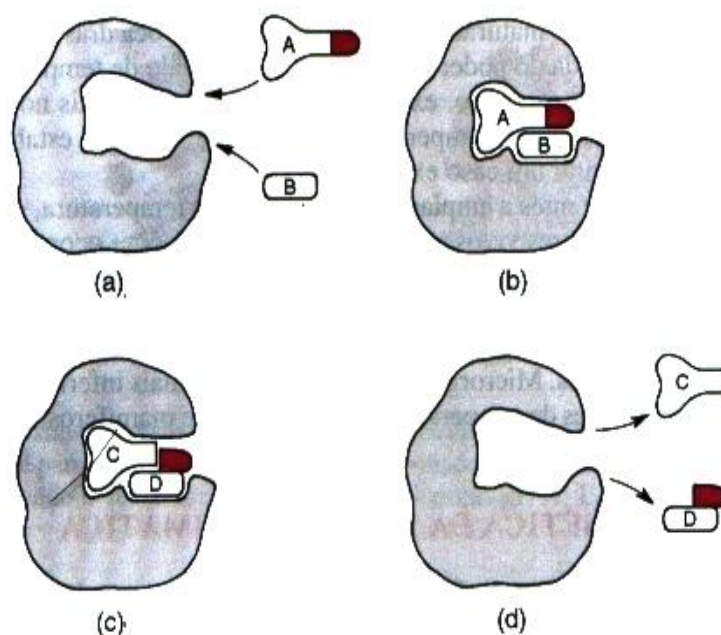


Fig. 5.6 Esquema de uma reação enzimática que consiste na transferência de um grupo químico (assinalado em vermelho), do composto A para o composto B. Em (a) as setas indicam o sítio ativo da enzima. Ambos os substratos alojam-se no centro ativo (b), onde a reação tem lugar (c); do centro ativo são liberados os produtos C e D (d).

onde k_1 , a constante de velocidade da formação do complexo ES, é maior do que k_3 , a constante de velocidade da formação do produto. Ainda mais, k_2 , a constante de velocidade de dissociação de ES em E + S, é menor do que k_1 e maior do que k_3 , isto é, $k_1 > k_2 > k_3$. A velocidade da reação global, ou seja, a velocidade da formação do produto, é, portanto, igual a v_3 , já que esta é a etapa mais lenta e limitante do processo. Estes pressupostos foram estabelecidos por Michaelis e Menten, que desvendaram, com seu tratamento matemático, a cinética da reação catalisada enzimaticamente. Estas suposições revelaram-se verdadeiras para um grande número de enzimas, atualmente chamadas *enzimas michaelianas*, e serão admitidas para as considerações feitas a seguir. Para muitas enzimas, entretanto, as premissas consideradas por aqueles autores não são verdadeiras e a cinética de suas reações é diferente da que será tratada aqui.

Nas reações enzimáticas, a concentração de enzima é, via de regra, muito menor que a de substrato. De fato, em virtude da diferença de peso molecular entre eles (Quadro 5.3), soluções equimolares de enzima e substrato não são usadas na prática e, muitas vezes, nem sequer poderiam ser obtidas. Um exemplo ilustrativo é a reação de síntese de glutamina a partir de glutamato, catalisada pela glutamina sintetase. Uma solução 10 mM de glutamato (mol = 150) contém 1,5 g/L; para conter o mesmo número de moléculas, uma solução de glutamina sintetase (mol = 600.000) deveria ser também 10 mM, ou seja, conter 6 kg de enzima por litro! Na prática, portanto, as soluções de enzimas são muito mais diluídas do que as de seus substratos e, nas reações enzimáticas, o número de moléculas de enzima é muito inferior ao número de moléculas do substrato. Esta situação é semelhante à celular, onde a concentração de substrato chega a ser 10^6 vezes superior à da enzima.

Apesar dessa disparidade numérica, quando se adiciona enzima a uma solução de substrato, nem todas as moléculas de enzima combinam-se com o substrato (Fig. 5.7, situação A). Como k_3 tem valor muito menor do que k_1 e k_2 , estabelece-se um equilíbrio entre E, S e ES, já que a conversão de ES a E + P é comparativamente muito lenta. Este equilíbrio entre E, S e ES tem concentrações definidas e constantes de cada espécie, restando sempre uma porcentagem de enzima livre (E). Na Fig. 5.8, esta fase ocorre até o tempo t_1 . Sob este aspecto, a reação $E + S \rightleftharpoons ES$ em nada difere de uma reação química genérica $A + B \rightleftharpoons C$, em cujo equilíbrio existem, concomitantemente, as espécies A, B e C. As concentrações de cada espécie dependerão do valor da constante de equilíbrio da reação e, portanto, dos valores das constantes de velocidade k_1 e k_2 :



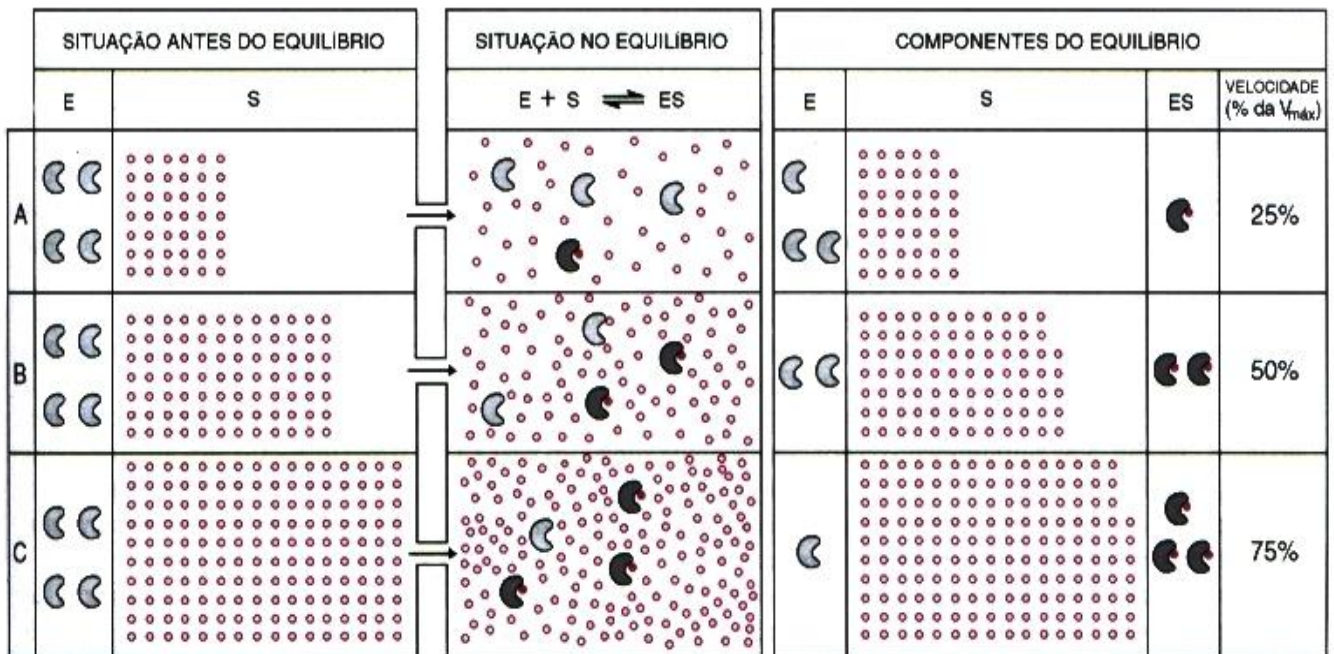


Fig. 5.7 Esquema ilustrativo do equilíbrio $E + S \rightleftharpoons ES$, em três situações (A, B, C) de concentrações diferentes de substrato e mesma concentração de enzima ($[E_{total}] = [E] + [ES]$). Na prática, a relação $[S]/[E]$ é muito maior do que a representada no esquema.

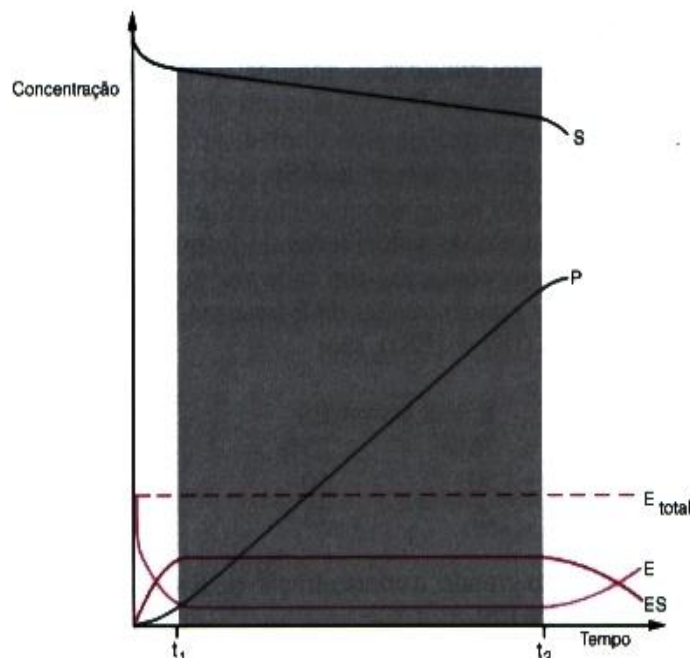
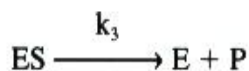


Fig. 5.8 Variação das concentrações dos componentes da reação enzimática em função do tempo. O intervalo $0 - t_1$ é muito pequeno. Após o tempo t_1 , estabelece-se o equilíbrio entre E, S e ES, cujas concentrações permanecem aproximadamente constantes até o tempo t_2 . A concentração do produto cresce sempre; a concentração do substrato, a rigor, diminui mas pode ser considerada constante face à sua enorme concentração em comparação à da enzima, do complexo ES e do produto. Entre t_1 e t_2 está o tempo inicial, durante o qual a velocidade inicial deve ser medida. Após o tempo t_2 , a concentração do substrato começa a diminuir efetivamente e a reação aproxima-se do final.

Tendo havido formação de ES, inicia-se a segunda parte da reação enzimática, aquela que efetivamente gera o produto, com *velocidade proporcional à concentração de ES*:



Note-se que o fato de ES estar sendo consumido na formação do produto não provoca diminuição da sua concentração, pois há sempre excesso de substrato (em relação à quantidade de enzima) para combinar-se com a enzima liberada quando se forma o produto.

Esta situação mantém-se durante algum tempo, chamado *tempo inicial*, durante o qual é medida a *velocidade inicial*: contínua formação do produto e concentrações estáveis de ES e E; a pequena e contínua diminuição da concentração de S não é significativa, face ao seu grande excesso. Na Fig. 5.8, este período corresponde ao intervalo $t_1 - t_2$. Naturalmente, em tempos maiores do que os tempos iniciais (tempos maiores do que t_2 , na Fig. 5.8) a diminuição da concentração de substrato passa a ser significativa: a reação prosseguirá com velocidades cada vez menores até que todo o substrato seja transformado em produto. *As considerações que serão feitas daqui para diante restringem-se exclusivamente aos tempos iniciais, e são, portanto, referentes a medidas de velocidades iniciais.*

A análise de três situações de concentrações diferentes de substrato, com uma mesma concentração de enzima, esclarece a influência da concentração do substrato na velocidade da reação. A primeira situação (situação A da Fig. 5.7) supõe uma pequena concentração de substrato (pequena, porém muito maior do que a concentração de enzima) e que o equilíbrio estabelecido por estas concentrações seja tal que apenas 25% das moléculas de enzimas presentes estejam ligadas ao substrato, formando o complexo ES. Os 75% restantes estarão livres, na forma E. No segundo caso (situação B, Fig. 5.7), admita-se igual quantidade de enzima, mas concentração de substrato maior do que a anterior. Novamente se estabelecerá o equilíbrio imediato da primeira etapa da reação. A constante de equilíbrio será, naturalmente, a mesma. Como, neste caso, a concentração de S é maior do que no caso anterior, o equilíbrio será obtido com uma concentração de ES maior e uma concentração de E menor. O aumento da concentração de substrato foi tal que levou 50% das moléculas de enzimas presentes a estar complexadas com o substrato, formando ES, deixando os outros 50% como enzimas livres, E. A concentração de ES, maior do que no caso anterior, é refletida imediatamente na velocidade de formação do produto, já que

$$v_3 = k_3[ES]$$

Com concentrações maiores de substrato, as velocidades de formação do produto tornar-se-ão cada vez maiores, porque, no equilíbrio da primeira etapa, existirá cada vez mais complexo ES (situação C, Fig. 5.7).

Nas situações A, B e C da Fig. 5.7, as concentrações de E (enzima livre) e de ES, expressas como porcentagem da concentração total de enzima ($[E] + [ES]$), são:

	$E + S \rightleftharpoons ES$	
A	75%	25%
B	50	50
C	25	75

Se a quantidade de substrato for muito grande, a concentração de E será praticamente nula, encontrando-se toda a enzima disponível sob a forma de ES:



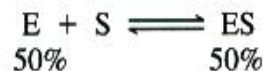
Nestas condições haverá a maior concentração possível de ES e a reação será processada na maior velocidade possível. Esta concentração de substrato é dita *saturante* e, a partir dela, novos aumentos da concentração de substrato não terão efeito perceptível sobre a velocidade da reação, que atingiu o seu valor

máximo, a *velocidade máxima* ($V_{m\acute{a}x}$) da reação. Assim, a velocidade da reação é sempre proporcional à concentração de ES, como exemplificado na Fig. 5.7, onde a velocidade é expressa em porcentagem da $V_{m\acute{a}x}$.

Os dados experimentais para a obtenção de um gráfico que relaciona velocidade inicial e concentrações de substrato (Fig. 5.9) podem ser conseguidos através do procedimento seguinte. Monta-se uma série de tubos, todos contendo a *mesma* concentração de enzima mas com concentrações crescentes de substrato. Espera-se o tempo adequado para que se forme uma quantidade dosável de produto; este tempo, entretanto, deve ser suficientemente pequeno para que no máximo 5% do substrato tenham sido transformados em produto (isto garante que a medida de velocidade corresponderá à *velocidade inicial*). Dosado o produto, a velocidade será calculada dividindo-se a quantidade de produto formado pelo tempo. Na curva obtida (Fig. 5.9), podem-se identificar duas regiões:

1. uma região em que a velocidade aumenta linearmente com o aumento da concentração de S, indicando que durante a reação havia moléculas de enzima livres; nesta parte, portanto, a concentração de S é o fator limitante da velocidade da reação.
2. uma região em que a velocidade permanece constante, igual a $V_{m\acute{a}x}$, apesar do aumento da concentração de S, indicando que todas as moléculas de enzima estiveram ligadas ao substrato durante o tempo em que a velocidade da reação foi medida.

Entre todas as concentrações de substrato, existirá uma determinada concentração que provocará a formação de uma concentração de ES igual à metade da máxima possível. Ou seja, quando se usa esta concentração inicial de substrato, o equilíbrio da primeira etapa está estabelecido com 50% das enzimas sob a forma livre e 50% das enzimas na forma ES (como na situação B da Fig. 5.7).



Nestas condições, a velocidade será, certamente, a metade da $V_{m\acute{a}x}$. Esta concentração definida de substrato é igual à *constante de Michaelis-Menten*, K_M , e apresenta interesse particular, pois seu valor indica a *afinidade* que uma enzima apresenta pelo seu substrato. Por exemplo, a *hexoquinase*, uma enzima do metabolismo de carboidratos, aceita como substrato dois açúcares simples: a glicose e a frutose. Para saber por qual das duas hexoses a hexoquinase apresenta maior afinidade, pode-se medir a $V_{m\acute{a}x}$ da reação (e calcular a metade desta velocidade), utilizando glicose como substrato, e compará-la com a $V_{m\acute{a}x}$ obtida usando frutose como substrato. No caso em que o substrato é a glicose, a metade da $V_{m\acute{a}x}$ é obtida com concentração do açúcar igual a 0,15 mM. Dito de outra forma, é necessária uma concentração de 0,15 mM de glicose para que metade da enzima disponível encontre-se ligada à glicose, fazendo o complexo Enzi-

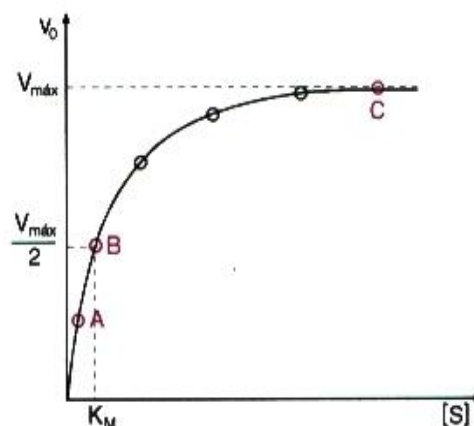


Fig. 5.9 Variação da velocidade da reação enzimática em função da concentração de substrato.

ma-Glicose. Para conseguir-se situação análoga com frutose, é necessária uma concentração de frutose 10 vezes maior, ou seja, 1,5 mM. A hexoquinase tem, portanto, uma afinidade muito maior pela glicose do que pela frutose.

A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima

Deve-se assinalar que, em todas as considerações feitas sobre a variação da velocidade de reação em relação à concentração de substrato, admitiu-se sempre uma concentração *fixa* de enzima. Variando a concentração de enzima, a velocidade *sempre* irá variar, qualquer que seja a concentração do substrato, pois, se, para uma concentração E de enzima, obtém-se



para uma concentração de enzima igual a 2E deve-se ter

$$K_{eq} = \frac{[2ES]}{[2E][S]}$$

É importante lembrar que o substrato está sempre em tal excesso que a quantidade dele que se liga à enzima é desprezível e, portanto,

$$[S] - [ES] \cong [S] \quad \text{e} \quad [S] - [2ES] \cong [S]$$

Entretanto, a concentração de ES em um caso é o dobro da outra, e, portanto, como

$$v_3 = k_3[ES]$$

a velocidade em um caso também será o dobro da outra (Fig. 5.10).

Generalizando, podemos então afirmar que a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima (Fig. 5.11). Esta proporcionalidade facilita a determinação da concentração (atividade) de uma enzima; há casos freqüentes em que esta dosagem é útil ou necessária.

A dosagem de uma enzima é obtida pela medida de sua atividade

As concentrações das soluções são habitualmente expressas em unidades de massa por unidades de volume; para a aferição da massa do soluto presente em soluções de uso corrente na Bioquímica, empregam-se vários métodos, sendo a determinação colorimétrica um dos mais freqüentes. As soluções de enzimas constituem um caso especial. Muitas vezes há necessidade de aferir a quantidade de uma enzi-

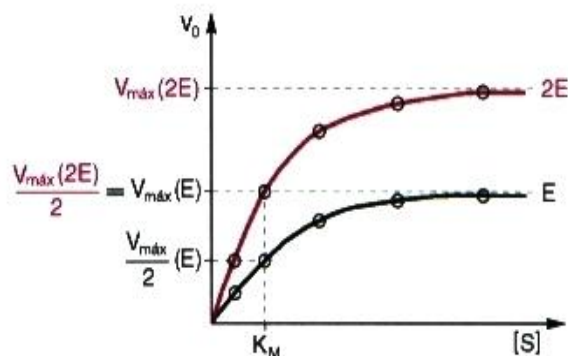


Fig. 5.10 Variação da velocidade da reação enzimática em função da concentração de substrato para duas concentrações de enzima (E, 2E).

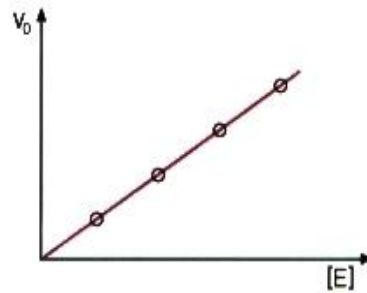


Fig. 5.11 Velocidade da reação enzimática em função da concentração de enzima.

ma presente em soluções que contêm também outras proteínas — é o caso de dosagem de enzimas em plasma sanguíneo e outros fluidos corpóreos ou em extratos celulares. Uma alternativa para esta dosagem seria purificar a enzima, um processo demorado, trabalhoso e, como será visto a seguir, desnecessário. A possibilidade de dosagem colorimétrica de uma dada enzima presente em uma solução contendo outras proteínas está descartada, pela inexistência de um reagente específico para uma dada proteína, porque os reagentes para proteínas atuam sobre todas, já que todas as proteínas têm os mesmos grupos químicos. No caso das enzimas, entretanto, esta limitação não é relevante porque o que verdadeiramente importa é aferir a quantidade de enzimas ativas, ou seja, a atividade enzimática e não a concentração. Em uma solução de proteínas desnaturadas, a massa da enzima de interesse seria conservada mas a propriedade catalítica estaria perdida.

Em virtude do exposto, a dosagem de enzimas é sempre feita através da medida de sua *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Dada a especificidade das enzimas, esta medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Para efetuar essas dosagens, uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentrações altas de substratos, para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas. A velocidade da reação é medida e expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional (U)* é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (pH, temperatura etc.), especificadas para cada caso. As dosagens clínicas de enzimas no plasma e em outros fluidos são geralmente expressas em U/mL ou U/L (Fig. 5.12).³

A concentração de enzimas intracelulares no plasma é centenas de vezes menor do que no interior das células, onde elas são sintetizadas. Em condições patológicas, quando as células são lesadas, suas concentrações plasmáticas tornam-se anormalmente elevadas, revelando a instalação da moléstia. Ainda mais, o tipo de enzima cuja concentração plasmática aumenta pode indicar o tecido ou órgão que sofreu a injúria. Por isto, a dosagem de enzimas no plasma é prática corrente para a elucidação e o acompanhamento de muitos casos patológicos (Quadro 5.5). A atividade da enzima de interesse no plasma é aferida e comparada com os valores médios encontrados em indivíduos sadios.

A medida da atividade enzimática é também imprescindível para monitorar a purificação de uma enzima. O processo de isolamento de uma enzima é iniciado a partir de um macerado de órgão ou tecido, o extrato celular. Tomando uma amostra deste extrato, deve-se determinar a atividade da enzima em questão (em U/mL, geralmente) e a quantidade total de Unidades presentes no volume total do extrato. Para adotar um parâmetro que permita a comparação com outras preparações e com etapas posteriores do processo de purificação, é necessário usar um referencial; a referência habitualmente utilizada é a concentração total de proteína presente na preparação. Define-se, assim, a *atividade específica*, ou seja, o número de Unidades de enzima por miligrama de proteína. A cada etapa processada em direção à purificação da enzima, são feitas novas medidas de atividade e de concentração de proteína, e calculada a nova atividade específica. Se a etapa de purificação foi bem-sucedida, a atividade específica encontrada deve aumentar. Este aumento significa, naturalmente, que o procedimento adotado eliminou proteínas indesejáveis. Novos procedimentos de purificação são efetuados até que, no caso ideal, a atividade específica da preparação torna-se máxima e constante, indicando que a enzima está pura (Quadro 5.6).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
 CENTRO DE ANÁLISES TOXICOLÓGICAS
 LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Data / /1997
 Paciente:
 Médico:

ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO SORO

(a)

	DETERMINAÇÕES	RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIAS	MÉTODOS
1	Aldolase (ALS)	2 U/L	até 3 U/L	Cinético (UV)
2	Amilase (AMS)	120 USC	60 - 160 USC	Street-close (iodométrico)
3	Colinesterase (CHS)	2.700 U/L	1.900 - 3.800 U/L	Cinético (UV)
4	Creatina-quinase (CK)	62 U/L	mulher - 10 a 70 U/L homem - 10 a 80 U/L	Cinético (UV)
5	Lactato-desidrogenase (LD)	396 U/L	120 - 240 U/L	Cinético (UV)
6	Fosfatase ácida total (ACP)	7,3 U/L	criança - 7,8 a 21,2 U/L adulto - 4,8 a 13,5 U/L	Colorimétrico (p-nitrofenil-fosfato)
7	Fosfatase ácida prostática (ACP)	2,8 U/L	até 3,7 U/L	Colorimétrico (p-nitrofenil-fosfato)
8	Fosfatase alcalina (ALP)	295 U/L	mulher - 50 a 250 U/L homem - 50 a 250 U/L criança - 250 a 950 U/L	Cinético (p-nitrofenil-fosfato)
9	Aspartato transaminase (AST/TGO)	560 U/L	mulher até 15 U/L homem até 18 U/L	Cinético (UV)
10	Alanina transaminase (ALT/TGP)	1.095 U/L	mulher até 17 U/L homem até 21 U/L	Cinético (UV)
11	Glutamil-transferase (Gama-GT)	61 U/L	mulher - 4 a 19 U/L homem - 6 a 28 U/L	Cinético (visível)

(b)

	DETERMINAÇÕES	RESULTADOS	VALORES DE REFERÊNCIAS	MÉTODOS
1	Aldolase (ALS)	2,1 U/L	até 3 U/L	Cinético (UV)
2	Amilase (AMS)	125 USC	60 - 160 USC	Street-close (iodométrico)
3	Colinesterase (CHS)	3.200 U/L	1.900 - 3.800 U/L	Cinético (UV)
4	Creatina-quinase (CK)	50 U/L	mulher - 10 a 70 U/L homem - 10 a 80 U/L	Cinético (UV)
5	Lactato-desidrogenase (LD)	220 U/L	120 - 240 U/L	Cinético (UV)
6	Fosfatase ácida total (ACP)	15,6 U/L	criança - 7,8 a 21,2 U/L adulto - 4,8 a 13,5 U/L	Colorimétrico (p-nitrofenil-fosfato)
7	Fosfatase ácida prostática (ACP)	7,7 U/L	até 3,7 U/L	Colorimétrico (p-nitrofenil-fosfato)
8	Fosfatase alcalina (ALP)	80 U/L	mulher - 50 a 250 U/L homem - 50 a 250 U/L criança - 250 a 950 U/L	Cinético (p-nitrofenil-fosfato)
9	Aspartato transaminase (AST/TGO)	12 U/L	mulher até 15 U/L homem até 18 U/L	Cinético (UV)
10	Alanina transaminase (ALT/TGP)	18 U/L	mulher até 17 U/L homem até 21 U/L	Cinético (UV)
11	Glutamil-transferase (Gama-GT)	11 U/L	mulher - 4 a 19 U/L homem - 6 a 28 U/L	Cinético (visível)

Fig. 5.12 Resultados de exames laboratoriais de dosagens enzimáticas no plasma. O resultado do exame (a) é compatível com um quadro de hepatite viral aguda, e o do exame (b), com carcinoma de próstata.

Quadro 5.5 Enzimas cujas concentrações plasmáticas são alteradas em determinadas condições patológicas

Enzimas	Moléstias
Transaminases	Hepatite
Creatina quinase, lactato desidrogenase	Enfarte do miocárdio
Amilase, lipase	Pancreatite
Fosfatase alcalina, γ -glutamil transferase	Processos obstrutivos biliares
Fosfatase ácida	Neoplasia de próstata
Creatina quinase	Lesão cerebral grave
Lactato desidrogenase	Anemia hemolítica
Amilase	Parotidite (caxumba)

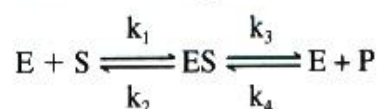
Quadro 5.6 Purificação hipotética de uma enzima

Etapas da purificação	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	U ⁽¹⁾ /ml	U totais	U/mg ⁽²⁾	Purificação
1. Extrato celular	10	80	800	2.000	20.000	25	1
2. Fracionamento por (NH ₄) ₂ SO ₄	2	120	240	9.000	18.000	75	3
3. Filtração em gel	10	2,2	22	1.620	16.200	750	30
4. Cromatografia de troca iônica	5	2,8	14	2.268	11.340	800	32
5. Cromatografia de afinidade	2	1,1	2,2	5.500	11.000	5.000	200

¹U: unidade de atividade enzimática. ²Atividade específica: número de Unidades de enzima por miligrama de proteína. Pelos dados apresentados no quadro, observa-se que a etapa 4 não é um método conveniente para a purificação da enzima em questão; esta etapa deveria ser suprimida em tentativas subseqüentes.

5.6 A EQUAÇÃO DE MICHAELIS-MENTEN

A descrição matemática dos fenômenos cinéticos apresentados anteriormente é dada pela *equação de Michaelis-Menten*. Para deduzi-la, será considerada a reação reversível:



Considerando sempre os tempos iniciais de reação, a velocidade de formação de ES a partir de E + P

$$v_4 = k_4 [E] [P]$$

pode ser desprezada, pois, como a concentração inicial de P é insignificante em relação a S, o produto não conseguirá ligar-se à enzima, já que a probabilidade de ligação do substrato é muito maior. A própria equação desta velocidade mostra que, quando a concentração de P é próxima de zero, a velocidade v_4 também tende a zero.

A velocidade de formação de ES será, portanto, apenas

$$v_1 = k_1 [E] [S]$$

[E] será, na verdade, a concentração de enzima livre, isto é, a diferença entre a concentração adicionada de enzima (ou seja, sua concentração total = E_t) e a concentração de ES (ou seja, a quantidade de enzima ligada ao substrato). Substituindo este valor de [E] na equação de v_1 , temos

$$v_1 = k_1 ([E_t] - [ES]) [S]$$

A velocidade de desaparecimento de ES será a soma de duas velocidades: aquela que dissocia ES em E + S (v_2) e aquela que transforma ES em E + P (v_3):

$$v_2 = k_2 [ES]$$

$$v_3 = k_3 [ES]$$

Assim, a velocidade de desaparecimento de ES será

$$\begin{aligned}v_2 + v_3 &= k_2 [ES] + k_3 [ES] \\v_2 + v_3 &= (k_2 + k_3) [ES]\end{aligned}$$

Durante os tempos considerados iniciais da reação, a concentração de ES mantém-se constante, com o estabelecimento de um equilíbrio estacionário (*steady-state*). As velocidades de formação (v_1) e de desaparecimento ($v_2 + v_3$) de ES são, portanto, iguais.

$$\begin{aligned}v_1 &= v_2 + v_3 \\k_1 ([E_t] - [ES]) \cdot [S] &= (k_2 + k_3) [ES] \\([E_t] - [ES]) \cdot [S] &= \frac{k_2 + k_3}{k_1} \cdot [ES] \\[E_t] \cdot [S] - [ES] \cdot [S] &= \frac{k_2 + k_3}{k_1} \cdot [ES] \\[E_t] \cdot [S] &= [ES] \cdot \frac{k_2 + k_3}{k_1} + [ES] \cdot [S] \\[E_t] \cdot [S] &= [ES] \left(\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S] \right) \\[ES] &= \frac{[E_t][S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]}\end{aligned}$$

Equação (A)

A velocidade inicial da reação total é a velocidade do aparecimento do produto:

$$v_0 = k_3 [ES]$$

Substituindo, nesta equação, o valor de [ES] da equação (A):

$$v_0 = k_3 \frac{[E_t][S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]}$$

Neste ponto devemos lembrar que a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) é obtida quando toda a enzima (E_t) se encontra sob a forma de ES. O produto $k_3 [E_t]$ é, portanto, a velocidade máxima e

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]}$$

A relação $(k_2 + k_3)/k_1$ foi definida por Michaelis-Menten como uma nova constante, K_M . Chega-se assim à expressão final da equação de Michaelis-Menten.

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

Quando a concentração de substrato é tal que a velocidade de reação é metade da velocidade máxima (ponto B da Fig. 5.9), teremos

$$\frac{V_{\text{máx}}}{2} = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M + [S]}$$

$$\frac{1}{2} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

$$K_M + [S] = 2 [S]$$

$$K_M = [S]$$

A última igualdade indica que a *constante de Michaelis-Menten é numericamente igual à concentração de substrato que determina a metade da velocidade máxima*, o que permite a fácil determinação experimental desta constante (Fig. 5.9). O valor do K_M pode indicar o grau de afinidade da enzima pelo substrato (Quadro 5.7), como já foi mencionado.

A velocidade da reação só é diretamente proporcional a baixas concentrações de substrato

Quando a concentração do substrato é muito inferior ao K_M , $K_M + [S]$ é praticamente igual a K_M , e a equação de Michaelis-Menten se reduz a

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}}}{K_M} [S]$$

Como $\frac{V_{\text{máx}}}{K_M}$ é uma constante, podemos escrever

$$v_0 = K[S]$$

ou seja, uma equação de reta do tipo $y = ax$. Esta equação mostra, portanto, que, com concentrações pequenas de substrato, a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do substrato (região do ponto A no gráfico da Fig. 5.9).

Por outro lado, quando a concentração de S é muito maior do que K_M (ponto C da Fig. 5.9), $K_M + [S]$ é praticamente igual a $[S]$ e a equação de Michaelis-Menten fica igual a

$$v_0 = V_{\text{máx}}$$

indicando que, quando a concentração de substrato é muito alta, a velocidade é constante e máxima, independentemente da concentração de substrato (região do ponto C no gráfico da Fig. 5.9).

A transformação de Lineweaver-Burk facilita a determinação do K_M

A equação de Michaelis-Menten é a equação de uma hipérbole retangular; portanto, rigorosamente, os valores de $V_{\text{máx}}$ nunca são atingidos, pois a curva tem assíntota no valor $V_{\text{máx}}$ do eixo v_0 . Este fato dificulta a determinação precisa de K_M , ainda mais levando-se em conta que boas aproximações dos valores de $V_{\text{máx}}$ devem ser obtidas com concentrações tão altas de substrato que são, às vezes, experimentalmente difíceis de conseguir.

Quadro 5.7 Constante de Michaelis-Menten de enzimas

Enzima	Substrato	K_M (mM)
Glicerol desidrogenase	glicerol	39
Anidrase carbônica	CO ₂	7,5
Álcool desidrogenase	etanol	0,5
Isocitrato desidrogenase	isocitrato	0,45
Hexoquinase	glicose	0,15
Hexoquinase	frutose	1,5

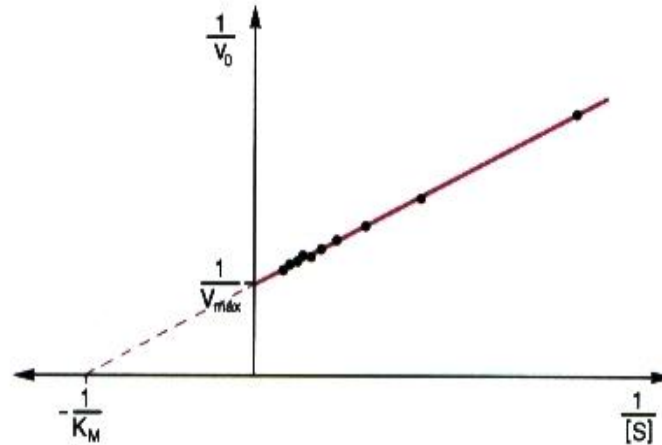


Fig. 5.13 Transformação de Lineweaver-Burk para os resultados de um experimento onde foram preparados tubos contendo diversas concentrações de substrato e a mesma concentração de enzima. Após a incubação, mediu-se v_0 . Os inversos dos valores das concentrações de substrato utilizadas e os inversos dos valores de v_0 compõem uma reta (linha contínua), que, extrapolada (linha interrompida), permite a determinação dos valores de K_M e de $V_{máx}$.

O problema da determinação exata de K_M e $V_{máx}$ pode, entretanto, ser resolvido através da transformação algébrica da equação de Michaelis-Menten. Esta transformação, formulada por Lineweaver e Burk, é obtida tomando o inverso daquela equação:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M + [S]}{V_{máx} [S]}$$

ou

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{máx}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{máx}}$$

que é uma equação de reta do tipo

$$y = ax + b$$

Um gráfico com os valores de $\frac{1}{v_0}$ contra valores de $\frac{1}{[S]}$ é, portanto, uma reta cujo intersepto nas ordenadas é $\frac{1}{V_{máx}}$ e, nas abscissas, $-\frac{1}{K_M}$ (Fig. 5.13).

Esta inversão permite a determinação do valor de K_M (e de $V_{máx}$) sem que seja necessário determinar experimentalmente o valor de $V_{máx}$, já que a reta pode ser traçada a partir de alguns pontos experimentais. Prolongando-se a reta até o eixo de ordenadas, encontra-se o valor do inverso de $V_{máx}$; o ponto em que a reta corta o eixo de abscissas fornecerá o valor negativo do inverso de K_M .

Algumas enzimas estão próximas da perfeição catalítica

Para estudar a eficiência da catálise enzimática, define-se a *constante catalítica*, k_{cat} :

$$k_{cat} = \frac{V_{máx}}{[E_t]}$$

A constante catalítica mede, para uma dada concentração de enzima, a eficiência máxima, obtida em condições de $V_{máx}$, quando todas as enzimas estão complexadas com o substrato. Nesta situação (p. 76), $V_{máx}$ é igual ao produto $k_3 [E_t]$, ou seja, k_{cat} é igual a k_3 :

$$k_3 = \frac{V_{máx}}{[E_t]}$$

Quadro 5.8 Algumas enzimas de alta eficiência

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Superóxido dismutase	1×10^6	$3,5 \times 10^{-3}$	$0,3 \times 10^9$
Catalase	1×10^7	$2,5 \times 10^{-2}$	$4,0 \times 10^8$
Acetilcolinesterase	1×10^4	$9,0 \times 10^{-5}$	$1,6 \times 10^8$
Anidrase carbônica	1×10^6	$1,2 \times 10^{-2}$	$8,3 \times 10^7$
Pepsina (hidrólise de Phe-Gly)	5×10^{-1}	$3,0 \times 10^{-4}$	$1,7 \times 10^3$

k_{cat} é também conhecida como *número de renovação* (*turnover number*) da enzima, porque equivale ao número máximo de moléculas de substrato que um centro ativo converte em produto, por segundo. O valor de k_{cat} indica a rapidez com que uma enzima pode operar, quando todos os centros ativos estão ocupados, ou seja, evidencia com que eficiência o complexo enzima-substrato origina produto (Quadro 5.8). A eficiência é espantosa: pelo valor de k_{cat} para a catalase, verifica-se que uma molécula desta enzima é capaz de originar 10.000.000 de moléculas de produto por segundo! Se ao valor de k_{cat} for associado o valor de K_M , pode-se definir uma nova constante k_{cat}/K_M , que relaciona a eficiência catalítica da enzima com a sua afinidade pelo substrato. Um baixo valor de k_{cat}/K_M ocorrerá ou porque a enzima tem pouca afinidade pelo substrato (alto K_M), ou porque a eficiência de gerar produto a partir de ES é pequena (pequeno k_{cat}), ou pelas duas razões somadas. Por outro lado, os maiores valores desta relação serão obtidos satisfazendo simultaneamente a duas condições: alta eficiência na transformação de ES em produto (grande k_{cat}) e alta afinidade da enzima pelo substrato (baixo K_M). No Quadro 5.8 aparecem os valores da relação k_{cat}/K_M para várias enzimas. O valor desta relação para as enzimas mais eficientes aproxima-se muito dos valores do coeficiente de difusão, ou seja, da frequência de colisão entre enzima e substrato por difusão simples (10^8 - $10^9 \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$); isto significa, portanto, que estas enzimas catalisam a reação com uma eficiência próxima da perfeição, ou seja, geram produto cada vez que colidem com o substrato. São enzimas que catalisam reações de grande importância para a fisiologia celular, seja na transmissão do impulso nervoso (acetilcolinesterase), na remoção de CO_2 dos tecidos (anidrase carbônica) ou na remoção de radicais livres de oxigênio (catalase e superóxido dismutase); comparativamente, a pepsina, uma enzima digestiva, é pouco eficiente.

5.7 INIBIDORES ENZIMÁTICOS

A atividade enzimática pode ser diminuída por grande número de substâncias, genericamente chamadas de *inibidores*. Algumas destas substâncias são constituintes normais das células; outras são estranhas aos organismos e sua presença — acidental ou intencional — nas células provoca alterações significativas no metabolismo.

Ao contrário do que possa parecer à primeira vista, os inibidores enzimáticos habitualmente encontrados nas células cumprem um papel regulador importante. A atividade das enzimas sensíveis à sua ação dependerá da concentração do inibidor em um determinado instante. Como este tipo de inibidor é produzido pelas próprias células, a variação da sua concentração é um recurso largamente empregado pelas células no controle da velocidade de muitas reações, permitindo sua resposta à mudança das condições fisiológicas (ver Regulação Alostérica de enzimas, Cap. 19).

Por outro lado, o uso *in vitro* de inibidores tem trazido um enorme volume de conhecimento sobre a estrutura das enzimas, a organização do centro ativo, o mecanismo de catálise etc., além de contribuir para a elucidação da seqüência correta das reações que compõem uma via metabólica.

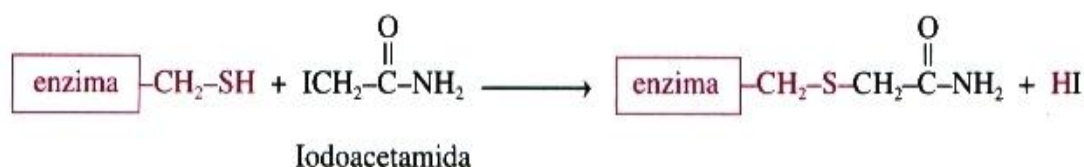
Como a ação enzimática efetivamente controla o metabolismo, a possibilidade de inibir reações enzimáticas é um campo aberto para aplicações farmacológicas. Muitos medicamentos de uso corrente na prática terapêutica baseiam suas propriedades na inibição específica de certas enzimas. O exemplo clássico é a utilização das *sulfonamidas* no combate a infecções bacterianas. Neste caso, a inibição se processa sobre uma particular enzima bacteriana, que não existe no organismo do hospedeiro. O bloqueio de uma única reação priva

o microrganismo do produto daquela reação, que seria o substrato de uma reação subsequente. Assim, gradativamente, é afetado um conjunto de reações seqüenciais, tornando a célula incapaz de reproduzir-se. À medida que são melhor conhecidas as enzimas e as reações que elas catalisam, é sintetizado um número crescente de drogas destinadas a bloquear reações específicas de organismos parasitas ou mesmo reações indesejáveis que se processam no organismo humano em condições patológicas.

As propriedades tóxicas de muitos inibidores têm ainda largo emprego no combate a insetos, por exemplo. Muitos inseticidas têm nos inibidores enzimáticos o seu princípio ativo. É também nesta toxidez que reside o perigo potencial dos detritos industriais, cujo conteúdo em inibidores enzimáticos inespecíficos é capaz de afetar praticamente qualquer ser vivo.

Conquanto exista grande variação quanto aos mecanismos de inibição, podem-se agrupar os inibidores em duas grandes categorias, irreversíveis e reversíveis, segundo a estabilidade de sua ligação com a molécula de enzima.

Os *inibidores irreversíveis* reagem quimicamente com as enzimas, levando a uma inativação praticamente definitiva — é o caso, por exemplo, de *compostos organofosforados*, que formam ligações covalentes com o grupo OH de resíduos de serina ou de *iodoacetamida*, que reage com o grupo SH de resíduos de cisteína.



Este tipo de inibidor é muito tóxico para os organismos, devido não só à irreversibilidade da sua ligação às enzimas, mas também em virtude de sua inespecificidade. Ligando-se à serina ou cisteína, aminoácidos frequentes na estrutura de quase todas as proteínas, esses inibidores são, em princípio, capazes de inativar qualquer enzima.

Outro exemplo de inibidor irreversível, porém com propriedades terapêuticas (anti-inflamatório, antipirético e analgésico), é a *aspirina (ácido acetil-salicílico)*. A aspirina transfere irreversivelmente seu grupo acetyl para o grupo OH de um resíduo de serina da molécula de cicloxigenase, inativando-a (Fig. 5.14). Esta enzima é responsável pela catálise da primeira reação da via de síntese de *prostaglandinas* (substâncias reguladoras de um conjunto grande de processos fisiológicos — ver Cap. 16). Sem a atuação das prostaglandinas, processos como a reação inflamatória, por exemplo, ficam atenuados. A *penicilina* deve seu emprego terapêutico às suas propriedades de inibidor irreversível: este antibiótico liga-se especificamente a enzimas da via de síntese da parede bacteriana, inibindo-as; desprovidas de parede, as células ficam sujeitas à lise. Esta é uma situação ideal, em que o agente terapêutico atua sobre uma enzima que o parasita apresenta e o indivíduo parasitado não possui.

Os *inibidores reversíveis* são classicamente divididos em dois grupos: os competitivos e os não-competitivos. O critério usado para esta divisão é o estabelecimento (ou não) de competição entre o inibidor e o substrato pelo centro ativo da enzima. A identificação do tipo de inibição pode ser sugerida pela comparação entre a estrutura do inibidor e a do substrato, mas é revelada inequivocamente pela cinética da reação catalisada em presença do inibidor.

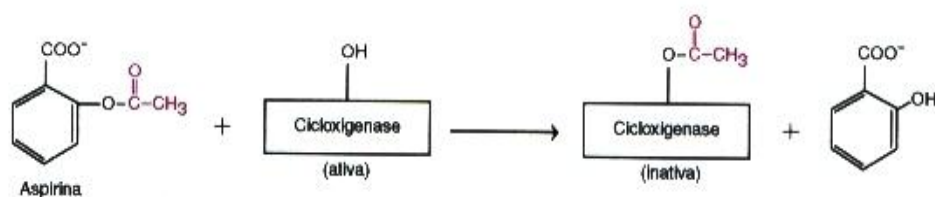


Fig. 5.14 Reação de inativação da cicloxigenase por reação irreversível com ácido acetil-salicílico (aspirina).

5.7.1 INIBIDORES COMPETITIVOS

Os inibidores competitivos competem com o substrato pelo centro ativo da enzima

Certas moléculas, por apresentarem configuração espacial semelhante à do substrato, são capazes de ligarem-se ao centro ativo da enzima, produzindo um complexo enzima-inibidor, semelhante ao complexo enzima-substrato. São os *inibidores competitivos* (I_c).



A constante de equilíbrio desta reação, chamada constante do inibidor (K_{I_c}), mede a afinidade da enzima pelo inibidor, como o K_M mede a afinidade da enzima pelo substrato:

$$K_{I_c} = \frac{[EI_c]}{[E][I_c]}$$

O complexo EI *jamais* gera produto e, portanto, a atividade enzimática estará diminuída de acordo com a fração de enzima que estiver ligada ao inibidor. Como este tipo de inibidor se liga ao mesmo sítio onde se liga o substrato, a ligação do inibidor e a ligação do substrato a uma dada molécula de enzima são eventos mutuamente exclusivos. Quando a molécula da enzima é liberada — ou por dissociação do complexo EI ou por decomposição do complexo ES em $E + P$ —, irá associar-se a novas moléculas de substrato ou de inibidor com uma probabilidade que dependerá de suas concentrações relativas e das afinidades relativas entre a enzima e o substrato e entre a enzima e o inibidor. Em concentrações baixas de substrato, em um dado momento, encontrar-se-á uma fração das enzimas ligadas ao substrato (gerando produto) e uma fração ligada ao inibidor. Como a fração ligada ao substrato certamente será menor do que a que existiria se o inibidor não estivesse presente, a velocidade da reação ficará reduzida. Se a concentração do substrato for muito grande em relação à concentração do inibidor competitivo, a probabilidade de formação do complexo ES é praticamente de 100%, e tudo se passa como se não houvesse inibidor presente no meio de reação. A velocidade máxima da reação será, portanto, idêntica à velocidade máxima da reação efetuada na ausência do inibidor, mas só será obtida com concentrações de substrato maiores do que as da reação não-inibida (Fig. 5.15). Contrariamente, se a concentração do inibidor competitivo for exageradamente alta em relação à concentração do substrato, a probabilidade da enzima livre ligar-se ao substrato é, praticamente, nula e a velocidade da reação será zero.

Como na presença de inibidor competitivo, mas com grande concentração de substrato, a velocidade máxima pode ser atingida, são as velocidades obtidas com concentrações menores de substrato que revelam a inibição. Há, neste caso, uma *aparente* alteração do valor do K_M , que parece maior do que o da reação normal. É claro,

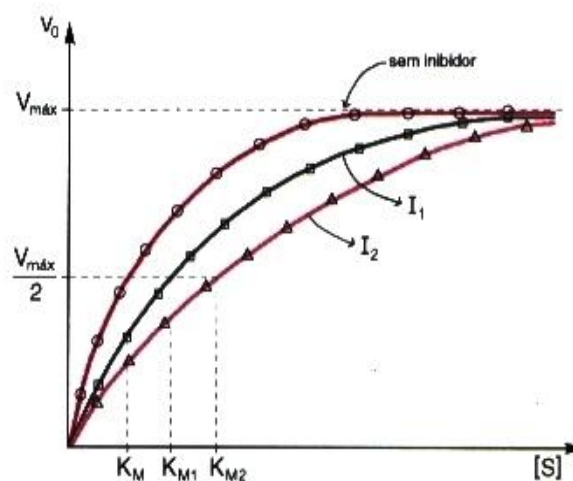


Fig. 5.15 Efeito de duas concentrações de inibidor competitivo (I_1 e I_2) sobre a velocidade da reação enzimática. K_{M1} e K_{M2} são valores do K_M aparente para concentrações crescentes de inibidor.

entretanto, que este valor não pode ser usado como uma medida de K_M , cuja determinação deve ser feita na ausência de inibidores. O novo valor da constante, medido em presença de inibidores, é chamado K_M aparente, e a comparação do seu valor com o valor do K_M tem muita utilidade na determinação do tipo de inibidor.

Na verdade, o valor de K_M determinado na presença de inibidores é alterado por outras variáveis, que são a afinidade da enzima pelo inibidor, expressa pela constante do inibidor (K_{I_c}), e a própria concentração de inibidor, $[I_c]$. Na presença do inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten é transformada em

$$v_0 = \frac{V_{\text{máx}} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I_c]}{K_{I_c}}\right) + [S]}$$

e mostra que as variáveis mencionadas afetam o valor do K_M e não de $V_{\text{máx}}$. A transformação de Lineweaver-Burk aplicada a esta equação está apresentada na Fig. 5.17.

Um exemplo clássico deste tipo de inibição é a ação de *malonato* sobre a reação catalisada pela *succinato desidrogenase*. Tendo estrutura semelhante ao succinato, o malonato inibe competitivamente a succinato desidrogenase. Outros compostos, semelhantes ao succinato, são também inibidores da enzima.

Os inibidores competitivos têm largo emprego terapêutico (Quadro 5.9), porque inibem reações que ocorrem específica ou principalmente no organismo parasita, vírus ou bactéria. É o caso, por exemplo, do AZT (3'-azido-2'-desoxitimidina), um inibidor da DNA polimerase (transcriptase reversa), necessária para a replicação do vírus HIV (de *human immunodeficiency virus*), causador da AIDS (de *acquired immune deficiency syndrome*). Os inibidores competitivos são também utilizados na quimioterapia de tumores e de leucemias. Neste caso, a célula tumoral comporta-se como o agressor do organismo e tem metabolismo diferente do da célula normal sob vários aspectos, que incluem uma velocidade de multiplicação muito maior. Por isto, drogas que afetam reações enzimáticas normais e imprescindíveis às células em geral atuarão preferencialmente sobre as células tumorais; também serão atingidos alguns tecidos normais que se dividem rapidamente, como a medula óssea (que produz as células sanguíneas), a mucosa intestinal e os folículos capilares. O alvo de escolha para a atuação destas drogas é o processo de replicação do DNA, em suas várias etapas. Um número crescente de drogas estão sendo planejadas estruturalmente, sintetizadas e testadas segundo esta abordagem farmacológica, que constitui uma grande esperança para o controle de moléstias até agora incuráveis.

5.7.2 INIBIDORES NÃO-COMPETITIVOS

Os inibidores pertencentes a esta classe não guardam qualquer semelhança estrutural com o substrato da reação que inibem. Seu efeito é provocado por ligação a radicais que não pertencem ao centro ativo; esta ligação altera a estrutura enzimática a tal ponto que inviabiliza a catálise. O ponto de ligação do inibidor não-competitivo (I_{NC}) é a cadeia lateral de um aminoácido — o grupo OH de serina, ou o grupo SH de cisteína, por exemplo. Como estes grupos são freqüentes nas enzimas, a ação de inibidores não-competitivos é bastante inespecífica, o mesmo inibidor podendo atuar sobre um grande número de enzimas (ao contrário do que ocorre com os inibidores competitivos).

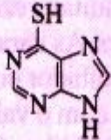
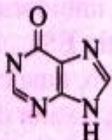
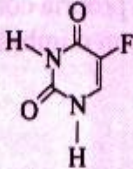
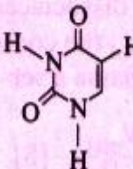
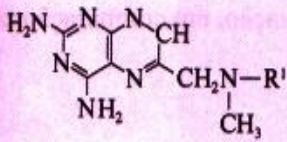
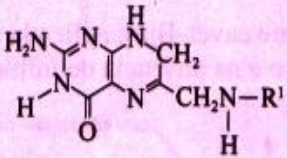
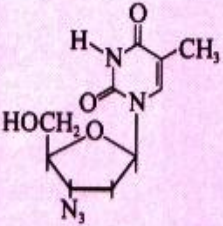
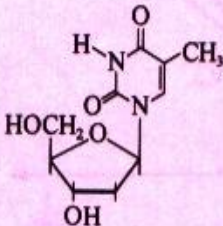
O fato de sua ligação à molécula de enzima ser reversível não diminui seu poder de ação. Esta ligação está sujeita a um equilíbrio do tipo:

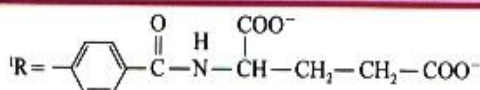


Vê-se, pelo equilíbrio, que, durante o tempo em que se processa a reação onde está presente o inibidor não-competitivo, um determinado percentual da enzima está ligado ao inibidor, e portanto ela está inativa. O que diferencia este tipo de inibidor dos inibidores irreversíveis é que, no caso destes últimos, uma molécula enzimática ligada ao inibidor está *definitivamente* inativada, ao passo que, no caso dos inibidores reversíveis não-competitivos, uma molécula de enzima, que em um instante está ligada ao inibidor (inativa), pode encontrar-se livre (ativa) em um momento seguinte.

Tudo se passa, portanto, como se efetivamente houvesse uma concentração menor de enzimas, e, uma vez que a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de enzimas ativas, a velocidade de reação será menor do que na ausência do inibidor para *qualquer* concentração de substrato; é claro que a

Quadro 5.9 Inibidores competitivos de algumas enzimas, seus substratos naturais e as moléstias em cujo tratamento são empregados

Inibidor	Substrato	Enzima	Moléstia
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Malonato</p> $\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Glutarato</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Succinato</p>	Succinato desidrogenase	—
$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_2\text{NH}_2$ <p>Sulfanilamida</p>	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}^-$ <p>p-Aminobenzoato</p>	Diidropteroato sintase	Infecções bacterianas
 <p>6-Mercaptopurina</p>	 <p>Hipoxantina</p>	Adenilossuccinato sintase	Leucemia
 <p>5-Fluorouracila</p>	 <p>Uracila</p>	Timidilato sintase	Tumores
 <p>Metotrexato</p>	 <p>Diidrofolato</p>	Diidrofolato redutase	Leucemia
 <p>AZT (3'-azido-2'-desoxitimidina)</p>	 <p>Desoxitimidina</p>	DNA polimerase viral	AIDS



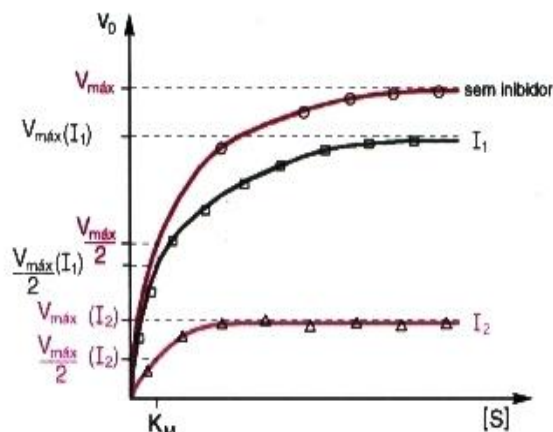


Fig. 5.16 Efeito de duas concentrações de inibidor não-competitivo (I_1 e I_2) sobre a velocidade da reação enzimática. O valor do K_M permanece inalterado, mas as velocidades máximas decrescem com o aumento da concentração do inibidor.

velocidade máxima da reação também será reduzida. Ainda mais, uma vez que o substrato e o inibidor não-competitivo não competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, aumentos na concentração do substrato *não* podem anular ou mesmo atenuar o efeito do inibidor. O inibidor não-competitivo pode muitas vezes ligar-se também ao complexo ES, formando um complexo ternário ESI_{NC} incapaz de gerar produto. As características descritas permitem prever, para o inibidor não-competitivo, uma cinética diferente da do inibidor competitivo (Fig. 5.16). Além disso, com inibidores não-competitivos, o valor do K_M aparente coincide com o valor do K_M . Isto porque as velocidades medidas resultam da ação de enzimas que não estão ligadas ao inibidor e, portanto, conservam exatamente a mesma afinidade pelo seu substrato (da qual o valor de K_M é uma medida).

No caso da inibição não-competitiva, a constante de dissociação do complexo EI e a própria concentração do inibidor interferem no valor de $V_{máx}$, e não no de K_M (ao contrário do que ocorre com o inibidor competitivo), e, neste caso, a equação de Michaelis-Menten passa a ser

$$v_0 = \frac{\frac{V_{máx}}{1 + \frac{[I_{NC}]}{K_{I_{NC}}}} [S]}{K_M + [S]}$$

A Fig. 5.17 apresenta a transformação de Lineweaver-Burk aplicada a esta equação, em comparação com a da cinética na presença de inibidor competitivo e na ausência de inibidores.

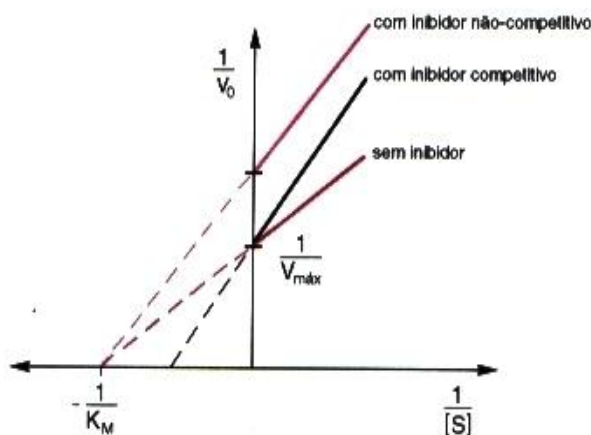
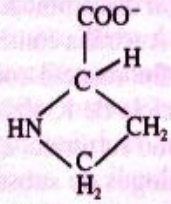
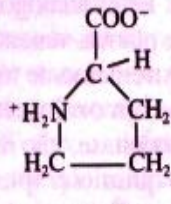
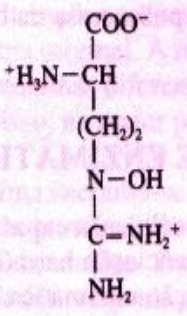
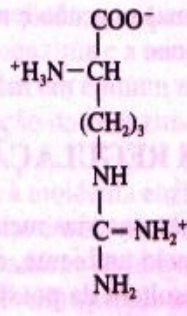
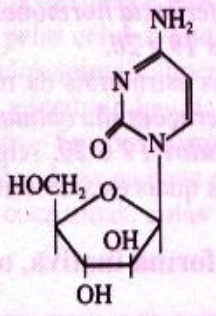
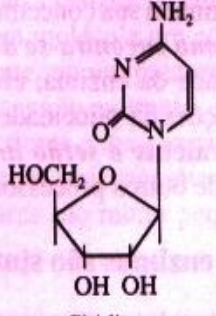
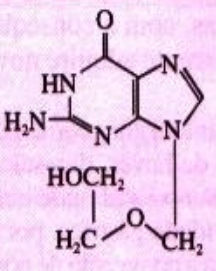
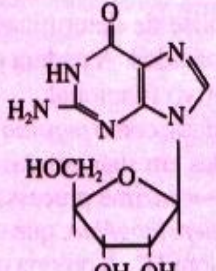


Fig. 5.17 Transformação de Lineweaver-Burk para a reação enzimática sem inibidor e em presença de inibidores competitivo e não-competitivo.

São exemplos de inibidores não-competitivos os metais pesados como Hg^{2+} , Pb^{2+} e Ag^+ , que reagem com os grupos SH das proteínas. Como já foi assinalado, a inibição não-competitiva, por ser pouco específica, tem amplo espectro de ação, e portanto a ingestão direta ou indireta (através de alimentos contaminados, derivados de animais ou vegetais) é extremamente tóxica. Muitos casos registrados de intoxicação por Hg^{2+} ocorrem em mineração de ouro, onde o mercúrio é usado em uma das etapas da extração do metal. Por outro lado, o despejo de resíduos deste processo em rios é uma fonte considerável de poluição ambiental.

Quadro 5.10 Antimetabólitos e os substratos que substituem

Antimetabólitos	Substratos
 <p>Azetidina 2-carboxilato</p>	 <p>Prolina</p>
 <p>Canavanina</p>	 <p>Arginina</p>
 <p>Citosina arabinosídeo</p>	 <p>Citidina</p>
 <p>Acicloguanosina</p>	 <p>Guanosina</p>

Análogos de substratos são “venenos” naturais ou medicamentos

Uma classe importante e extremamente variada de compostos tem sua ação relacionada à atividade enzimática. São os *antimetabólitos ou análogos de substratos*, que, como o nome indica, têm fórmula estrutural semelhante à de substratos naturais e, ao contrário dos inibidores competitivos, ligam-se ao centro ativo e geram produtos. Estes produtos são, é claro, diferentes do produto gerado pelo substrato e não prosseguem na seqüência metabólica normal, por não serem aceitos como substrato pela enzima seguinte, por serem instáveis ou por qualquer outro mecanismo. A via metabólica sobre a qual interferem fica, portanto, interrompida.

Muitos antimetabólitos são de ocorrência natural e constituem, muitas vezes, um mecanismo de defesa de vegetais contra a ingestão de suas folhas e sementes por insetos, pássaros e mamíferos. É comum em plantas a presença de análogos de aminoácidos. São conhecidos mais de 300 destes compostos, entre os quais alguns são aminoácidos não-proteicos (Cap. 2). Entre estes estão *azetidina 2-carboxilato* e *canavanina*, respectivamente análogos de prolina e arginina (Quadro 5.10). Estes análogos são incorporados no lugar dos aminoácidos “verdadeiros” e a proteína resultante é inativa. Certas plantas venenosas da África do Sul e da Austrália contêm *fluoroacetato*, um análogo de acetato. Este composto, extremamente tóxico, é transformado em fluoroacetil-coenzima A e substitui a acetil-coenzima A na condensação com oxaloacetato (primeira reação do ciclo de Krebs), originando fluorocitrato. A enzima seguinte do ciclo, a aconitase, não reconhece fluorocitrato como substrato, e o ciclo é interrompido.

Um número crescente de quimioterápicos é constituído por análogos de substratos, particularmente utilizados no tratamento de câncer. É o caso de *citossina arabinosídeo*, incorporado no DNA em lugar de citossina. A *acicloguanosina*, utilizada no tratamento do herpes, é incorporada pela DNA polimerase viral no DNA do vírus (no lugar de guanossina) mas não é reconhecida pela DNA polimerase da célula hospedeira, residindo nesta diferença a sua eficácia.

5.8 REGULAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A coordenação das numerosas vias metabólicas presentes nas células, a capacidade de responder adequadamente a mudanças no meio ambiente, o crescimento e a diferenciação harmônicos do organismo são alguns dos processos que resultam da possibilidade de regular a ação enzimática. Basicamente, existem dois mecanismos para a modulação da atividade enzimática:

1. Controle da disponibilidade de enzimas exercido sobre as velocidades de síntese e de degradação das enzimas, que determinam sua concentração celular. ***A interferência hormonal sobre o nível de enzimas-chave do metabolismo encontra-se descrita nos Capítulos 19 e 20.***
2. Controle da atividade da enzima, efetuado por mudanças estruturais da molécula enzimática e que redundam em alterações da velocidade de catálise. ***Estas alterações são obtidas por regulação alostérica e modificação covalente e serão analisadas nos Capítulos 19 e 20.*** Algumas enzimas tornam-se funcionais através de outros processos de ativação, um dos quais está descrito a seguir.

Algumas enzimas são sintetizadas em uma forma inativa, o zimogênio

Certas enzimas, cujo local de ação é extracelular (plasma, trato digestivo), são sintetizadas na forma de precursores inativos, chamados *zimogênios*. Para que um zimogênio adquira as propriedades de enzima, é necessário que haja hidrólise de determinadas ligações peptídicas, com a conseqüente remoção de um segmento da cadeia de aminoácidos. A cadeia polipeptídica remanescente adquire nova estrutura espacial, onde é organizado um centro ativo funcional.

Várias enzimas proteolíticas, como *pepsina* e *quimotripsina*, são sintetizadas como zimogênios e assim mantidas enquanto estão armazenadas em suas células de origem, sem risco de haver digestão das proteínas celulares. A transformação zimogênio → enzima processa-se fora destas células, no local onde a atividade digestiva deve ser exercida. Este é o caso de *pepsinogênio*, que origina pepsina na cavidade gástrica, por remoção de 42 resíduos de aminoácidos, sob a ação de íons H^+ . A própria pepsina formada catalisa a conversão de novas cadeias de pepsinogênio em pepsina. Analogamente, *tripsinogênio* e *quimotripsinogênio*, de origem pancreática, são transformados em tripsina e quimotripsina no intestino delgado, sob a ação de enzimas hidrolíticas específicas.

Cofatores são imprescindíveis para a atividade de inúmeras enzimas

Muitas enzimas necessitam da associação com outras moléculas ou íons para exercer seu papel catalítico. Esses componentes da reação enzimática são genericamente chamados *cofatores*. Os cofatores podem ser *íons metálicos* ou moléculas orgânicas, não-proteicas, de complexidade variada, que recebem o nome de *coenzimas*.

Os íons metálicos ligam-se a radicais de aminoácidos da cadeia proteica ou estão presentes em grupos prostéticos como o heme. Cumprem papel decisivo na catálise, participando efetivamente da reação química. Algumas enzimas aceitam vários íons metálicos bivalentes como ativadores, como Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+} , enquanto outras exigem um íon específico para a catálise. Este íon pode ser de Fe, Cu, Ni, Co, Zn, Se ou outros.

As coenzimas atuam como aceptores de átomos ou grupos funcionais retirados do substrato em uma dada reação e como doadores destes mesmos grupos ao participarem de uma outra reação e, por isto, diz-se que as coenzimas são transportadoras de determinados grupos (Quadro 5.11). Durante a catálise, coenzima e substrato acham-se alojados no centro ativo da enzima, consistindo a reação na remoção de determinado grupo químico do substrato e sua transferência para a coenzima, ou vice-versa. Vê-se, portanto, que as coenzimas não apenas sofrem modificações em sua estrutura ao participarem de uma reação enzimática, mas são necessárias em quantidades estequiométricas em relação ao substrato. Todavia, o fato de as coenzimas estarem sendo constantemente recicladas, oscilando entre duas formas, permite que suas concentrações celulares possam ser bastante reduzidas, muito menores do que as concentrações de substrato.

Nem sempre é imediata a diferença entre substrato e coenzima. No entanto, um critério diferencial é o fato de o substrato sofrer novas alterações nas reações metabólicas subsequentes, enquanto a coenzima, através de outra reação, volta à sua forma original. A reação que modifica a coenzima e a reação que restaura sua forma original são catalisadas por enzimas diferentes e específicas, que têm em comum apenas o fato de utilizarem a mesma coenzima. Além disso, na maior parte das reações, a ligação da coenzima à enzima precede a ligação do substrato à enzima.

Em alguns casos, a coenzima encontra-se covalentemente ligada à molécula enzimática, constituindo, portanto, um grupo prostético da proteína; em outros casos, a coenzima é uma molécula “livre”, reunindo-se à enzima apenas no momento da catálise. Duas coenzimas transportadoras de hidrogênio podem servir como exemplo das duas possibilidades: a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) aparece sempre como grupo prostético de enzimas, enquanto a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) é geralmente livre, podendo atuar como coenzima de uma série de enzimas.

A estrutura química das coenzimas é bastante variável. Algumas coenzimas, como o ATP e o GTP, são integralmente sintetizadas pelas células. Outras apresentam em sua molécula um componente orgânico que não pode ser sintetizado pelos animais superiores. Este componente, ou um precursor imediato, deve então ser obtido através da dieta, constituindo uma *vitamina*. As vitaminas são, portanto, compostos orgânicos indispensáveis ao crescimento e funções normais dos animais superiores e que, ao contrário de carboidratos, proteínas e lipídios, são necessários na dieta em pequenas quantidades (microgramas ou miligramas diários), já que são precursores de coenzimas, cujas concentrações celulares são muito pequenas. As necessidades

Quadro 5.11 Grupos transportados por coenzimas e vitaminas presentes em suas moléculas

Coenzima	Grupo transportado	Vitamina
Adenosina trifosfato (ATP)	Fosfato	—
Tiamina pirofosfato (TPP)	Aldeído	Tiamina (B_1)
Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)	Hidrogênio	Riboflavina (B_2)
Coenzima A	Acila	Ácido pantotênico (B_3)
Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+)	Hidreto	Nicotinamida (B_3)
Piridoxal-fosfato	Amino	Piridoxina (B_6)
Biotina	CO_2	Biotina (B_7)
Tetraidrofolato	Carbono	Ácido fólico (B_9)
Metilcobalamina	Metil	Cobalamina (B_{12})

vitamínicas diferem segundo as espécies. A *vitamina C* (*ácido ascórbico*), por exemplo, é necessária a poucos animais além dos primatas — a maioria é dotada de vias metabólicas capazes de levar à produção do ácido ascórbico, que, portanto, deixa de ser uma vitamina para estes animais. Além desta vitamina, o homem precisa de várias outras, sintetizadas por plantas ou microrganismos. Em um outro extremo, *Escherichia coli*, uma bactéria comum no trato intestinal humano, é capaz de multiplicar-se em uma solução contendo apenas uma fonte de carbono (glicose, por exemplo), uma fonte de nitrogênio (NH_4^+ , por exemplo) e alguns sais minerais; é, portanto, capaz de sintetizar todos os compostos necessários à sua manutenção e reprodução, inclusive aqueles que, para os animais superiores, constituem-se em vitaminas.

As vitaminas são classicamente divididas em *hidrossolúveis*, que incluem as vitaminas do complexo B (Quadro 5.11) — tiamina (vitamina B_1), riboflavina (B_2), ácido pantotênico (B_3), nicotinamida (B_3), piridoxina (B_6), biotina (B_7), ácido fólico (B_9), cobalamina (B_{12}) e o ácido ascórbico (C), e *lipossolúveis* — as vitaminas A, D, E e K. São as vitaminas hidrossolúveis as que têm função de coenzimas ou fazem parte de moléculas de coenzimas. A participação das vitaminas lipossolúveis nas reações metabólicas é muito menos conhecida.

A estrutura das vitaminas e a das coenzimas serão apresentadas ao longo do estudo do metabolismo, à medida que forem sendo descritas as reações das quais participam.

6

ESTRUTURA DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS

6.1 ESTRUTURA DE CARBOIDRATOS

Os *carboidratos* são compostos que, em geral, apresentam a fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$. São poliídroldeídos ou poliídrolxiconas, ou substâncias que, hidrolisadas, liberam estes compostos. Carboidratos com sabor doce, como sacarose, glicose e frutose, comuns na alimentação humana, são chamados *açúcares* (*sakcharon*, em grego).

O tipo mais simples de carboidrato é constituído pelos *monossacarídeos*, chamados *aldoses* ou *cetoses*, segundo o grupo funcional que apresentam, aldeído ou cetona. De acordo com seu número de átomos de carbono, são designados trioses, tetroses, pentoses, hexoses ou heptoses. Há duas trioses: o gliceraldeído, uma aldotriose, e a diidroxiacetona, uma cetotriose. O gliceraldeído apresenta um carbono (C_2) assimétrico, dando

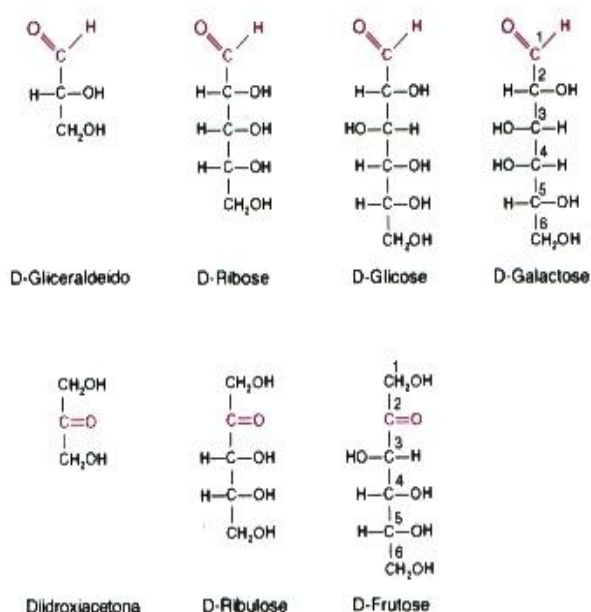


Fig. 6.1 Estrutura de alguns monossacarídeos.

origem a dois isômeros: D e L. Os outros monossacarídeos são teoricamente derivados destas duas trioses; os que são biologicamente importantes apresentam, sempre, configuração D, ou seja, têm a hidroxila do carbono assimétrico mais distante do carbono 1 em posição idêntica à do D-gliceraldeído. Alguns dos monossacarídeos mais comuns estão representados na Fig. 6.1.

Em soluções aquosas, os monossacarídeos com mais de quatro átomos de carbono formam estruturas cíclicas, em lugar das estruturas lineares representadas na Fig. 6.1. O anel é formado pela reação do grupo carbonila ($-C=O$) com uma hidroxila. Na verdade, aquelas representações lineares são apenas didáticas, porque as ligações entre os carbonos presentes na molécula não têm ângulos de 180° , mas muito menores. Como a molécula dos monossacarídeos apresenta várias hidroxilas, os “dobramentos” da cadeia linear fazem com que a reação de formação do anel se dê com a hidroxila que espacialmente esteja mais próxima do grupo carbonila. No caso da molécula de glicose, a ligação é feita com a hidroxila ligada ao carbono 5, ficando o carbono 6 excluído do anel. Na estrutura resultante, a hidroxila ligada ao carbono 1 pode ficar situada abaixo ou acima do plano do anel. As formas correspondentes são designadas α e β , respectivamente. Esta nomenclatura é também utilizada para a forma cíclica da frutose, referindo-se, entretanto, à configuração do carbono 2. As formas α , β e aberta mantêm-se em equilíbrio nas soluções, havendo grande predomínio das formas cíclicas sobre a forma aberta, que aparece em pequena proporção, menos do que 1% (Fig. 6.2).

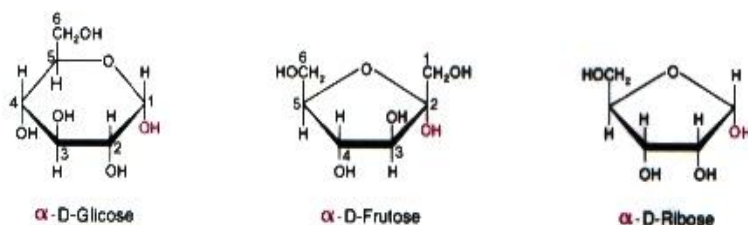
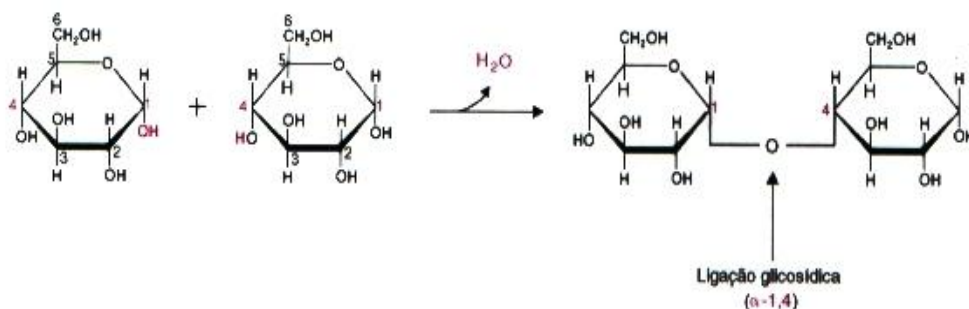


Fig. 6.2 Formas cíclicas de glicose, frutose e ribose.

Oligossacarídeos são carboidratos constituídos pela união de um pequeno número de monossacarídeos, através de ligações glicosídicas. Estas ligações são formadas entre duas hidroxilas, presentes em duas moléculas de monossacarídeos, pela exclusão de uma molécula de água.



Da mesma forma que a ligação peptídica não se forma diretamente entre dois aminoácidos, a ligação glicosídica não se forma diretamente entre dois monossacarídeos. A equação representada pelo esquema acima apenas resume um processo composto de várias reações. A ligação glicosídica formada no esquema é designada α -1,4 por ter sido estabelecida entre o carbono 1, com configuração α , e o carbono 4.

Entre os oligossacarídeos, os mais comuns são os *dissacarídeos*, que incluem a *sacarose*, formada por glicose e frutose, e a *lactose*, constituída de glicose e galactose (Fig. 6.3).

Polissacarídeos são polímeros constituídos de centenas ou milhares de resíduos de monossacarídeos, geralmente glicose, formando cadeias lineares, como na *celulose*, ou cadeias ramificadas, como no *glicogênio* e no *amido*. Na celulose, as unidades de glicose são unidas por ligações glicosídicas entre os carbonos 1 (com

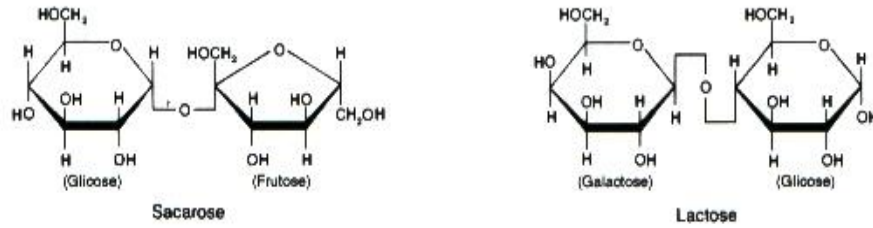


Fig. 6.3 Estrutura dos dois dissacarídeos mais comuns.

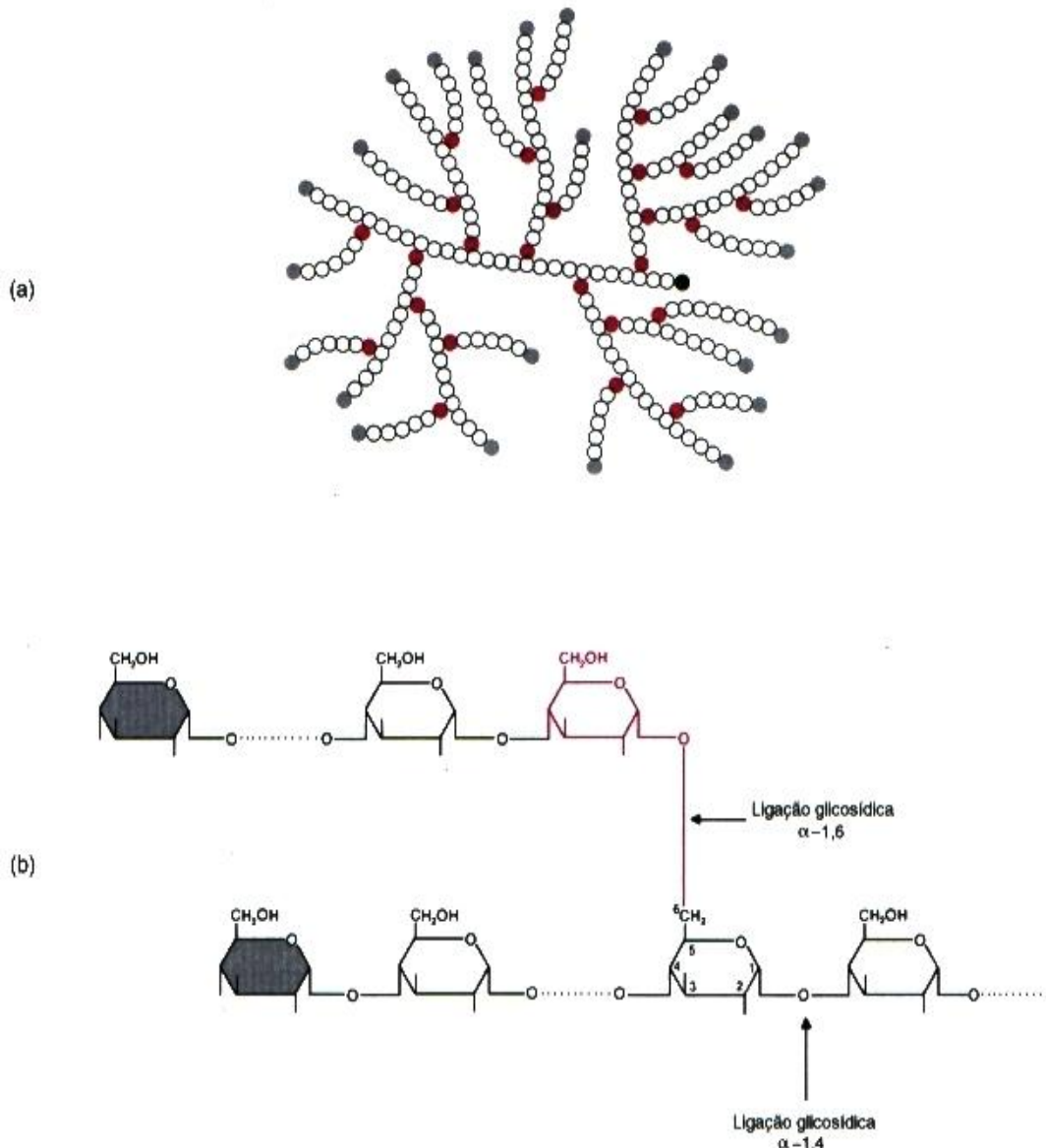


Fig. 6.4 Estrutura do glicogênio. a) Esquema mostrando sua estrutura ramificada: as ramificações ocorrem, em média, a cada 10 resíduos de glicose. b) Estrutura de parte da cadeia de glicogênio contendo uma ramificação, resultante da ocorrência de uma ligação α -1,6. Os resíduos das extremidades não-redutoras estão assinalados em cinza; aqueles que iniciam as ramificações, em vermelho, e o resíduo da única extremidade redutora, em preto. Figura a — “De Marks, D.B.: Biochemistry (Board Review Series), Harval Publishing, 1994. Reproduzida com permissão da Waverly International”.

configuração β) e 4: ligações β -1,4. As estruturas do glicogênio e do amido são semelhantes, variando apenas no número de ramificações da cadeia linear, muito mais frequentes no glicogênio.

O glicogênio é um polissacarídeo altamente ramificado (Fig. 6.4 a). Os resíduos de glicose são unidos por ligações glicosídicas entre os carbonos 1 e 4 (ligações α -1,4) nos segmentos lineares, e as ramificações são formadas por ligações entre os carbonos 1 e 6 (ligações α -1,6). O glicogênio apresenta uma extremidade chamada *redutora*, por ter o resíduo de glicose com o carbono 1 (do grupo aldeído, redutor) livre; as outras inúmeras extremidades são chamadas *não-redutoras*, porque têm resíduos de glicose com carbono 1 comprometido em ligações glicosídicas α -1,4 (Fig. 6.4 b). É a partir das extremidades não-redutoras que se dá o acréscimo ou a retirada de resíduos de glicose do polímero. Estas “moléculas” de glicogênio não têm, portanto, tamanho definido. O glicogênio é encontrado nas células como grânulos citossólicos complexos, porque associadas ao polímero encontram-se as enzimas que catalisam sua síntese e degradação e ainda algumas das enzimas que controlam estes processos.

Os carboidratos mais abundantes da dieta dos seres humanos são amido, sacarose, lactose e fibras não-digeríveis (celulose). Conseqüentemente, o principal produto da digestão é a glicose, secundada por pequenas quantidades de frutose e galactose. A celulose, que tem ligações β -1,4, não pode ser digerida pelo homem, que não sintetiza enzimas que hidrolisam esta ligação; as fibras são, portanto, excretadas pelas fezes.

As funções dos carboidratos são bastante diversificadas, incluindo a sustentação (celulose, nos vegetais) e a reserva (glicogênio nos animais, amido nos vegetais), além de poderem eles estar ligados a lipídios e proteínas, formando os glicolipídios e glicoproteínas, componentes de membranas.

6.2 ESTRUTURA DE LIPÍDIOS

Os lipídios constituem uma classe de compostos com estrutura bastante variada, caracterizados por sua baixa solubilidade em água. Exercem diversas funções biológicas, como componentes de membranas, isolantes térmicos e reservas de energia; eles próprios ou seus derivados têm também função de vitaminas e hormônios. Muitos lipídios são compostos *anfipáticos* (ou *anfifílicos*), ou seja, apresentam na molécula uma porção polar, hidrofílica, e uma porção apolar, hidrofóbica. Segue-se uma descrição sucinta das categorias principais de lipídios. Os lipídios menos abundantes, porém não menos importantes, serão descritos juntamente com a via metabólica da qual participam.

6.2.1 ÁCIDOS GRAXOS

Os *ácidos graxos* são ácidos carboxílicos com uma longa cadeia carbônica, geralmente com número par de átomos de carbono (entre 14 e 24), sem ramificações, podendo ser saturada ou conter uma ou mais insaturações. Os ácidos graxos mais comuns são os de 16 e 18 carbonos (Quadro 6.1). O grupo carboxila constitui a região polar, e a cadeia carbônica, a parte apolar (Fig. 6.5). Ácidos graxos livres são pouco encontrados nos organismos: mais frequentemente estão ligados a um álcool, que pode ser o glicerol ou a esfingosina. Os lipídios resultantes no primeiro caso são os triacilgliceróis e os glicerofosfolipídios; no segundo caso, são os esfingolipídios (Fig. 6.6). Os triacilgliceróis são uma forma de armazenamento de ácidos graxos; os glicerofosfolipídios e os esfingolipídios, juntamente com o colesterol, fazem parte das membranas celulares.

As propriedades físicas dos ácidos graxos e dos lipídios deles derivados dependem da ocorrência ou não de insaturações na cadeia de hidrocarboneto e do seu comprimento. As cadeias dos ácidos graxos saturados são flexíveis e distendidas, podendo associar-se extensamente umas com as outras através de interações hidrofóbicas. Os ácidos graxos insaturados naturais têm, quase sempre, duplas ligações com configuração geométrica *cis*, ou seja, os átomos de hidrogênio dispõem-se do mesmo lado da dupla ligação. A dupla ligação *cis* produz uma dobra rígida na cadeia, o que determina a formação de agregados menos compactos e, portanto, menos estáveis (Fig. 6.7). O comprimento da cadeia também interfere no grau de interação entre moléculas de ácidos graxos, que é tanto maior quanto mais longa for a cadeia. A variação na intensidade de associação entre as moléculas de ácidos graxos reflete-se no valor do seu ponto de fusão, já que a passagem do estado sólido para o líquido envolve a ruptura parcial de interações intermoleculares. Em resumo, a temperatura de fusão dos ácidos graxos diminui com o número de insaturações e aumenta com o comprimento da cadeia. Assim, *ácido esteárico* (saturado) e *ácido oleico* (uma insaturação), ambos com 18 carbonos, têm pontos de fusão muito diferentes: 69,6°C e 13,4°C,

Quadro 6.1 Ácidos graxos naturais mais comuns

Saturados	Número de átomos de carbono	
Mirístico	14	
Palmítico	16	
Esteárico	18	
Araquídico	20	
Lignocérico	24	
Insaturados	Insaturações	
Palmitoleico	16	Δ^9
Oleico	18	Δ^9
Linoleico	18	$\Delta^{9,12}$
α -Linolênico	18	$\Delta^{9,12,15}$
γ -Linolênico	18	$\Delta^{6,9,12}$
Araquidônico	20	$\Delta^{5,8,11,14}$

Os nomes triviais dos ácidos graxos são, tradicionalmente, indicados na forma ácida (não ionizada); todavia, deve-se lembrar que a carboxila dos ácidos graxos (pK_a 4-5) permanece desprotonada no pH fisiológico. Uma dupla ligação é representada pelo símbolo Δ , com um número sobrescrito, igual ao número do carbono, mais próximo da carboxila ($C=1$), que participa da ligação. Por exemplo, uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 é representada por Δ^9 . As duplas ligações, geralmente, são *cis*.

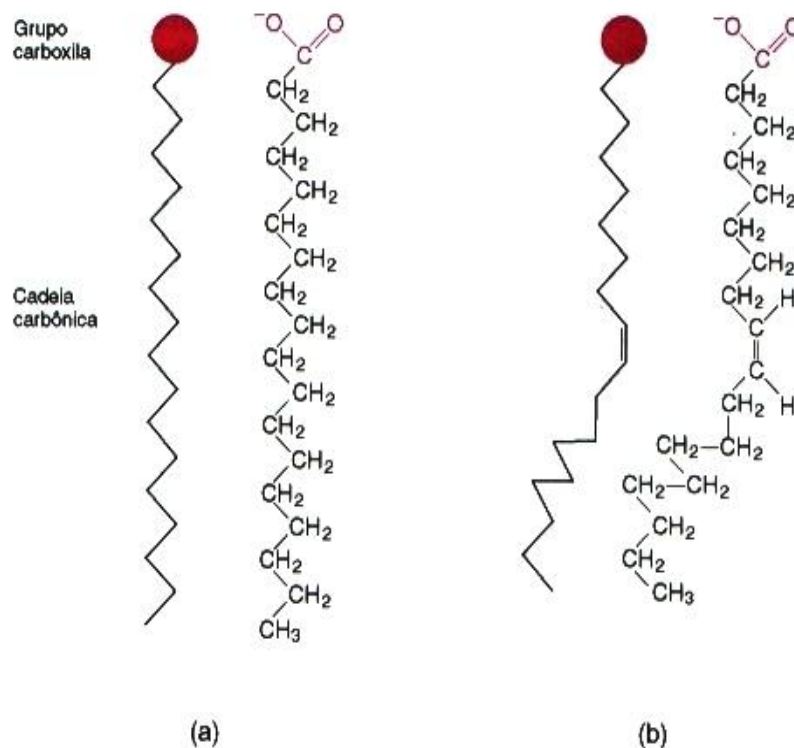


Fig. 6.5 Estrutura de dois ácidos graxos com 18 carbonos: ácido esteárico, saturado (a), e ácido oleico, insaturado (b). A presença da dupla ligação *cis* resulta em uma molécula curva e mais compacta. À esquerda das fórmulas estruturais, encontram-se modelos conformacionais, ilustrando a disposição em ziguezague da cadeia carbônica.

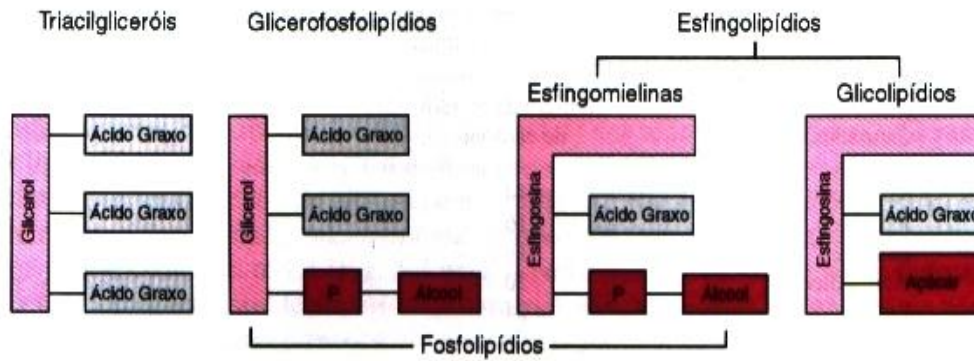


Fig. 6.6 Esquema geral dos principais lipídios que contêm ácidos graxos. P = grupo fosfato.

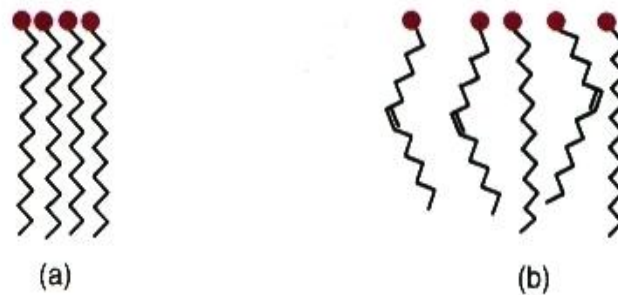


Fig. 6.7 Interação entre moléculas de ácidos graxos saturados (a) e entre saturados e insaturados (b). A presença de duplas ligações reduz o grau de interação entre moléculas vizinhas.

respectivamente. Por outro lado, o ponto de fusão do ácido esteárico é maior do que o ponto de fusão do *ácido palmítico* (63,1°C), que tem dois carbonos a menos. A consistência dos ácidos graxos (e seus derivados) à temperatura ambiente é uma consequência das suas propriedades: ácidos graxos saturados com mais de 14 carbonos são sólidos e, se possuírem pelo menos uma dupla ligação, são líquidos. Ainda mais, o grau de fluidez das membranas biológicas é determinado pelo tipo de ácido graxo presente nos seus lipídios estruturais.

6.2.2 TRIACILGLICERÓIS

Os lipídios derivados de ácidos graxos mais abundantes na natureza são os *triacilgliceróis*, constituídos por três moléculas de ácidos graxos esterificadas a uma molécula de glicerol (Fig. 6.8). Compostos contendo uma (*monoacilgliceróis*) ou duas (*diacilgliceróis*) moléculas de ácido graxo encontram-se em quantidades pequenas nas células, existindo como intermediários das vias de síntese e degradação de lipídios que contêm ácidos graxos e glicerol.

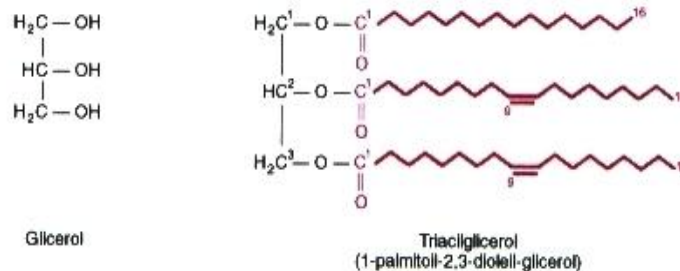


Fig. 6.8 Triacilgliceróis são moléculas essencialmente apolares, formadas pela esterificação de três ácidos graxos ao glicerol. Para maior clareza, foi omitida a forma angular das cadeias insaturadas.

Os triacilgliceróis são compostos essencialmente apolares, pois as regiões polares de seus precursores (hidroxilas do glicerol e carboxilas dos ácidos graxos) desaparecem na formação das ligações éster. Assim, constituem moléculas muito hidrofóbicas, que podem ser armazenadas nas células de forma praticamente anidra.

As *gorduras animais* e os *óleos vegetais* são misturas de triacilgliceróis, que diferem na sua composição em ácidos graxos e, conseqüentemente, no seu ponto de fusão. Os triacilgliceróis das gorduras animais são ricos em ácidos graxos saturados, o que atribui a esses lipídios uma consistência sólida à temperatura ambiente; os de origem vegetal, ricos em ácidos graxos insaturados, são líquidos. Os óleos vegetais são utilizados para a fabricação de margarinas, através de um processo de hidrogenação, que reduz parte de suas duplas ligações e os torna sólidos à temperatura ambiente. O valor nutricional de lipídios de origem animal ou vegetal será discutido no Capítulo 18.

Os triacilgliceróis podem ser hidrolisados, liberando ácidos graxos e glicerol. Se esta hidrólise é feita em meio alcalino, formam-se sais de ácidos graxos, os sabões, e o processo é chamado saponificação. Este é o princípio da fabricação de sabões a partir de gordura animal fervida em presença de NaOH ou KOH. Atualmente, os sabões vêm sendo substituídos por detergentes sintéticos (geralmente alquil benzeno sulfonatos) para a solubilização de materiais insolúveis em água, tanto na esfera doméstica como na industrial. O detergente SDS (p. 30) é largamente empregado em laboratórios de pesquisa, para a solubilização de proteínas e lipídios.

6.2.3 GLICEROFOSFOLIPÍDIOS

Os *glicerofosfolipídios* são derivados do glicerol que contêm fosfato na sua estrutura. O glicerofosfolipídio mais simples é o *ácido fosfatídico* (*fosfatidato* no pH fisiológico), composto por uma molécula de glicerol esterificada a dois ácidos graxos nos carbonos 1 e 2, e a ácido fosfórico no carbono 3. O fosfatidato, além de ser encontrado como um componente menor de membranas celulares, atua como intermediário da síntese de triacilgliceróis e dos outros glicerofosfolipídios. Os glicerofosfolipídios mais comuns originam-se da esterificação, ao ácido fosfórico do fosfatidato, de moléculas polares variáveis (representadas por X na Fig. 6.9). Os lipídios resultantes, portanto, diferem quanto aos substituintes do fosfatidato, dos quais derivam os seus nomes. Por exemplo, *colina* e *etanolamina* originam, respectivamente, *fosfatidilcolina* (também denominada *lecitina*) e *fosfatidiletanolamina* (ou *cefalina*); outros exemplos encontram-se na Fig. 6.9. Em alguns glicerofosfolipídios, o ácido fosfatídico está ligado a outro ácido fosfatídico através de uma molécula de glicerol; são chamados de *difosfatidilgliceróis* ou *cardiolipinas* (Fig. 6.9), por terem sido descobertos em músculo cardíaco. Os membros de cada uma dessas categorias de glicerofosfolipídios diferem entre si pelo tipo de ácido graxo que ocupa as posições 1 e 2. Geralmente, a posição 1 é ocupada por um ácido graxo saturado, e a posição 2, por um insaturado. A molécula dos glicerofosfolipídios contém, portanto, uma região polar, compreendida pelo grupo fosfato e seus substituintes, e uma parte apolar, devida às cadeias carbônicas dos ácidos graxos.

6.2.4 ESFINGOLIPÍDIOS

A estrutura geral dos *esfingolipídios* assemelha-se à dos glicerofosfolipídios (Fig. 6.6). Todavia, os esfingolipídios não contêm glicerol e seu esqueleto básico é formado por um aminoálcool contendo uma longa cadeia de hidrocarboneto, que, mais freqüentemente, é a *esfingosina*. O grupo amino da esfingosina liga-se a um ácido graxo através de uma ligação amídica, originando *ceramida*, precursora dos esfingolipídios. Estes lipídios formam-se por ligação de uma estrutura polar ao carbono 1 da ceramida, de acordo com a qual podem ser classificados em três tipos: esfingomielinas, cerebrosídeos e gangliosídeos (Fig. 6.10).

Nas *esfingomielinas*, descobertas a partir da bainha de mielina que envolve os axônios de células nervosas, a porção polar é uma *fosforilcolina*. A presença do grupo fosfato nas esfingomielinas permite classificá-las, juntamente com os glicerofosfolipídios, como *fosfolipídios*, que são os lipídios mais abundantes das membranas biológicas.

Nos *cerebrosídeos*, a ceramida liga-se a um açúcar, que pode ser glicose ou galactose. Os *gangliosídeos* são ainda mais complexos, por apresentarem uma região polar composta por oligossacarídeos, às vezes ramificados, com a inclusão de açúcares aminados nas extremidades. Os cerebrosídeos e os gangliosídeos são encontrados predominantemente no cérebro, ocorrendo em quantidades menores nos outros tecidos. São referidos, conjuntamente, como *glicolipídios*.

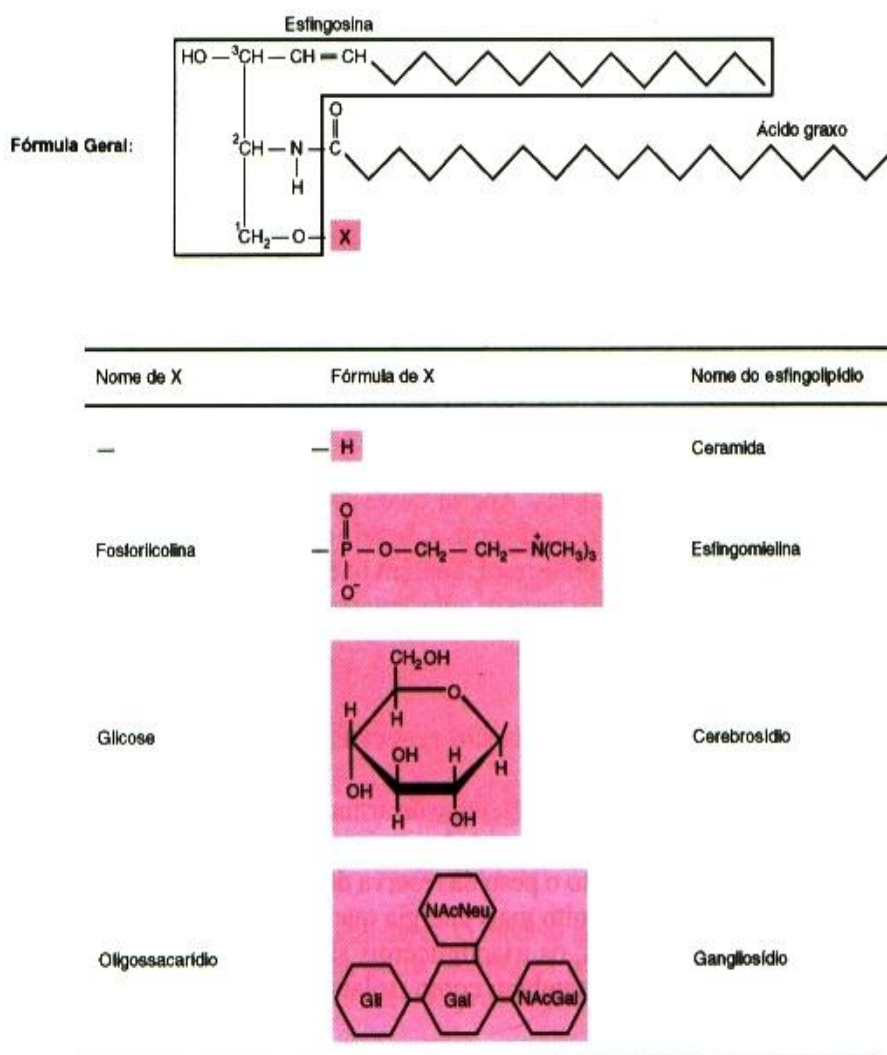


Fig. 6.10 Esfingolípídios. Os membros desta classe de lipídios diferem quanto ao grupo polar (simbolizado por X) ligado à ceramida; a porção apolar da molécula dos esfingolípídios é formada pelas cadeias carbônicas da esfingosina e do ácido graxo, os componentes da ceramida. Os monossacarídeos componentes da cadeia de oligossacarídeos dos gangliosídeos são: glicose (Gli), galactose (Gal), N-acetil-galactosamina (NAcGal) e ácido N-acetilneurâmico ou ácido siálico (NAcNeu).

A região apolar da molécula dos esfingolípídios é formada pelas cadeias carbônicas da esfingosina e do ácido graxo a ela ligado.

6.2.5 ESTERÓIDES

Os *esteróides* são lipídios que apresentam um núcleo tetracíclico característico em sua estrutura. O composto-chave deste grupo é o *colesterol* (Fig. 6.11), não apenas por ser o esteróide mais abundante dos tecidos animais, como por servir de precursor à síntese de todos os outros esteróides, que incluem *hormônios esteróidicos* (hormônios sexuais e do córtex adrenal), *sais biliares* e *vitamina D*. O colesterol tem, ainda, uma função estrutural importante nas membranas de células animais. Sua molécula exibe um caráter fracamente anfipático porque o grupo hidroxila é polar e o restante da molécula — os anéis esteróidicos e a cadeia lateral alifática — é apolar. Como o sistema de anéis compõe um plano rígido, o colesterol é, ainda, um determinante das características de fluidez das membranas celulares. O colesterol, no organismo humano, é transportado pelas lipoproteínas plasmáticas (ver adiante), predominantemente ligado a ácidos graxos — geralmente insaturados, como o ácido linoleico — formando os ésteres de colesterol; esta também é a forma de

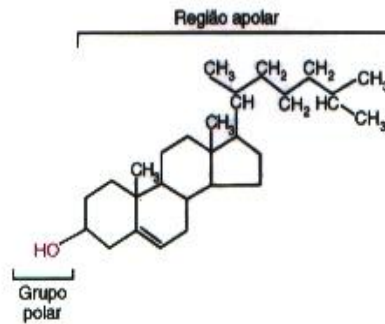


Fig. 6.11 Estrutura do colesterol. O grupo hidroxila — parte polar da molécula — pode ligar-se a um ácido graxo, formando um éster de colesterol, uma molécula mais apolar que o colesterol.

armazenamento de colesterol dentro das células. Apesar de desempenhar funções absolutamente essenciais, o colesterol é muito conhecido por sua associação com a *arteriosclerose* (p. 293).

Plantas, fungos e leveduras não contêm colesterol: contêm outros esteróides que diferem do colesterol na cadeia lateral. A grande maioria dos procariotos não apresentam esteróides.

6.2.6 FUNÇÕES DOS LIPÍDIOS MAIS COMUNS

Os triacilgliceróis são reservas de energia

Os triacilgliceróis constituem a maneira mais eficiente de armazenar energia nos seres vivos. O seu caráter fortemente hidrofóbico permite o armazenamento sob forma praticamente anidra, ou seja, sem moléculas de água adsorvidas, as quais aumentariam muito o peso da reserva de energia. Além disso, como são compostos altamente reduzidos, sua oxidação libera muito mais energia que a oxidação de quantidades equivalentes de carboidratos ou proteínas. Nos vertebrados, os triacilgliceróis são depositados no tecido adiposo, que tem localização visceral e subcutânea, atuando também como isolante térmico e como proteção contra traumas mecânicos.

Os lipídios anfipáticos são componentes estruturais de membranas

Ao contrário dos triacilgliceróis, todos os outros lipídios descritos são moléculas anfipáticas. Nos fosfolipídios — glicerosfosfolipídios e esfingomielinas — a porção hidrofílica é constituída pelo grupo fosfato, que apresenta carga negativa em pH fisiológico, ligado a uma outra molécula, também polar, que pode ter carga positiva (colina e etanolamina), carga positiva e negativa (serina) ou não apresentar carga (inositol) (Figs. 6.9 e 6.10). Os glicolipídios — cerebrosídeos e gangliosídeos — contêm açúcares hidrofílicos, que podem não apresentar carga (glicose e galactose) ou apresentar carga positiva devido à presença de grupos amino. A porção hidrofílica do colesterol é representada por uma hidroxila, e o restante da molécula é apolar. A região hidrofóbica dos demais lipídios anfílicos mencionados é representada pelas cadeias de hidrocarboneto da esfingosina e/ou dos ácidos graxos. Os lipídios anfipáticos são elementos estruturais importantes das membranas biológicas. A distribuição desses lipídios nos diferentes tipos de membranas celulares será analisada no próximo capítulo.

6.2.7 TRANSPORTE DE LIPÍDIOS: LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Os lipídios, insolúveis em meio aquoso, são transportados pelo sistema circulatório dos organismos pluricelulares em agregados moleculares hidrossolúveis. No homem, os lipídios apolares associam-se a lipídios anfipáticos e proteínas, formando as *lipoproteínas plasmáticas*. Os ácidos graxos são mobilizados ligados à albumina sérica; apenas uma fração pequena de ácidos graxos é transportada pelas lipoproteínas plasmáticas na forma de ésteres de colesterol. A associação a moléculas polares viabiliza a distribuição aos tecidos dos lipídios provenientes da dieta (absorvidos no intestino) e daqueles sintetizados endogenamente (sobretudo no fígado).

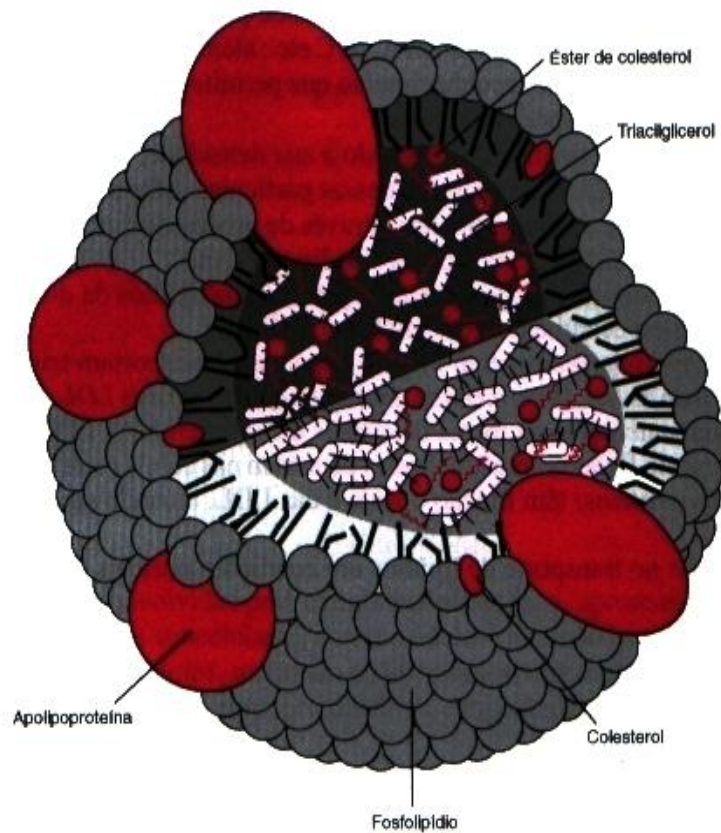


Fig. 6.12 Esquema geral das lipoproteínas plasmáticas. O modelo aplica-se a todas as classes de lipoproteínas, lembrando que elas diferem quanto à proporção entre os lipídios transportados (Quadro 6.2) e quanto ao tipo de apolipoproteína associada à monocamada periférica. Reproduzida de Devlin, T.M.: *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, Wiley-Liss Inc., 1992.

Quadro 6.2 Composição das principais lipoproteínas do plasma humano

Lipoproteína	Densidade (g.cm ⁻³)	Total de proteínas (%)	Total de lipídios (%)	% dos lipídios totais			
				Fosfo- lipídios	Coles- terol	Triacil- gliceróis	Ésteres de colesterol
Quilomícrons	0,90	2	98	8	2	87	4
VLDL	0,98	8	93	18	8	58	13
IDL	1,01	17	83	24	9	30	28
LDL	1,04	22	78	22	9	10	42
HDL	1,14	48	53	33	7	8	21

A composição das diferentes classes de lipoproteínas é variável, porque sofrem alterações metabólicas contínuas; os valores apresentados são a média entre os valores máximos e mínimos verificados em indivíduos normais. O diâmetro destas partículas decresce a partir de 10³ nm nos quilomícrons, até 10 nm nas HDL. As apolipoproteínas constituintes das diferentes lipoproteínas foram omitidas.

As lipoproteínas plasmáticas (Fig. 6.12) são **partículas esféricas** com um núcleo central de lipídios apolares — ésteres de colesterol e triacilgliceróis — **circundado por uma monocamada** de lipídios anfipáticos — fosfolipídios e colesterol — à qual estão associadas **moléculas de proteína**. Estas proteínas são denominadas conjuntamente de *apolipoproteínas* e classificadas em **A, B, C etc.**; além de contribuírem para a “solubilização” de lipídios no plasma, constituem sítios de **reconhecimento que permitem** a ligação das lipoproteínas a receptores da superfície celular de tecidos específicos.

As lipoproteínas plasmáticas são classificadas **segundo a sua densidade**, que é tanto menor quanto maior for o seu teor de lipídios (Quadro 6.2). A **composição dessas partículas** sofre modificações contínuas, devido à troca de moléculas de lipídios e de apolipoproteínas, **através de processos** ainda não totalmente elucidados. Segue-se um resumo das funções das principais classes de lipoproteínas.

Os *quilomícrons* são sintetizados na mucosa intestinal **a partir dos lipídios** da dieta, que, desta forma, são transportados aos tecidos; são especialmente ricos em **triacilgliceróis**.

As *VLDL* (*very low density lipoproteins*) têm origem **hepática e transportam** triacilgliceróis e colesterol para os outros tecidos; originam as *IDL* (*intermediate density lipoproteins*) e as *LDL* (*low density lipoproteins*), ricas em colesterol, predominantemente na forma de **ésteres de colesterol**. As LDL são a principal fonte de colesterol para os tecidos, exceto fígado e intestinos; elas **penetram nas células** através de endocitose (p. 109).

As *HDL* (*high density lipoproteins*) têm função oposta à das LDL, **atuando na remoção** de colesterol dos tecidos para o fígado.

A atuação das lipoproteínas no transporte de lipídios em condições normais e patológicas será abordada, ainda, em capítulos posteriores.

MEMBRANAS

As células, além de serem envolvidas pela membrana plasmática, apresentam sistemas internos de membranas, que delimitam organelas subcelulares, como o núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e vários tipos de vacúolos, incluindo os lisossomos. Organelas estão presentes nas células eucarióticas, constituintes dos animais, vegetais, protozoários, fungos e da maioria das algas; não são encontradas nas células procarióticas, como as bactérias.

A membrana plasmática é o elemento mediador da comunicação entre a célula e o seu meio externo. Constitui uma barreira altamente seletiva, que determina a criação de um compartimento interno com composição química própria, diferente do meio externo. Além disto, possibilita a captação de sinais extracelulares (hormônios, por exemplo), participando dos processos de reconhecimento e comunicação entre as células. Sua flexibilidade possibilita mudanças na forma da célula e, em alguns casos, sua locomoção.

A coordenação das reações metabólicas das células eucarióticas depende, em grande parte, da compartimentalização estabelecida pelas membranas intracelulares: isolamento de vias metabólicas, alterações localizadas de pH e da concentração de metabólitos etc. Constituem, ainda, um suporte para a disposição organizada de sistemas enzimáticos, aumentando muito a eficiência da catálise.

As membranas biológicas, apesar de desempenharem funções tão diversificadas, exibem características estruturais comuns.

7.1 INTERAÇÕES ENTRE LIPÍDIOS ANFIPÁTICOS: A BICAMADA LIPÍDICA

Os lipídios anfipáticos, quando são adicionados a um meio aquoso, tendem a agregar-se, organizando-se espontaneamente em estruturas plurimoleculares. Estas estruturas permitem maximizar as interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas, isolando-as da água, e deixar os grupos polares em contato com o solvente, com o qual podem interagir. Tais arranjos moleculares constituem o estado de menor energia livre para esses lipídios em água e resultam da presença de duas regiões com solubilidade diferente na mesma molécula. O tipo de estrutura formada é determinado pela geometria da molécula do lipídio anfipático (Fig. 7.1).

Lipídios com uma única cadeia carbônica, como sabões e detergentes, devido à forma cônica e afilada de suas moléculas, formam, preferencialmente, *micelas*. Nesta estrutura esférica, as cadeias de hidrocarboneto organizam-se no interior, isolando-se da água, e os grupos polares posicionam-se na superfície externa, interagindo com o solvente (Fig. 7.1a). A formação de micelas é uma etapa importante na digestão dos lipídios da dieta.

A maioria dos fosfo e glicolipídios formam, em vez de micela, uma camada dupla de moléculas, chamada *bicamada lipídica*. Esta estrutura permite uma agregação mais estável das moléculas destes lipídios, que têm

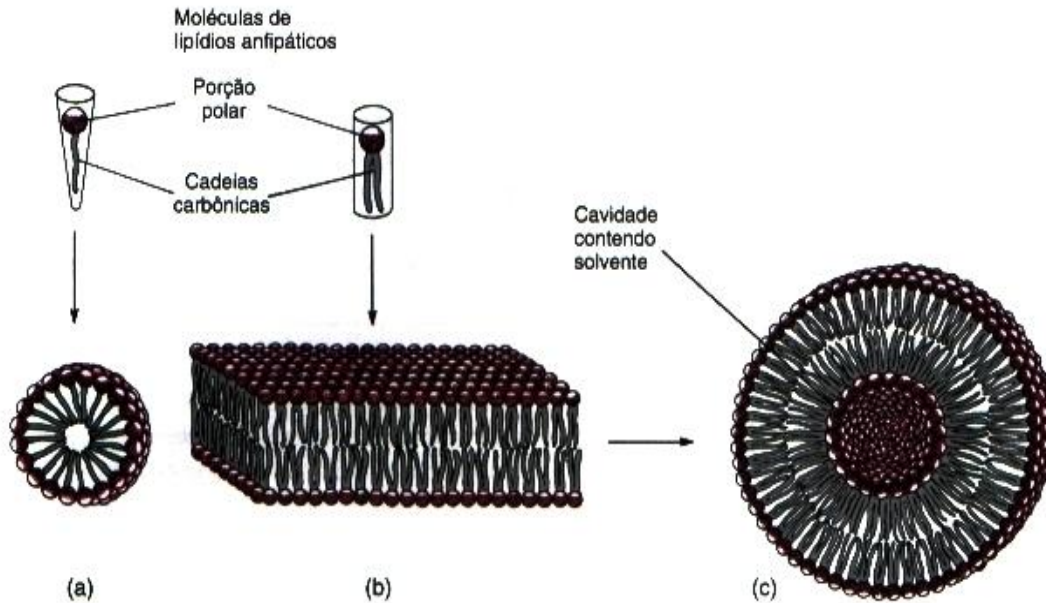


Fig. 7.1 Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso: micelas, bicamadas e lipossomos. Micelas (a) são formadas por moléculas de lipídios com uma única cadeia carbônica, cadeias estas que ficam isoladas no interior dessas estruturas. A bicamada lipídica (b) é uma estrutura bidimensional na qual as cadeias carbônicas formam um domínio central hidrofóbico, isolando-se da água, exceto nas extremidades da bicamada; é a estrutura comumente formada por lipídios anfipáticos com duas cadeias de hidrocarboneto. Lipossomo (c) é uma vesícula oca, dotada de uma cavidade central preenchida por solvente, resultante do fechamento de uma bicamada lipídica. De Albert L. Lehninger, David L. Nelson e Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry*, Second Edition. Worth Publishers, New York, 1993. Reproduzida com permissão.

uma forma cilíndrica, devido à presença de duas cadeias apolares. As moléculas de lipídios alinham-se lado a lado, formando duas monocamadas; as cadeias carbônicas das monocamadas agrupam-se frente a frente, de modo a formar um domínio hidrofóbico no meio da bicamada; os grupos hidrofílicos dispõem-se na superfície das duas faces da bicamada, interagindo com a água (Fig. 7.1b). O colesterol, por si só, não forma bicamadas lipídicas, mas pode se intercalar entre os lipídios anfipáticos que as constituem.

Bicamadas lipídicas tendem a se converter em vesículas esféricas contendo solvente no seu interior. Estas estruturas fechadas são mais estáveis porque não apresentam caudas hidrofóbicas expostas ao solvente, como acontece na periferia das bicamadas planas. Experimentalmente, demonstrou-se a formação dessas vesículas lipídicas, também chamadas de lipossomos. *Lipossomos* são, portanto, vesículas sintéticas formadas por uma bicamada lipídica contínua, que delimita uma cavidade interna preenchida por solvente (Fig. 7.1c). Eles podem ser formados de moléculas de um único tipo ou de diferentes tipos de lipídios anfipáticos. Os lipossomos têm sido largamente empregados como modelos para o estudo de bicamadas lipídicas e membranas.

A maioria dos compostos polares não atravessam a bicamada lipídica

Experiências com lipossomos demonstram que a bicamada lipídica permite a livre difusão de moléculas apolares, mas é essencialmente impermeável a compostos iônicos ou polares, insolúveis no interior hidrofóbico da bicamada. A água é uma exceção, podendo atravessar a bicamada com relativa facilidade.

A bicamada lipídica, portanto, isola o líquido contido no interior do lipossomo do líquido externo. Apesar disto, os mais diversos compostos, desde que estejam presentes no meio utilizado para a formação das vesículas, podem ser englobados no seu compartimento interno. Graças a esta propriedade, os lipossomos têm sido testados como uma via alternativa para a administração de medicamentos. Estas drogas são encapsuladas em lipossomos, que são transportados pela circulação até os tecidos; por fusão das vesículas com a membrana plasmática, as drogas são introduzidas diretamente nas células. Um maior conhecimento das peculiaridades

des de membranas de tecidos diferentes permitirá preparar lipossomos específicos para o tecido-alvo pretendido. Desta forma, a atuação inespecífica de muitos agentes farmacológicos poderá ser evitada, reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis.

A consistência da bicamada lipídica depende da temperatura e de sua composição

As bicamadas lipídicas sofrem uma mudança de estado físico em uma temperatura característica, chamada *temperatura de transição*, análoga ao ponto de fusão dos ácidos graxos. Essa mudança de fase é devida à alteração do grau de interação das cadeias de hidrocarboneto constituintes da bicamada. Abaixo da temperatura de transição, as cadeias são mais ordenadas e interagem fortemente, e a bicamada tem uma consistência sólida; acima dessa temperatura, elas são mais desordenadas e menos compactadas, o que determina um estado líquido.

A temperatura de transição de bicamadas é grandemente influenciada pela natureza dos lipídios anfipáticos que a compõem: é tanto maior quanto maior for o teor de ácidos graxos com cadeias longas e saturadas, o inverso acontecendo em relação a ácidos graxos com cadeias curtas e insaturadas (ver discussão sobre o estado físico dos ácidos graxos na p. 94).

7.2 ESTRUTURA DAS MEMBRANAS BIOLÓGICAS

As membranas biológicas são formadas por uma bicamada lipídica entremeada de proteínas

A bicamada lipídica é a estrutura básica comum a todas as membranas biológicas e, como nos lipossomos, serve como uma barreira impermeável à maioria dos íons e moléculas hidrossolúveis. Nas células, está associada a proteínas, que viabilizam o transporte de determinados solutos, ou seja, as membranas são permeáveis a compostos para os quais dispõem de transportadores específicos. As proteínas desempenham inúmeras outras funções características de cada membrana. Os glicolipídios e as glicoproteínas respondem pelo teor de carboidratos das membranas, que é, geralmente, baixo.

A composição de lipídios e proteínas varia conforme a membrana considerada. O conteúdo de lipídios das membranas de mamíferos depende do estado nutricional e da idade do animal; nas plantas, bactérias e animais poiquilotermos, varia com determinadas condições do meio ambiente, como luz e temperatura.

Os fosfolipídios são os componentes mais abundantes das membranas

comparação entre os lipídios anfipáticos que compõem a bicamada das membranas dos seres vivos permite algumas generalizações (Quadro 7.1).

Quadro 7.1 Composição em lipídios de diferentes membranas celulares

Membrana	% dos lipídios totais									
	F	FC	FE	FS	FI	FG	DFG	EM	GL	C
Plasmática ¹	1,0	18	11	9,0	4,0	—	—	14	7	30
Mitocondrial interna ¹	0,7	45	25	1,0	6,0	2,0	18	2,5	—	3,0
Mitocondrial externa ¹	1,3	50	23	2,0	13	2,5	3,5	5,0	—	5,0
Nuclear ¹	1,0	55	20	3,0	7,0	—	—	3,0	—	10
Golgi ¹	—	40	15	3,5	6,0	—	—	10	—	7,5
Bainha de mielina ²	—	11	14	7,0	—	—	—	6,0	21	22
<i>Escherichia coli</i> ³	—	—	80	—	—	15	5,0	—	—	—
<i>Bacillus megaterium</i> ³	—	—	69	—	—	30	1,0	—	—	—

F = fosfatidato; FC = fosfatidilcolina; FE = fosfatidiletanolamina; FS = fosfatidilserina; FI = fosfatidilinositol; FG = fosfatidilglicerol; DFG = difosfatidilglicerol (cardiolipina); EM = esfingomielina; GL = glicolipídios (cerebrosídeos e gangliosídeos); C = colesterol.

¹Membranas de hepatócitos de rato; ²Cérebro de rato; ³Membrana plasmática.

Nos organismos superiores, as membranas celulares são construídas, basicamente, com fosfolipídios, ou seja, glicerofosfolipídios e esfingomielinas. Os glicerofosfolipídios estão presentes em quantidades muito maiores que as esfingomielinas, sendo fosfatidilcolina o lipídio mais abundante. Além dos fosfolipídios, o colesterol é um componente importante das membranas eucarióticas; nas membranas plasmáticas é a molécula de lipídio presente na maior concentração, sendo encontrado em pequenas quantidades nas membranas intracelulares. As membranas mitocondriais, especialmente as internas, distinguem-se das demais e assemelham-se à membrana plasmática das bactérias, por apresentarem difosfatidilglicerol (cardiolipina). A bainha de mielina, que deu o nome às esfingomielinas, é, na realidade, muito rica em glicolipídios e colesterol. Os glicolipídios também ocorrem na face externa das membranas plasmáticas.

As membranas de bactérias caracterizam-se pela presença de alguns poucos tipos de glicerofosfolipídios, predominando fosfatidiletanolamina; colesterol e esfingolipídios (esfingomielinas e glicolipídios) são virtualmente ausentes.

As membranas biológicas são fluidas

A consistência das membranas celulares, como acontece com as bicamadas lipídicas sintéticas, varia com o comprimento e o grau de insaturação das cadeias carbônicas dos seus lipídios estruturais e, também, com a temperatura. Seres vivos cuja temperatura flutua com a do meio ambiente — como plantas, bactérias e animais poiquilotermos — modificam a composição em ácidos graxos de suas membranas em resposta a alterações da temperatura ambiente, de modo que a sua fluidez seja sempre constante. A temperatura corpórea dos animais homeotermos é sempre maior que a temperatura de transição de suas membranas, ou seja, as membranas dos mamíferos são líquidas a 37°C. Em resumo, as membranas dos seres vivos, em condições fisiológicas, são, invariavelmente, fluidas, com consistência semelhante à da parafina líquida.

O colesterol, nos eucariotos, constitui um fator adicional de regulação da fluidez das membranas, devido a dois efeitos opostos. Suas moléculas intercalam-se na bicamada lipídica, a hidroxila interagindo com os grupos polares dos fosfolipídios e os anéis esteróidicos com as cadeias carbônicas. Como a molécula de colesterol não alcança o centro da bicamada, a interação com as cadeias de hidrocarboneto e a sua imobilização parcial dá-se apenas na região mais próxima dos grupos polares. O resultado é um aumento de rigidez na porção periférica da membrana. Por outro lado, quando está presente em concentrações relativamente altas, como acontece nas membranas plasmáticas, o colesterol impede que as cadeias carbônicas interajam fortemente — o que resultaria em um estado gelatinoso — e contribui, assim, para o aumento da fluidez da membrana.

Diversas condições patológicas parecem estar relacionadas com alterações da fluidez de membranas. No alcoolismo crônico, há um aumento do teor de colesterol da membrana plasmática das hemácias, levando a um aumento da viscosidade da membrana. Estas células adquirem uma forma anormal, o que dificulta sua passagem por capilares menores e ocasiona sua destruição pelo baço prematuramente, resultando em um estado anêmico. Além disso, o álcool e determinados agentes farmacológicos, como os anestésicos, parecem atuar diretamente sobre as membranas do sistema nervoso central, alterando o seu estado físico. Os anestésicos, *in vitro*, efetivamente aumentam a fluidez de membranas.

As duas monocamadas de uma membrana contêm lipídios diferentes

A estrutura líquida das membranas naturais permite que as moléculas de lipídios possam mover-se lateralmente, dentro da monocamada da qual fazem parte. Esta difusão é tão rápida que uma molécula de lipídio poderia dar a volta ao redor de uma bactéria (perímetro de 1 a 2 μm) em cerca de 1 segundo. Por outro lado, a migração de lipídios de uma monocamada para a outra é extremamente rara, porque exige que a porção polar da molécula deixe de interagir favoravelmente com a água e atravesse o centro hidrofóbico da bicamada, um processo muito endergônico. O resultado desta impossibilidade é uma distribuição assimétrica de lipídios, ou seja, as duas monocamadas são constituídas por lipídios diferentes. A assimetria é gerada durante a síntese da membrana. As membranas plasmáticas de células animais são especialmente assimétricas: os glicolipídios, por exemplo, localizam-se apenas na monocamada externa.

O grau de interação de proteínas com a bicamada lipídica é variável

Enquanto os lipídios presentes nas membranas biológicas são os principais responsáveis pela sua estrutura e fluidez, as proteínas são responsáveis pelas funções específicas associadas a cada tipo de membrana. Sua proporção em relação aos lipídios varia, sendo excepcionalmente grande em membranas com alto conteúdo de enzimas e permeases, como a membrana interna da mitocôndria.

As proteínas dispõem-se na bicamada lipídica de acordo com o modelo do *mosaico fluido* (Fig. 7.2), proposto por Singer e Nicholson, no qual os componentes interagem através de ligações não-covalentes e podem difundir-se lateralmente em um meio de consistência líquida.

Muitas proteínas de membrana estão imersas na bicamada lipídica, associando-se fortemente com as cadeias apolares dos lipídios, através de interações hidrofóbicas. Estas proteínas, chamadas *integradas*, são extraídas somente após ruptura da membrana, por exemplo, com tratamento com detergentes ou solventes orgânicos; ainda assim, são obtidas com moléculas de lipídios aderidas e são insolúveis em água.

A maioria das proteínas integradas estendem-se transversalmente através da membrana graças à sua natureza anfipática: apresentam um domínio rico em aminoácidos apolares, que se situa entre dois domínios diferentes, ambos com predominância de aminoácidos polares. O domínio central interage com o interior hidrofóbico da bicamada e os outros dois ficam expostos, interagindo com a água nos dois lados da membrana. O domínio que atravessa a membrana tem, frequentemente, estrutura em α -hélice. Outras proteínas integradas, além do domínio hidrofóbico, têm apenas um domínio hidrofílico exposto em uma das superfícies da membrana. As proteínas transportadoras de elétrons da membrana interna da mitocôndria — com exceção do *citocromo c* — são exemplos de proteínas integradas.

Uma segunda classe de proteínas, denominadas *periféricas*, ligam-se à superfície da membrana por pontes de hidrogênio ou interações iônicas, estabelecidas com grupamentos polares dos lipídios anfipáticos da bicamada. Estas ligações podem ser rompidas por procedimentos que não perturbam significativamente a estrutura da membrana, como o tratamento com uréia ou soluções salinas de alta concentração. Após extração, as proteínas periféricas são solúveis em água, e o exemplo clássico é o citocromo *c*. Algumas proteínas periféricas associam-se, ainda, a regiões de proteínas integradas expostas em uma das faces da

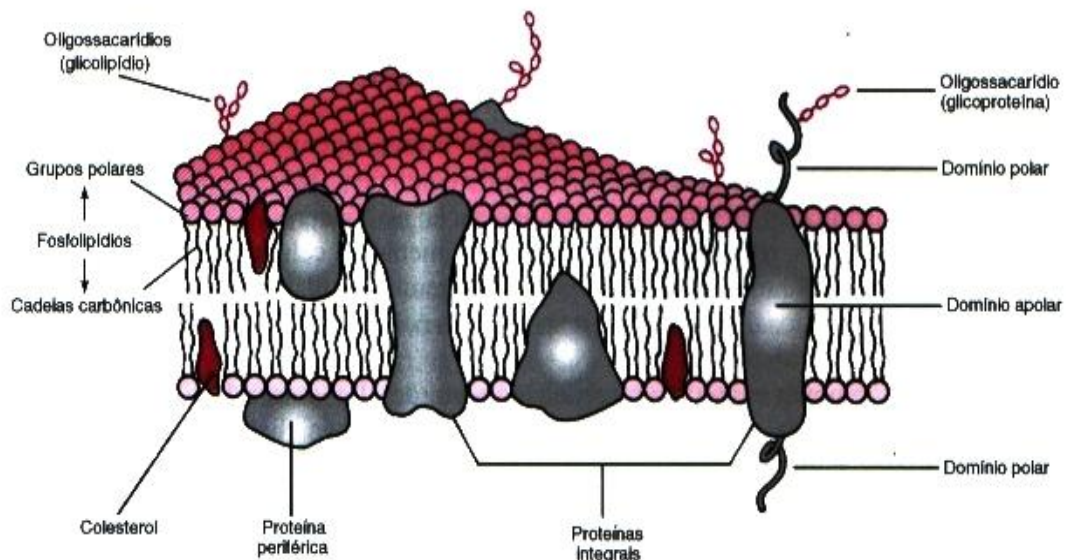


Fig. 7.2 Esquema de um fragmento de uma membrana plasmática hipotética em um determinado instante. A proporção entre o tamanho das moléculas não é a verdadeira. Para simplificar o esquema, todas as cadeias carbônicas dos fosfolípidios foram representadas como saturadas, o que não acontece (sobre a forma de cadeias carbônicas de lipídios, ver Figs. 6.5 e 6.7). Os oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolípídios projetam-se para o exterior da célula. Reproduzida com modificações de Albert L. Lehninger, David L. Nelson e Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry*, Second Edition. Worth Publishers, New York, 1993.

membrana; outras ligam-se a determinadas moléculas de lipídios da bicamada, que atuam como verdadeiras âncoras.

A extensão da cadeia polipeptídica que fica incluída na bicamada ou projetada para fora está intimamente relacionada com a função da proteína. Assim, proteínas que atuam como receptores de moléculas extracelulares ou antígenos de superfície têm uma porção externa muito maior que o segmento intramembrana. Em outros casos, a cadeia polipeptídica pode atravessar várias vezes a bicamada lipídica, formando α -hélices hidrofóbicas, que se organizam delimitando um canal. Este é o tipo de organização de determinadas permeases, responsáveis pelo transporte de metabólitos através de membranas.

Qualquer que seja o grau de associação com a matriz lipídica, as proteínas de membrana podem difundir-se apenas lateralmente, não passando de uma monocamada para a outra, ou seja, a membrana apresenta uma distribuição assimétrica de proteínas, como acontece com os fosfolipídios. As glicoproteínas são um exemplo de proteínas com localização restrita a uma face da membrana (seção 7.3). A movimentação lateral de proteínas, em algumas circunstâncias, pode ser restringida. Nas células de eucariotos, por exemplo, o citoplasma contém um citoesqueleto — formado por microfilamentos, semelhantes aos filamentos de actina das fibras musculares — e microtúbulos que interagem com a membrana plasmática, reduzindo a mobilidade de proteínas integradas.

As membranas biológicas, graças a sua fluidez, podem fundir-se umas com as outras em diversos processos importantes, como a divisão celular, a fusão do espermatozóide com o óvulo e a formação de vesículas de exo ou endocitose.

7.3 GLICOPROTEÍNAS E GLICOLIPÍDIOS DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Os carboidratos presentes nas membranas de células eucarióticas ocorrem como cadeias de oligossacarídeos ligados covalentemente a proteínas — *glicoproteínas* — e a lipídios — *glicolipídios*. Estas cadeias são muito hidrofílicas e projetam-se para o lado externo da membrana plasmática ou para o interior de organelas, como o retículo endoplasmático e o aparelho de Golgi. Sua estrutura é muito variada, podendo conter dezenas de resíduos de açúcares, organizados em cadeias ramificadas. A grande diversidade de configuração dos oligossacarídeos justifica sua atuação como marcadores característicos de cada tipo de célula. São os mediadores da comunicação entre as células, sendo reconhecidos por proteínas que se ligam especificamente a carboidratos em inúmeros processos importantes, resumidos a seguir.

O óvulo de mamíferos contém uma glicoproteína de superfície, cuja porção carboidrato é reconhecida apenas por espermatozoides da mesma espécie.

O reconhecimento entre células ocorre, ainda, durante o crescimento e a diferenciação dos tecidos (morfogênese). Alterações nos marcadores de superfície provocam distúrbios na adesão das células, podendo estar relacionados com a formação de tumores e a malignização no câncer.

Os determinantes antigênicos, responsáveis pelo reconhecimento de células pelo sistema imunitário, são carboidratos complexos de glicoproteínas e glicolipídios da membrana plasmática. Este é o caso do sistema ABO dos grupos sanguíneos e dos determinantes responsáveis pela rejeição de órgãos e tecidos transplantados.

Processos patológicos também envolvem o reconhecimento de oligossacarídeos sinalizadores: proteínas de agentes infecciosos, como vírus e bactérias, ligam-se a carboidratos de glicoproteínas ou glicolipídios específicos da superfície das células hospedeiras. Exemplos bem conhecidos desses processos são a ligação do vírus da gripe e da toxina da cólera às células humanas.

Os receptores de hormônios (Capítulo 19) também são glicoproteínas da membrana plasmática.

A “idade” das proteínas plasmáticas é indicada pela ausência de determinados açúcares na sua porção carboidrato. Proteínas contendo esta marca são removidas do sangue e degradadas nos lisossomos dos hepatócitos; um mecanismo semelhante é utilizado para a retirada de hemácias velhas da circulação de mamíferos.

A ligação de um determinado oligossacarídeo a uma proteína recém-sintetizada define qual será o seu destino: uma organela intracelular, a membrana plasmática ou a exportação para fora da célula.

7.4 TRANSPORTE ATRAVÉS DE MEMBRANAS

7.4.1 TRANSPORTE DE ÍONS E MOLÉCULAS PEQUENAS

As membranas biológicas são permeáveis apenas a moléculas solúveis em lipídios, por exemplo, ácidos graxos e esteróides, ou a moléculas pequenas como as dos gases oxigênio, CO₂ e nitrogênio.

A maioria das moléculas solúveis em água não podem atravessar as membranas por simples difusão, devido ao caráter hidrofóbico da bicamada lipídica. Apesar disto, íons (H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻) e metabólitos polares (piruvato, açúcares, nucleotídeos, aminoácidos) estão em fluxo constante através de membranas, graças a sistemas de transporte que contornam a sua impermeabilidade. Estes sistemas são formados por proteínas integradas das membranas celulares. Muitas destas proteínas transportadoras apresentam subunidades ou domínios com estrutura em α -hélice ou folha β pregueada, que se organizam de modo a formar um canal, que é preenchido por água, possibilitando a livre passagem de determinados íons ou moléculas polares. Em alguns casos, a proteína que forma o canal não se liga aos compostos transferidos. Outras proteínas transportadoras, denominadas *permeases* ou *translocases*, são capazes de ligar-se reversivelmente a um composto específico de um lado da membrana e transportá-lo para o outro. O transporte por permeases obedece a uma cinética semelhante à descrita por Michaelis-Menten para a reação enzimática: a velocidade do transporte aumenta com a concentração do metabólito até atingir uma velocidade máxima, por saturação da permease. Da mesma forma que as enzimas, as translocases são inibidas competitivamente por análogos estruturais do metabólito que transportam e não competitivamente por reagentes que se ligam a grupos essenciais da proteína transportadora. Muitas permeases são *cotransportadoras*, ou seja, o transporte de uma molécula depende da transferência simultânea de outra molécula, no mesmo sentido (*simporte*) ou no sentido oposto (*antiporte*). Outras translocases transportam apenas um composto: são *uniportadoras*.

O transporte de compostos mediado por translocases pode ser feito a favor ou contra um gradiente de concentração. No primeiro caso, quando o composto passa de um compartimento, onde a sua concentração é maior, para outro, onde ela é menor, é chamado de *transporte facilitado* ou *passivo*. Quando o transporte ocorre contra um gradiente de concentração, ele requer fornecimento de energia e é dito *transporte ativo*. Esta energia pode ser suprida diretamente pela hidrólise de ATP ou pelo gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons acoplado à cadeia de transporte de elétrons. Exemplos de permeases serão apresentados no estudo do transporte de metabólitos através da membrana interna da mitocôndria (p. 156).

7.4.2 TRANSPORTE DE MACROMOLÉCULAS E PARTÍCULAS: ENDOCITOSE E EXOCITOSE

O transporte de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos etc.) e partículas através das membranas celulares não é feito por permeases devido ao seu tamanho; esses componentes são englobados em vesículas delimitadas por membranas, que podem ser internalizadas ou exteriorizadas em processos denominados de *endocitose* e *exocitose*, respectivamente. A exocitose ocorre por fusão de vesículas intracelulares com a membrana plasmática; na endocitose, formam-se vesículas a partir de segmentos da membrana plasmática que sofrem invaginação, englobando parte do fluido extracelular, juntamente com os solutos nele presentes.

Um tipo especial de endocitose, a *endocitose adsortiva* ou *endocitose mediada pelo receptor*, é altamente seletiva, porque requer a ligação da molécula (ou partícula) a ser internalizada a receptores específicos da membrana plasmática. A endocitose adsortiva ocorre em eucariotos, sendo utilizada, por exemplo, para o fornecimento de colesterol para as células. O colesterol, necessário para a síntese de membranas e de vários compostos importantes desses organismos, é transportado no interior das LDL, na forma esterificada.

O transporte por endocitose (Fig. 7.3) inicia-se com a adsorção das LDL às células, através da ligação de suas apoproteínas a receptores específicos, presentes na superfície externa da membrana plasmática. Os complexos receptor-LDL localizam-se em depressões da membrana plasmática que apresentam, na face em contato com o citoplasma, uma rede formada por uma proteína fibrosa: a *clatrina*. Estas depressões, chamadas *depressões revestidas*, são a seguir invaginadas, desprendendo-se da membrana e originando, no citoplasma, as *vesículas revestidas*. O revestimento formado pela clatrina é flexível, facilitando o brotamento da vesícula a partir da membrana plasmática. Após perderem esse revestimento, as vesículas fundem-se com organelas chamadas *endossomos*, cujo pH ácido induz a dissociação das LDL de seus receptores. Estes e as LDL concentram-se em regiões distintas do endossomo, que se organiza em duas vesículas com destinos diferentes.

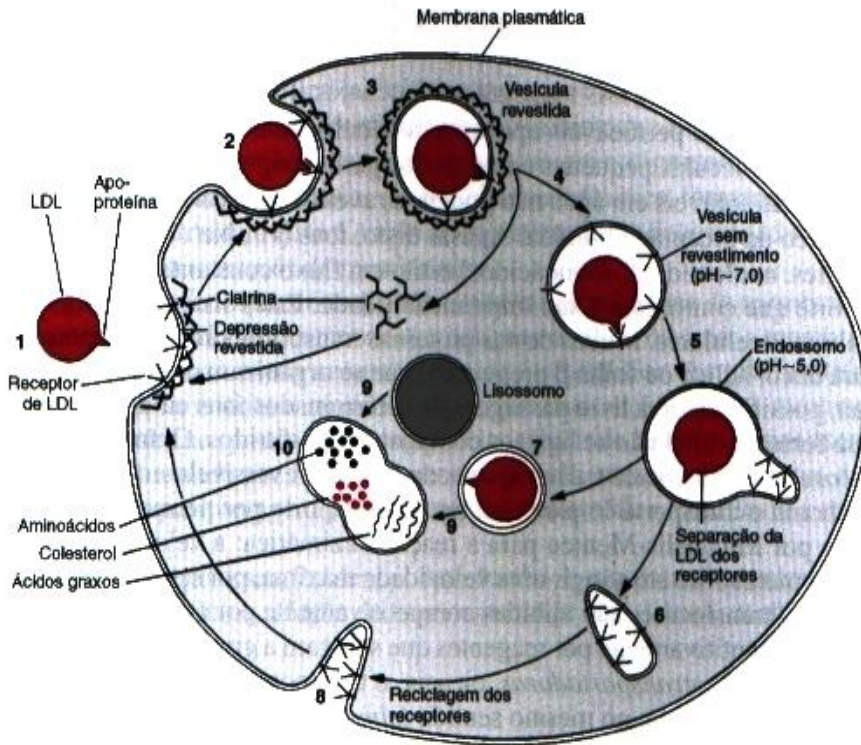


Fig. 7.3 Transporte de colesterol das LDL plasmáticas para dentro da célula através de endocitose adsorptiva. As LDL ligam-se, através de suas apolipoproteínas, a receptores da membrana plasmática, em depressões revestidas (1). Por invaginação (2), a depressão forma uma vesícula revestida (3) que, em seguida, perde o invólucro de clatrina (4). A vesícula resultante funde-se com um endossomo (5), cujo pH ácido determina a dissociação entre as LDL e seus receptores. Estes e as LDL concentram-se em regiões distintas do endossomo, que se divide em duas partes: uma estrutura alongada contendo os receptores (6) e uma vesícula contendo as LDL (7). A estrutura com os receptores vazios funde-se com a membrana plasmática, reciclando os receptores para novos ciclos de endocitose (8). A vesícula contendo as LDL funde-se com um lisossomo (9), cujas hidrolases liberam aminoácidos a partir das apoproteínas, e ácidos graxos e colesterol, a partir dos ésteres de colesterol (10). Reproduzida de Voet, D. e Voet, J., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.

Aquela que contém as LDL funde-se com um lisossomo, onde seus componentes são hidrolisados: as apoproteínas originam aminoácidos, e os ésteres de colesterol, ácidos graxos e colesterol, que pode, então, ser utilizado pela célula. Os receptores de LDL são reciclados por fusão da vesícula onde eles se localizam com a membrana plasmática; podem, assim, participar de um novo ciclo de endocitose.

Há casos excepcionais em que macromoléculas penetram nas células, por mecanismos ainda pouco conhecidos, como acontece com o DNA na transformação genética.

8

INTRODUÇÃO AO METABOLISMO

Os organismos dependem do meio ambiente para obter energia e moléculas precursoras

Para manterem-se vivos e desempenharem diversas funções biológicas, os organismos necessitam continuamente de energia. De fato, qualquer organismo vivo constitui, no seu conjunto, um sistema estável de reações químicas e de processos físico-químicos mantidos afastados do equilíbrio; a manutenção deste estado contraria a tendência termodinâmica natural de atingir o equilíbrio e só pode ser conseguida à custa de energia, retirada do meio ambiente. Como, por outro lado, os organismos perdem energia para o meio ambiente, sua estabilidade deve ser vista como um processo dinâmico, o chamado “*steady-state*”, que, *grosso modo*, assemelha-se a um reservatório de um líquido, alimentado por um fluxo idêntico à vazão. A comparação é válida para a massa de compostos químicos recebidos e eliminados, e também para o suprimento e a perda de energia. Alguns organismos, chamados *fototróficos*, estão adaptados a obter a energia de que necessitam da luz solar; outros, os *quimiotróficos*, obtêm energia oxidando compostos encontrados no meio ambiente. Dentre os quimiotróficos, certos microrganismos são capazes de oxidar compostos inorgânicos — são chamados, então, *quimiolitotróficos*. A maioria dos microrganismos e todos os animais são, entretanto, *quimiorganotróficos*, por necessitarem oxidar substâncias orgânicas.

As substâncias oxidáveis utilizadas pelos seres humanos, em particular, estão presentes nos seus alimentos, principalmente sob a forma de carboidratos, lipídios e proteínas. Há também reservas endógenas de carboidratos e lipídios, que são oxidadas no intervalo entre as refeições.

Os nutrientes, ao serem oxidados, perdem prótons e elétrons ($H^+ + e^-$) e têm seus átomos de carbono convertidos a CO_2 . Os prótons e elétrons são recebidos por coenzimas na forma oxidada, que passam assim à forma reduzida (Fig. 8.1). A reoxidação das coenzimas é obtida pela transferência dos ($H^+ + e^-$) para o oxigênio, produzindo $ATP + H_2O$.

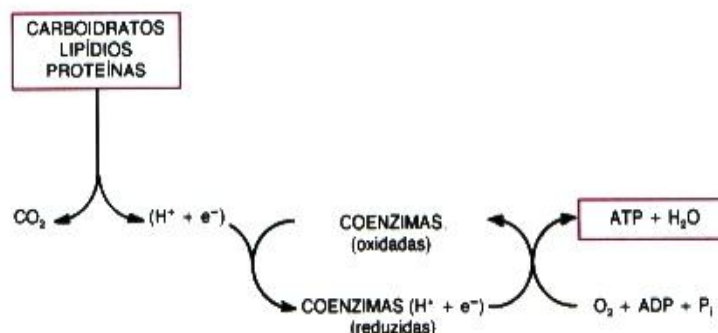


Fig. 8.1 Esquema simplificado do processo de obtenção de energia em organismos quimiorganotróficos: a oxidação de nutrientes leva à redução de coenzimas que são oxidadas por O_2 , produzindo ATP .

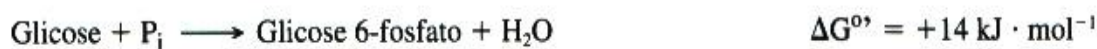
gênio molecular, que é então convertido a água. A energia derivada desta oxidação é utilizada para sintetizar um composto rico em energia, a *adenosina trifosfato* (ATP), a partir da *adenosina difosfato* (ADP) e *fosfato inorgânico* (HPO_4^{2-} a pH 7,4 — representado por P_i). É a energia química do ATP a que será diretamente usada para promover os processos biológicos que consomem energia. Em resumo, para que a energia derivada da oxidação dos alimentos possa ser aproveitada pelas células, ela deve estar sob a forma de ATP.

O aproveitamento da energia do ATP é feito associando a retirada de seu grupo fosfato terminal aos processos que requerem energia (Fig. 8.2). Desta forma, a energia química armazenada no ATP pode ser utilizada em processos químicos (biossínteses), mecânicos (contração muscular), elétricos (condução de estímulo nervoso), osmóticos (transporte ativo através de membranas) ou luminosos (bioluminescência). Como foi assinalado no Capítulo 4, a retirada do grupo fosfato terminal do ATP não constitui uma hidrólise simples. A reação de hidrólise tem um valor de $\Delta G^{0'}$ negativo, mostrando ser termodinamicamente viável.



A velocidade desta reação, entretanto, é convenientemente baixa. Algumas enzimas que catalisam a hidrólise de ATP têm sua atividade associada a processos de transporte de compostos pela membrana ou outros mecanismos que consomem energia e estão sob rígido controle celular. Se assim não fosse, a ação destas enzimas prontamente hidrolisaria todo o ATP formado, inviabilizando a vida celular. Além disto, e mais importante, a energia liberada pela reação de hidrólise seria dissipada na forma de calor, uma forma de energia que não pode ser aproveitada pelas células. Na verdade, a forma de utilização do ATP e a remoção de seu grupo fosfato terminal é um processo muito mais complexo.

Tomemos alguns exemplos para entender a utilização do ATP como “doador” de energia. A glicose 6-fosfato poderia ser obtida a partir de glicose e fosfato:



Entretanto, o valor positivo do $\Delta G^{0'}$ desta reação informa sobre sua inviabilidade. Como não é possível a obtenção de glicose 6-fosfato por este caminho, as células contornam a dificuldade termodinâmica utilizando o ATP:



Note-se que se trata de uma outra reação, esta, sim, termodinamicamente viável. Um outro exemplo comum nas reações metabólicas são as sínteses. Vamos supor que a reação de condensação de A e B tenha um $\Delta G^{0'}$ desfavorável:



Este problema também é contornado pela utilização de ATP. Neste caso, um caminho possível é a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para o composto A, reação esta termodinamicamente viável.

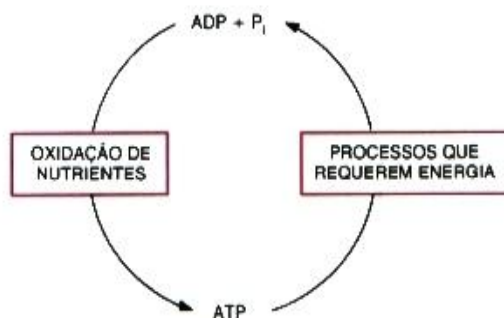
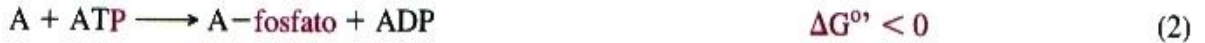


Fig. 8.2 Os processos biológicos utilizam a energia do ATP, sintetizado por oxidação de nutrientes.



O composto A fosforilado pode reagir com B, em uma reação também termodinamicamente viável, liberando o grupo fosfato e produzindo o composto de condensação:



Ao examinarmos o resultado da soma das reações (2) e (3), teremos:



Uma comparação apressada entre as reações (1) e (4) poderia levar à seguinte conclusão *incorreta*: a condensação de A e B tornou-se possível porque a conversão de ATP em ADP + fosfato “deu” energia para o processo. Como já foi enfatizado, a conversão de ATP em ADP e fosfato liberaria energia apenas como calor. O que de fato ocorreu foram as reações intermediárias (2) e (3) que resultaram no produto desejado.

Os compostos químicos presentes nos organismos não são permanentes

Até aqui foi enfatizada a dependência dos organismos quanto à obtenção de energia, proveniente da luz ou de compostos químicos. Os seres vivos dependem do meio ambiente também quanto a um segundo aspecto: a necessidade de compostos químicos para conservação e/ou aumento de sua massa. O aumento de massa ocorre imediatamente após a divisão celular, até que as células-filhas atinjam a massa da célula que lhes deu origem. Os indivíduos em etapas de crescimento têm esta necessidade acentuada. Mas mesmo em um ser adulto esta necessidade permanece. Sabe-se que os compostos presentes em um organismo não são estáveis, sofrendo um contínuo processo de degradação; a estabilidade de sua composição e de suas estruturas depende, portanto, de uma reposição também contínua. Tal reposição é obtida à custa de substâncias presentes no meio ambiente.

Os tipos de compostos exigidos por cada organismo diferem extraordinariamente. Alguns necessitam apenas de CO_2 , H_2O e sais minerais e, a partir destas substâncias, são capazes de sintetizar todos os outros compostos de que necessitam — é o caso de algumas bactérias e todos os vegetais. Outros devem receber do meio ambiente um conjunto variado de substâncias, cuja composição varia com a espécie. Como cada organismo tem substâncias que lhe são características e só eles próprios podem produzi-las, o que deve ser obtido do meio são os precursores destas substâncias. Desta forma, mesmo substâncias de constituição complexa são satisfatórias, pois os organismos são capazes de decompô-las e, reorganizando seus componentes, transformá-las em substâncias próprias. Para seres vivos muito simples, este processo se passa exteriormente, à custa de enzimas digestivas secretadas para o meio ambiente. Para os animais superiores o processo é cumprido através da digestão. Em um ou outro caso, as substâncias complexas são resolvidas até seus elementos componentes, que são então absorvidos e distribuídos pelas células do organismo; intracelularmente, dá-se a reorganização dos precursores segundo um padrão peculiar do ser vivo em questão.

Todo esse processo de obtenção, armazenamento e utilização de energia, e a transformação de precursores obtidos do meio em compostos característicos de cada organismo, é efetuado através de uma intrincada rede de reações químicas e constitui o *metabolismo*.

Os mamíferos não produzem proteínas a partir de carboidratos ou lipídios

Os alimentos são compostos principalmente por três tipos de substâncias orgânicas — carboidratos, lipídios e proteínas — que, por constituírem, em massa, os componentes mais importantes da dieta, são chamados *macronutrientes*. No processo digestivo os macronutrientes são degradados até suas unidades constituintes. A seguir, estão indicadas as unidades principais dos macronutrientes.

Carboidratos	Glicose
Lipídios	Ácidos graxos
Proteínas	Aminoácidos

Ao longo dos próximos capítulos, serão descritas as reações que fazem parte do metabolismo destes compostos. Antes de iniciar estas descrições, é importante fazer algumas considerações de ordem geral, que permitirão uma visão integrada dos processos a serem descritos posteriormente.

O que se pretende nesta abordagem preliminar é responder às seguintes perguntas:

— É obrigatória a ingestão de carboidratos, lipídios e proteínas, já que o organismo contém estes três tipos de compostos?

— Ou algum deles pode ser sintetizado a partir de outro?

— Se este for o caso, quais os tipos de compostos imprescindíveis na dieta?

A resposta a estas questões pode ser obtida a partir da análise das possibilidades de interconversão dos diferentes tipos de nutrientes. Para tanto está apresentado na Fig. 8.3 um mapa muito simplificado e geral de uma parte do metabolismo. Neste mapa, ao lado do nome dos compostos aparece, entre parênteses, o número de átomos de carbono que os constituem. A abreviação acetil-CoA refere-se à acetil-coenzima A, ou seja, à coenzima A, que será descrita mais adiante, ligada ao grupo acetil. Estão representados 10 dos 20 aminoácidos constituintes das proteínas, separados em quatro grupos; os outros aminoácidos estariam localizados em um destes grupos. A análise das interconversões deve levar em consideração que, para sintetizar uma proteína, há necessidade de todos os 20 aminoácidos (representados, na Fig. 8.3, por 10 aminoácidos).

Para determinar quais são as interconversões exequíveis entre os macronutrientes ou suas unidades constituintes, verificar se é possível sintetizar:

- | | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| a. Glicose a partir de proteína | d. Proteína a partir de glicose |
| b. Ácido graxo a partir de proteína | e. Glicose a partir de ácido graxo |
| c. Ácido graxo a partir de glicose | f. Proteína a partir de ácido graxo |

Assim, hipoteticamente, verificaríamos o que poderia produzir um indivíduo que recebesse em sua dieta *apenas* carboidrato, *ou* lipídio *ou* proteína. Sobreviveria com a dieta o que fosse capaz de obter os outros dois

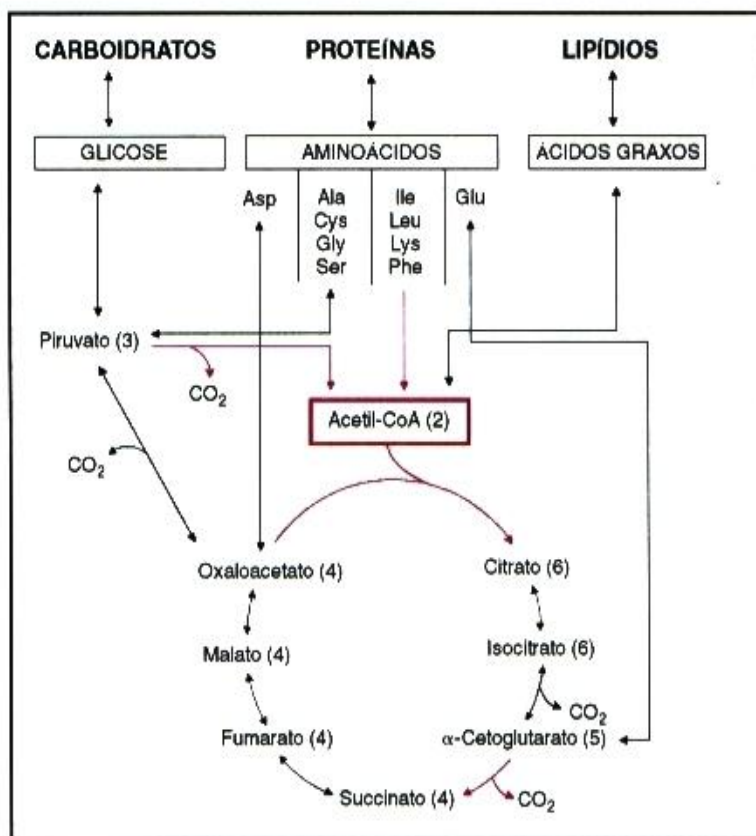


Fig. 8.3 Mapa simplificado de parte do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. As reações irreversíveis estão assinaladas em vermelho.

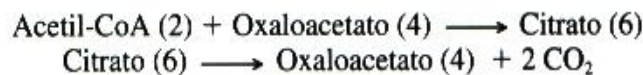
tipos de alimentos a partir daquele que lhe foi oferecido. A resposta é conseguida unicamente com as informações oferecidas pela Fig. 8.3. Duas observações preliminares devem ser feitas sobre as vias metabólicas representadas nesta figura:

1. A maioria das reações é reversível, mas algumas (Piruvato → Acetil-CoA; Oxaloacetato + Acetil-CoA → Citrato; α-cetoglutarato → Succinato; Ile, Leu, Lys, Phe → Acetil-CoA) são irreversíveis.
2. A degradação de carboidratos, lipídios e proteínas converge para um composto comum, a acetil-CoA.

Com base nestas observações, poderemos construir o quadro a seguir, com as etapas percorridas para cada conversão possível.

Conversões	Possível?	Etapas
a. Proteína → Glicose	Sim	Ala, Cys, Ser, Gly → Piruvato → Glicose e Asp → Oxaloacetato → Piruvato → Glicose
b. Proteína → Ácido graxo	Sim	Ala, Cys, Ser, Gly → Piruvato → Acetil-CoA → Ácido graxo e Ile, Leu, Lys, Phe → Acetil-CoA → Ácido graxo
c. Glicose → Ácido graxo	Sim	Glicose → Piruvato → Acetil-CoA → Ácido graxo
d. Glicose → Proteína	Não	
e. Ácido graxo → Glicose	Não	
f. Ácido graxo → Proteína	Não	

Os itens *d*, *e*, *f* de fato não são possíveis. Pelo esquema apresentado, vê-se que a glicose pode originar apenas alguns aminoácidos (Glicose → Piruvato → Ala, Cys, Gly, Ser) mas não há via possível para a obtenção de Ile, Leu, Lys e Phe; na ausência do grupo completo de aminoácidos, a síntese de proteínas é inviável. Igualmente impossível é a síntese de glicose a partir de ácido graxo. Na sua degradação, os ácidos graxos são convertidos a acetil-CoA, com apenas dois átomos de carbono. Note-se que este composto condensa-se com oxaloacetato (4 carbonos), formando um composto de 6 carbonos (citrato). Por reações subsequentes, o citrato pode regenerar o oxaloacetato, mas nesta via há produção de duas moléculas de CO₂. Esta seqüência de reações pode, então, ser assim resumida:



Se fizermos a soma das duas reações, obteremos:



Verifica-se, assim, que não pode haver síntese líquida de oxaloacetato (e, portanto, de glicose) a partir de acetil-CoA. Por razões análogas, não pode haver síntese de proteínas a partir de ácidos graxos.

O resultado geral das interconversões pode ser expresso mostrando o que cada macronutriente pode produzir:

Macronutriente	Pode originar
Proteínas	Carboidratos, ácidos graxos
Carboidratos	Ácidos graxos
Lipídios	—

Apesar do mapa metabólico utilizado ser bastante simplificado, as conclusões dele derivadas são corretas e serão ratificadas ao longo do estudo do metabolismo. Fica, portanto, ressaltada desde logo a extrema importância alimentar das proteínas, pois delas podem ser derivados os outros dois macronutrientes; a partir destes as proteínas não podem ser produzidas. A necessidade nutricional proteica fica ainda mais enfatizada se an-

teciparmos uma informação adicional: as células e os organismos têm reservas de carboidratos e lipídios, mas nenhuma célula ou organismo tem reservas de proteínas.

O metabolismo será apresentado em duas etapas: descrição das vias metabólicas e análise de sua regulação

No presente texto, primeiramente serão analisadas as vias que compõem o metabolismo — PARTE 3 — METABOLISMO: VIAS PRINCIPAIS (Capítulos 8 a 18).

Na PARTE 4 — REGULAÇÃO DO METABOLISMO, serão apresentados inicialmente os mecanismos de que os seres vivos dispõem para controlar o seu metabolismo (Capítulo 19); segue-se a regulação de cada via metabólica (Capítulo 20) e, finalmente, a regulação metabólica global, integrada, frente a diferentes situações fisiológicas (Capítulos 21 e 22).

9

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS: GLICÓLISE E FORMAÇÃO DE ACETIL-CoA

A glicose é, quantitativamente, o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos. De fato, sua utilização como fonte energética pode ser considerada universal e, dos microrganismos ao homem, quase todas as células são potencialmente capazes de atender suas demandas energéticas apenas a partir deste açúcar. A glicose é imprescindível para algumas células e tecidos, como hemácias e tecido nervoso, por constituir o único substrato que estes tecidos são capazes de oxidar para obter energia.

Apesar de a dieta humana conter pouca glicose livre, proporções consideráveis deste açúcar são ingeridas sob a forma de amido, sacarose e lactose. Na dieta americana, por exemplo, 55% dos carboidratos aparecem como amido, 35% como sacarose, 5% como lactose e 5% como glicose e outros monossacarídeos. O amido é digerido no trato digestivo até glicose, o açúcar que será afinal distribuído para os tecidos. A digestão de sacarose e lactose origina, além de glicose, frutose e galactose. O metabolismo da glicose será descrito a seguir; o metabolismo de frutose e galactose será analisado posteriormente (p. 169).

Todas as células oxidam glicose a piruvato para obter ATP; o piruvato pode ser oxidado a CO₂, aumentando muito a produção de ATP

Para obterem ATP a partir de glicose, todas as células lançam mão de sua oxidação parcial a piruvato. Nas células anaeróbias, a degradação pára neste ponto. A conversão de glicose a piruvato permite aproveitar somente uma pequena parcela — menos de 10% — da energia total da glicose, ficando a maior parte conservada como piruvato. De fato, a oxidação total da glicose (produzindo CO₂) libera uma quantidade de energia equivalente a 2.870 kJ·mol⁻¹, mas a conversão de glicose a piruvato libera aproximadamente apenas 200 kJ·mol⁻¹. Apesar disso, as células anaeróbias podem suprir, com a degradação parcial, toda sua demanda energética. Nas células aeróbias, entretanto, o piruvato é subsequenteemente oxidado, trazendo, naturalmente, um enorme ganho na produção de ATP.

O processo geral de oxidação completa da glicose até CO₂ está esquematizado na Fig. 9.1. A etapa inicial, que consiste na conversão de glicose a piruvato, ocorre através de uma seqüência de reações denominada *glicólise*, uma via metabólica que se processa no citossol. Seus produtos são ATP, (H⁺ + e⁻), recebidos por coenzimas, e piruvato. A posterior oxidação do piruvato é feita no interior da mitocôndria, nas células que dispõem desta organela. Na mitocôndria, o piruvato, um composto de três carbonos, sofre uma descarboxilação, transformando-se em um composto com dois carbonos (C₂). Este combina-se com um composto de qua-

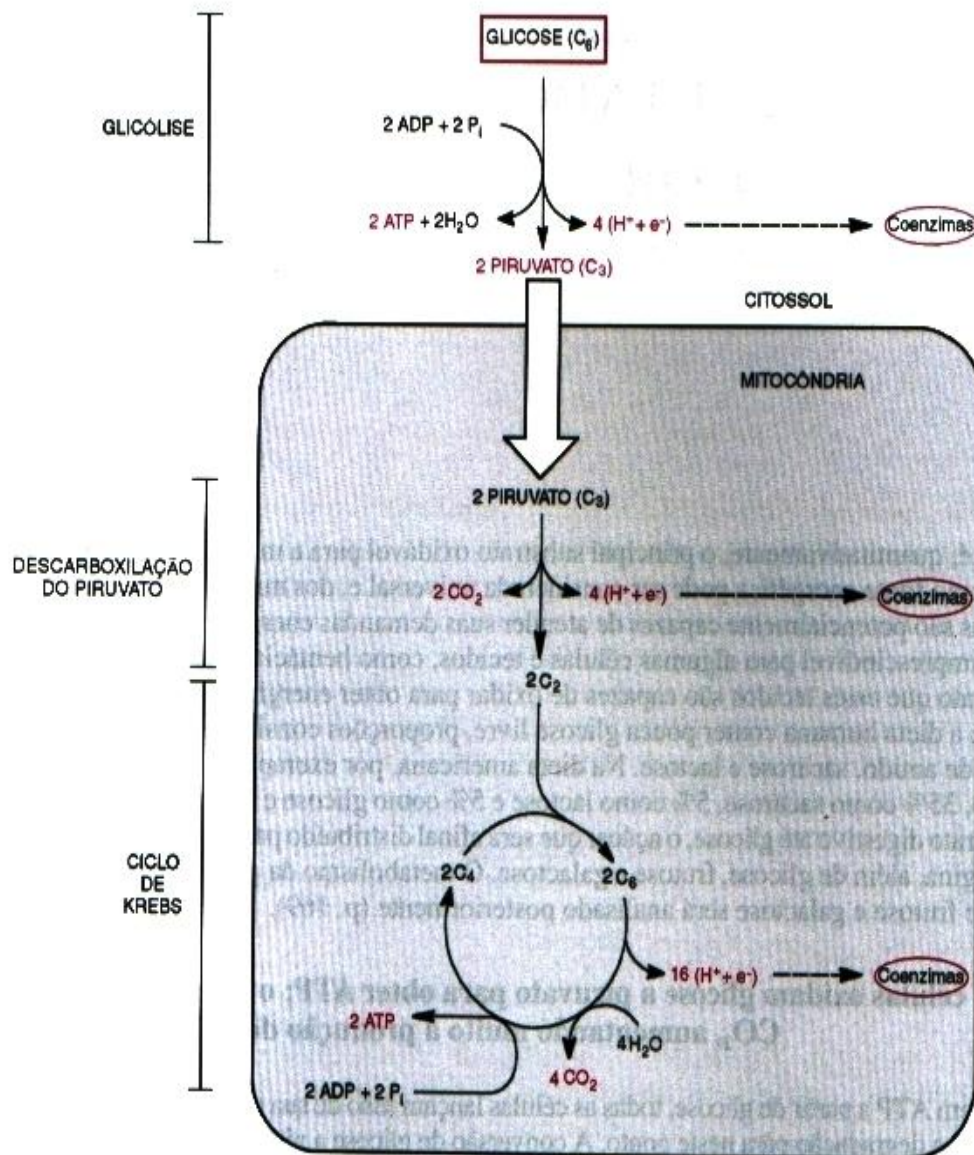


Fig. 9.1 Esquema da oxidação completa da glicose. No citossol, a glicose é oxidada a piruvato e este, na mitocôndria, é oxidado a CO_2 . Os produtos da oxidação da glicose estão destacados em vermelho. Os $\text{H}^+ + \text{e}^-$ são recebidos por coenzimas; da oxidação destas coenzimas por oxigênio resulta a síntese da maior parte do ATP produzido pela oxidação da glicose (não mostrado).

tro carbonos (C_4), dando um composto de seis carbonos (C_6). Através de uma seqüência cíclica de reações (ciclo de Krebs), C_6 perde dois carbonos sob a forma de CO_2 e regenera C_4 .

Na mitocôndria, o piruvato é, portanto, totalmente oxidado a CO_2 , com a concomitante produção de grande quantidade de ($H^+ + e^-$), sempre recebidos por coenzimas. Da oxidação destas coenzimas pelo oxigênio, deriva-se a grande produção de ATP conseguida pela oxidação adicional do piruvato e que perfaz cerca de 90% do total obtido com a oxidação completa da glicose.

As coenzimas que recebem os ($H^+ + e^-$) produzidos na oxidação da glicose são NAD^+ e FAD

Nas três etapas da oxidação da glicose — a glicólise, a descarboxilação do piruvato e o ciclo de Krebs — os ($H^+ + e^-$) são produzidos em reações catalisadas por desidrogenases. Algumas desidrogenases utilizam como coenzima a *nicotinamida adenina dinucleotídio* (NAD^+), e outras, a *flavina adenina dinucleotídio* (FAD), derivados, respectivamente, das vitaminas nicotinamida e riboflavina (Fig. 9.2).

Nas reações com participação de NAD^+ , há transferência de dois elétrons e um próton do substrato para o NAD^+ , que se reduz a NADH; o outro próton é liberado no meio. O FAD recebe dois elétrons e dois prótons, reduzindo-se a $FADH_2$ (Fig. 9.3).

9.1 GLICÓLISE: OXIDAÇÃO DE GLICOSE A PIRUVATO

Ao iniciar a análise de vias metabólicas, é conveniente ter um referencial que guie o estudo, para que fiquem ressaltados os aspectos mais importantes. Assim, deve-se procurar responder:

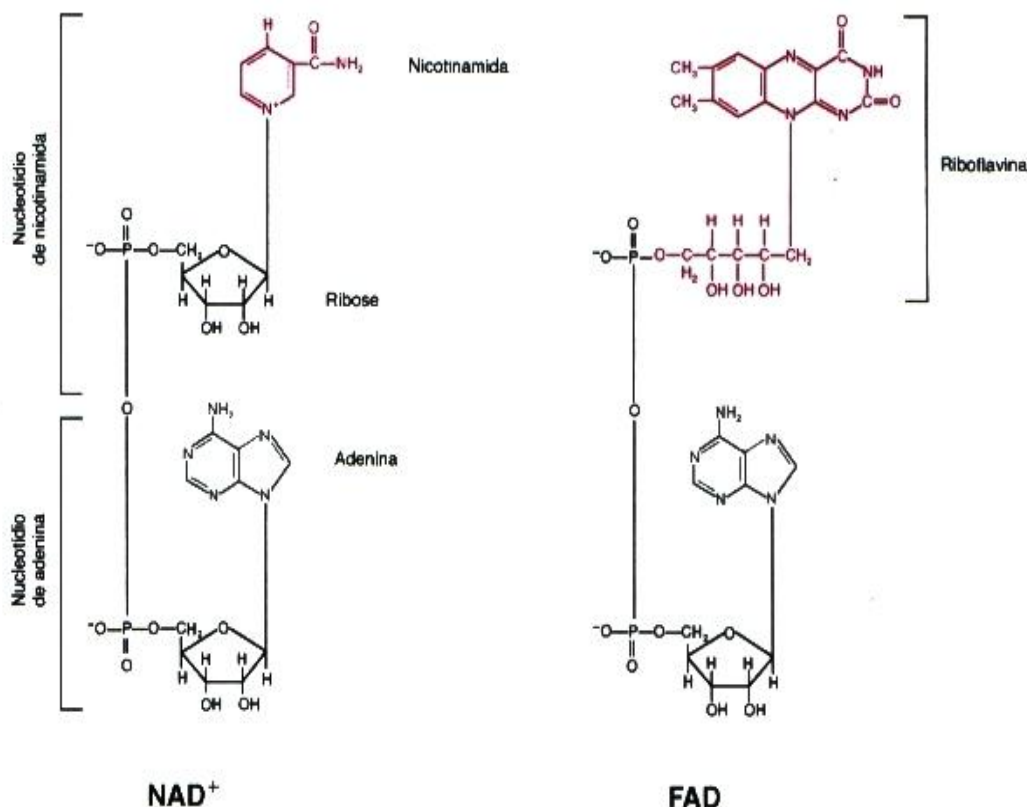


Fig. 9.2 Estrutura das formas oxidadas da nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) e da flavina adenina dinucleotídio (FAD). Cada nucleotídio é formado por uma base nitrogenada, uma ribose (ou o poliálcool ribitol) e um grupo fosfato. As vitaminas componentes das coenzimas estão destacadas em vermelho.

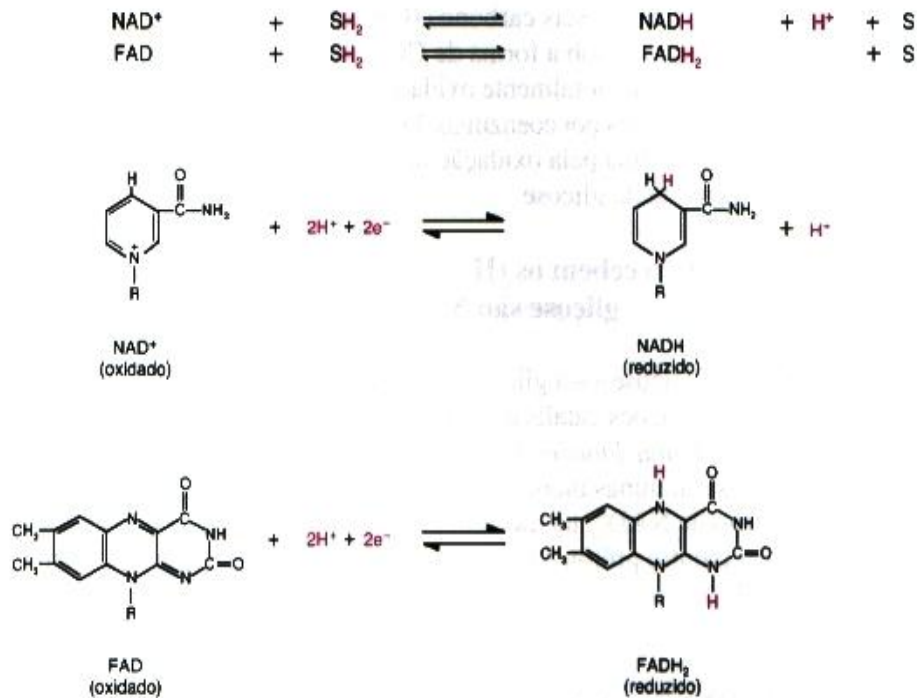


Fig. 9.3 Reações de óxido-redução catalisadas por desidrogenases que têm NAD^+ e FAD como coenzimas. O substrato reduzido (SH_2) é oxidado, perdendo dois átomos de hidrogênio e as coenzimas convertem-se às suas formas reduzidas. O NAD^+ recebe dois elétrons e um próton, ficando o segundo próton no meio; o FAD recebe os dois átomos de hidrogênio. Estas reações são reversíveis. Estão representadas apenas as partes reativas do NAD^+ e FAD , o restante das moléculas sendo simbolizado por R.

1. Quais são os substratos iniciais da via?
2. Quais são seus produtos?
3. Quais são as reações irreversíveis?
4. Como a via é regulada?

Das respostas às questões 1 e 2 deriva-se a equação geral da via metabólica, que é a tradução em linguagem química das transformações efetuadas pela via em estudo. A análise da questão 3 permitirá saber em que sentido a via ocorre, e, finalmente, a resposta à questão 4 permitirá entender como a via funciona em diferentes condições fisiológicas. Este padrão de análise será seguido ao longo do estudo das vias metabólicas neste texto.

Na glicólise ocorrem duas fosforilações por ATP e duas por fosfato inorgânico; os quatro grupos fosfato são transferidos para ADP, formando quatro ATP

A glicólise pode ser dividida em quatro etapas para salientar os eventos fundamentais desta via (Fig. 9.4):

- I. Dupla fosforilação da hexose, à custa de 2 ATP, originando uma hexose com dois grupos fosfato.
- II. Clivagem desta hexose, produzindo duas trioses fosforiladas.
- III. Oxidação e nova fosforilação, desta vez por fosfato inorgânico (P_i), das trioses fosfato, formando duas moléculas de um intermediário com dois grupos fosfato.
- IV. Transferência dos grupos fosfato deste intermediário para ADP, formando 4 ATP e 2 piruvato.

Estas quatro etapas são compostas por 10 reações seqüenciais que compõem a glicólise (Fig. 9.5).

Etapa I. A fosforilação da glicose por esterificação da hidroxila do carbono 6 com fosfato inorgânico é uma reação inviável, por ter ΔG^0 positivo (Capítulo 4). Por isso, na primeira reação da glicólise, os organismos

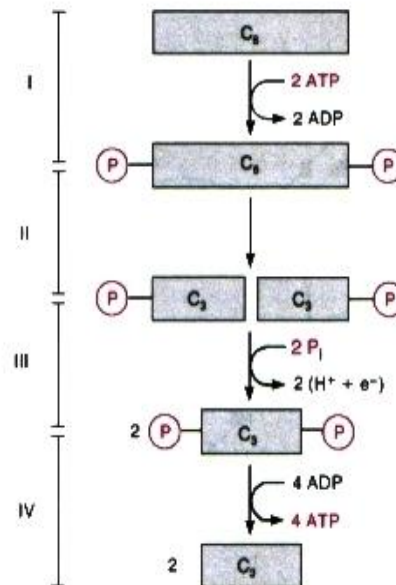


Fig. 9.4 Etapas fundamentais da glicólise. O símbolo P representa o grupo PO_3^{2-} , C_6 indica hexose e C_3 , triose.

efetua a fosforilação da glicose através de uma reação com ΔG° negativo, que utiliza ATP como doador de grupo fosfato. A reação é essencialmente irreversível e catalisada por quinases. *Quinases* são enzimas que transferem um grupo fosfato de um composto de alta energia (em geral ATP) para um composto aceptor. Na maioria dos organismos e tecidos, a enzima que catalisa a fosforilação da glicose é a *hexoquinase* e, no fígado, a *glicoquinase*.

Segue-se a isomerização da glicose 6-fosfato a frutose 6-fosfato, por ação de uma isomerase, a *fosfo-glicoisomerase*, e nova fosforilação, análoga à anterior, também utilizando ATP e também irreversível, catalisada pela *fosfofrutoquinase*. Forma-se, então, uma hexose com dois grupos fosfato: a frutose 1,6-bisfosfato.

Etapa II. Nesta etapa, a clivagem da frutose 1,6-bisfosfato em diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato é catalisada por *aldolase*. Estas duas trioses fosforiladas são isômeras e, à semelhança do que ocorre com glicose 6-fosfato e frutose 6-fosfato, devem ser interconvertidas por ação de uma isomerase específica, a *triose fosfato isomerase*. A conversão de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato possibilita que todos os carbonos da glicose sejam oxidados a piruvato, apesar de apenas o gliceraldeído 3-fosfato ser substrato da próxima enzima e poder, portanto, prosseguir pela via glicolítica. *Desta reação em diante, a via terá todos os seus intermediários duplicados.* A clivagem de frutose 1,6-bisfosfato e a isomerização de diidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato são reações termodinamicamente desfavoráveis. Isto significa que, no equilíbrio, predominam frutose 1,6-bisfosfato e diidroxiacetona fosfato, respectivamente. Apesar disto, o conjunto das duas reações processa-se no sentido da formação de gliceraldeído 3-fosfato, graças à retirada contínua deste composto pelas reações subseqüentes.

Etapa III. As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato obtidas por fosforilação à custa de 2 ATP são novamente fosforiladas, agora por fosfato inorgânico, formando duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato; deste modo, o substrato, um aldeído, é oxidado a um ácido. Esta etapa é cumprida por uma reação de óxido-redução complexa, catalisada pela *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* (Fig. 9.6). O substrato liga-se covalentemente a um grupo SH da enzima e, por reação com fosfato inorgânico, forma-se uma *ligação anidrido fosfórico*, rica em energia, e reduz-se um NAD^+ fortemente ligado à enzima. Esta é regenerada por redução de uma molécula livre de NAD^+ . A reação de óxido-redução ocorre com grande diminuição de energia livre, mas esta energia é conservada pelo acoplamento da oxidação do grupo aldeído com a formação da ligação anidrido fosfórico e redução de uma molécula de NAD^+ . A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é inibida por agentes específicos para grupos SH, como, por exemplo, o iodoacetato.

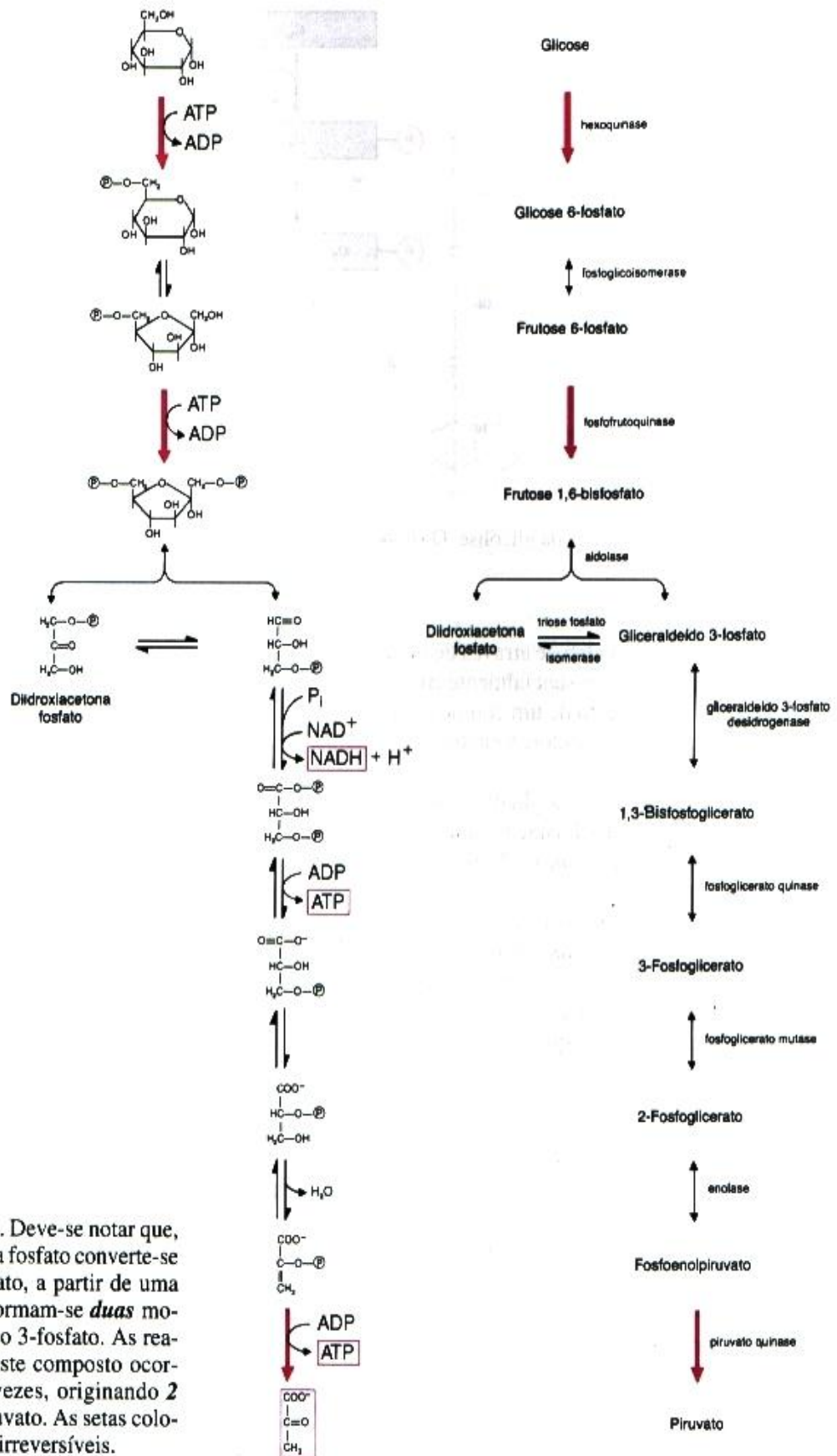


Fig. 9.5 Via glicolítica. Deve-se notar que, como a diidroxiacetona fosfato converte-se a gliceraldeído 3-fosfato, a partir de uma molécula de glicose formam-se *duas* moléculas de gliceraldeído 3-fosfato. As reações subseqüentes a este composto ocorrem, portanto, *duas* vezes, originando **2** NADH, **4** ATP e **2** piruvato. As setas coloridas indicam reações irreversíveis.

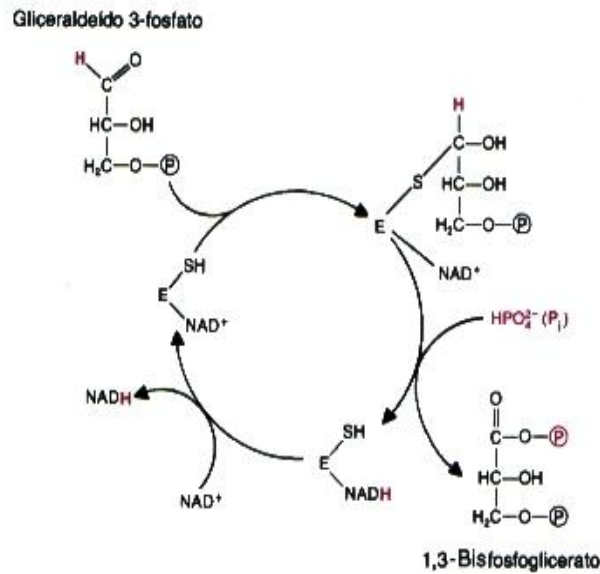


Fig. 9.6 Esquema da conversão de gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-Bisfosfoglicerato, catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; forma-se intermediariamente uma ligação covalente entre o substrato e um grupo SH da enzima.

Etapa IV. Compreende dois eventos de formação de ATP. Na reação catalisada pela *fosfoglicerato quinase*, o grupo fosfato da ligação anidrido é suficientemente rico em energia para poder ser transferido ao ADP, produzindo ATP. O segundo evento de síntese de ATP depende da conversão de uma *ligação éster fosfato* em uma *ligação fosfoenol*, rica em energia. Esta conversão compreende, inicialmente, o deslocamento do grupo fosfato do carbono 3 do 3-fosfoglicerato para o carbono 2. A *fosfoglicerato mutase*, um tipo particular de isomerase, catalisa esta transferência intramolecular do grupo fosfato. O processo envolve a formação intermediária de um composto bifosforilado (2,3-bisfosfoglicerato), originado por doação de um grupo fosfato da própria enzima ao substrato (Fig. 9.7). Em seguida, a *enolase* promove a desidratação do 2-fosfoglicerato, originando o fosfoenolpiruvato. A formação deste composto rico em energia possibilita a síntese de ATP na reação subsequente, irreversível, catalisada pela *piruvato quinase*.

A glicólise tem, portanto, um rendimento de 2 ATP: para cada molécula de glicose são produzidos 4 ATP (2 por triose), dos quais devem ser descontados os 2 ATP consumidos na Etapa I.

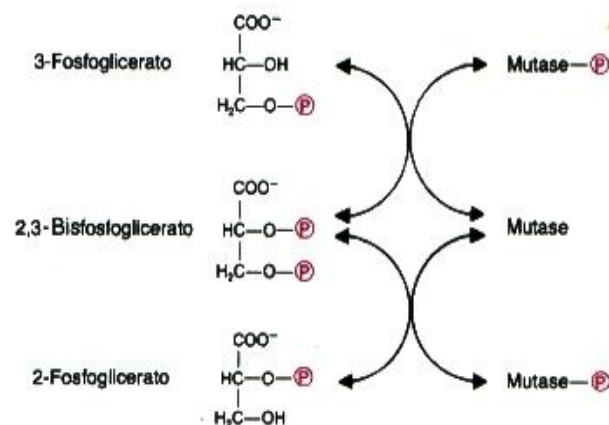
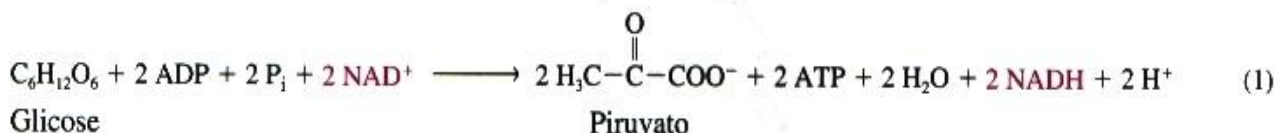


Fig. 9.7 Esquema da conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato mostrando a formação de um intermediário bifosforilado.

9.1.1 GLICÓLISE ANAERÓBIA: FERMENTAÇÕES

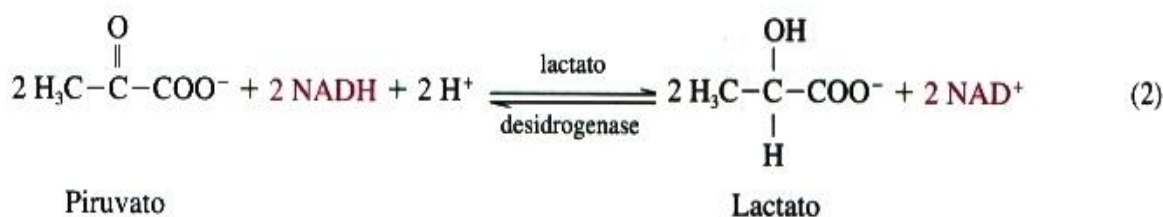
**O NADH produzido na glicólise pode ser oxidado anaerobiamente:
o piruvato é convertido a lactato ou etanol**

A equação geral da glicólise é:



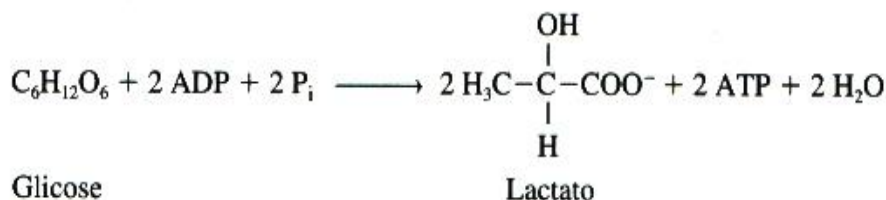
Deve-se notar que uma equação geral não representa uma reação química. No caso em questão, por exemplo, se os compostos que aparecem no primeiro membro da equação forem adicionados a uma solução contendo todas as enzimas da glicólise, nenhuma reação ocorrerá, já que, para a primeira reação da glicólise ocorrer, há necessidade de ATP. As equações gerais representam sempre e apenas a essência da via metabólica, mas omitem características fundamentais do processo.

A oxidação da glicose e a produção de ATP estão associadas à redução de NAD^+ . Como o NAD^+ existe nas células em concentrações limitantes, muito inferiores às dos substratos, a manutenção do funcionamento da glicólise depende da reoxidação do NADH. Os organismos regeneram o NAD^+ através de dois processos diferentes, segundo a disponibilidade de oxigênio. Em *aerobiose*, utilizam o oxigênio para oxidar o NADH; em *anaerobiose*, o próprio piruvato produzido pela glicólise serve como acceptor dos elétrons do NADH, sendo reduzido a lactato:



Este é o processo utilizado por algumas espécies de bactérias, pelas hemácias, por fibras musculares de contração rápida (fibras brancas) e pelas fibras musculares em geral quando submetidas a esforço intenso. Nestas condições, o oxigênio trazido pela circulação torna-se insuficiente para promover a oxidação da grande quantidade de NADH resultante do trabalho muscular e a fibra muscular fica submetida a uma anaerobiose relativa. A oxidação do NADH pelo piruvato gera, então, o lactato caracteristicamente produzido por músculos em anaerobiose, permitindo que, pela regeneração do NAD^+ a glicólise possa prosseguir, formando ATP.

Somando-se a equação de conversão de glicose a piruvato (equação 1) à de conversão de piruvato a lactato (equação 2), obtém-se a equação geral da conversão *glicose* \rightarrow *lactato*:



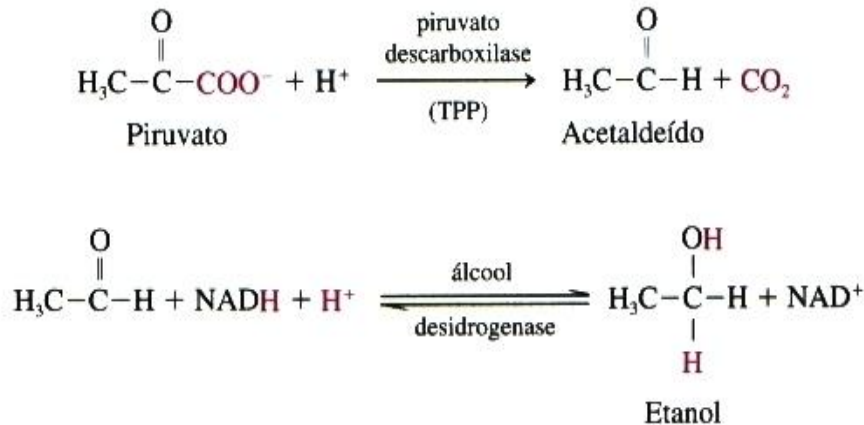
Esta equação geral, como todas, esconde etapas importantes da transformação. Por exemplo, fica omitida a participação imprescindível do NAD^+ , sem cuja presença a via não pode ser levada a cabo.

Subdividindo-se a última equação, pode-se visualizar bem o resultado da glicólise:



Assim, pode-se definir a glicólise como uma via que converte glicose a lactato (a) e aproveita uma parte da energia derivada desta transformação para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i (b). É necessário enfatizar que essas reações não ocorrem; são apenas ilustrativas do processo geral.

Em certos organismos, como as leveduras e algumas bactérias, a regeneração do NAD^+ é feita por outro processo: o piruvato é descarboxilado, originando acetaldeído, que, servindo comoceptor dos elétrons do $NADH$, reduz-se a etanol:



A coenzima da piruvato descarboxilase é a *tiamina pirofosfato* (TPP), que participa também da descarboxilação oxidativa do piruvato, como se verá a seguir.

A degradação anaeróbia da glicose é chamada *fermentação*. Nas bactérias ocorrem muitos tipos diferentes de fermentações, obedecendo, entretanto, a um padrão comum. A glicose é sempre convertida a piruvato, e nesta conversão, como foi descrito, produz-se $NADH$. A partir deste ponto as fermentações diferem pelas reações que levam à regeneração do NAD^+ . Segundo as enzimas de que a célula dispõe, o piruvato é convertido a lactato, etanol, propionato, butirato etc. Estas reações têm em comum o fato de produzirem NAD^+ e de o produto final ser excretado para o meio. As fermentações são então diferenciadas pelo produto final: fermentação láctica, alcoólica, propiônica etc. As fermentações são processos auto-suficientes, ou seja, independem de outras vias por serem capazes de regenerar as coenzimas que utilizam para a produção de ATP.

O rendimento da glicólise é maior do que 30%

A conversão de glicose a lactato tem $\Delta G^{0'}$ de $-196 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ de glicose. Nesta conversão são produzidos 2 moles de ATP, a partir de ADP e fosfato, como mostra a equação geral (equação 1). Como o valor de $\Delta G^{0'}$ para a conversão de ATP a $\text{ADP} + P_i$ equivale a $-31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, o rendimento celular da conversão glicose \rightarrow lactato é:

$$\text{Rendimento} = \frac{62 \times 100}{196} = 31,6\%$$

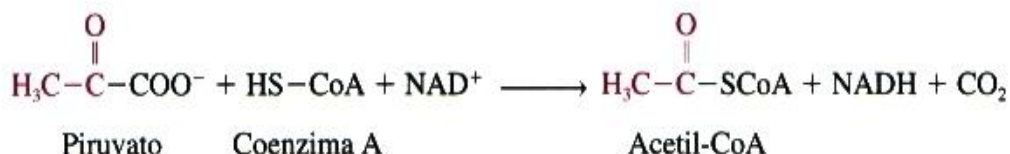
Este valor indica que 31,6% da energia livre liberada pelo processo é conservada pelas células sob a forma de energia química presente no ATP. O restante é dissipado como calor. Estes cálculos foram feitos com base na variação de energia livre padrão ($\Delta G^{0'}$), medida, como se recorda, com concentrações molares dos reagentes e produtos. Pode-se estimar que o rendimento celular real do processo, levando em consideração as concentrações das substâncias envolvidas vigentes nas células, ultrapassa 50%.

A glicólise, como praticamente todas as vias metabólicas, é estritamente regulada através do controle da atividade de algumas de suas enzimas, sujeitas a regulações alostéricas e hormonais. *A descrição completa da regulação desta via encontra-se no Capítulo 20.*

9.2 CONVERSÃO DE PIRUVATO A ACETIL-CoA

Em condições aeróbias, o primeiro passo para a oxidação total do piruvato é a sua conversão a acetil-CoA. Nas células eucarióticas, o piruvato do citosol entra na mitocôndria (Fig. 9.1), através de uma translocase específica, e é transformado em acetil-CoA, conectando, portanto, a glicólise e o ciclo de Krebs. Assim sendo, o piruvato deixa de ser o aceptor dos elétrons do NADH produzido pela glicólise e esta coenzima não será regenerada no citosol; será oxidada pelo oxigênio, aceptor final de elétrons no metabolismo aeróbio.

O piruvato é convertido a acetil-CoA, através de uma descarboxilação oxidativa, de acordo com a equação:



Esta reação consiste fundamentalmente na transferência de um radical acetil, proveniente da descarboxilação do piruvato, para a *coenzima A* (Fig. 9.8). Esta coenzima tem justamente a função de transportadora de radicais acil, aos quais se liga através de seu grupo sulfidril terminal, formando uma ligação tioéster. As

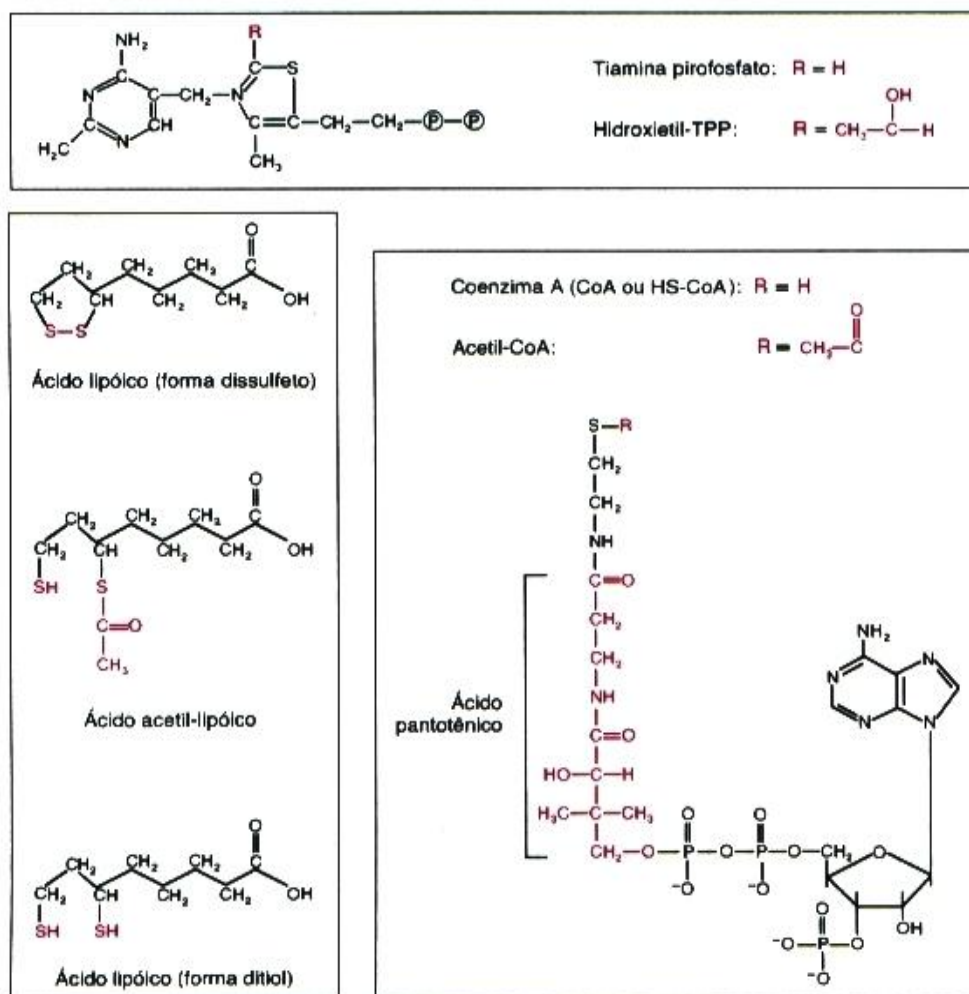


Fig. 9.8 Estrutura das coenzimas que participam da oxidação de piruvato a acetil-CoA e dos seus derivados formados nesta reação.

ligações tioéster têm ΔG° de hidrólise da ordem de $-30 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, tornando os compostos que apresentam este tipo de ligação compostos ricos em energia.

A reação de formação de acetil-CoA a partir de piruvato é irreversível e ocorre em etapas sequenciais, catalisadas por um sistema multienzimático, chamado *complexo piruvato desidrogenase*. O complexo contém três enzimas diferentes — *piruvato desidrogenase*, *diidrolipoil transacetilase* e *diidrolipoil desidrogenase* — e cinco coenzimas: *tiamina pirofosfato (TPP)*, *coenzima A (CoA)*, *nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺)*, *flavina adenina dinucleotídeo (FAD)* e *ácido lipóico* (Fig. 9.8). As quatro primeiras coenzimas — TPP, CoA, NAD⁺ e FAD — são derivadas de vitaminas hidrossolúveis: tiamina, ácido pantotênico, nicotinamida e riboflavina, respectivamente. O ácido lipóico, também uma vitamina, está covalentemente ligado à diidrolipoil transacetilase e, graças à sua cadeia lateral longa e flexível, é capaz de interagir com os sítios ativos das duas outras enzimas do complexo, funcionando como um transferidor do grupo acetil. A oxidação de piruvato a acetil-CoA é um exemplo notável da utilização de vitaminas no metabolismo. Esta única transformação não pode ser realizada sem o concurso de cinco vitaminas.

Uma única partícula do complexo piruvato desidrogenase é maior do que um ribossomo e consiste em um núcleo central formado por dezenas de moléculas de diidrolipoil transacetilase, às quais se associam dezenas de moléculas de piruvato desidrogenase e diidrolipoil desidrogenase. Fazem parte ainda da partícula várias moléculas de quinase e fosfatase, responsáveis pela regulação da atividade do próprio complexo, através de

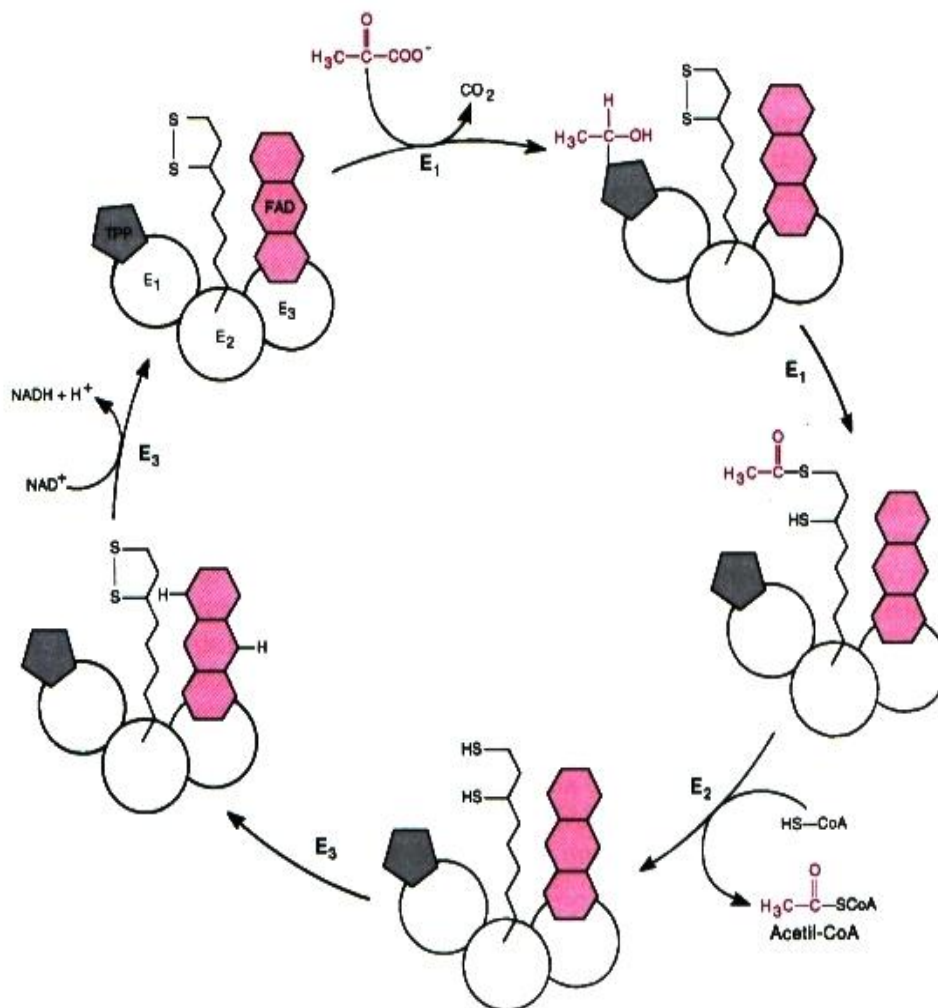


Fig. 9.9 Etapas da reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase, onde E_1 , E_2 e E_3 representam respectivamente as enzimas: piruvato desidrogenase (TPP), diidrolipoil transacetilase (ácido lipóico) e diidrolipoil desidrogenase (FAD). O complexo piruvato desidrogenase é formado por um grande número destas enzimas, além de outras enzimas que controlam a sua atividade.

fosforilação e desfosforilação (p. 286). A associação das enzimas (por ligações não-covalentes) permite que essa reação complexa ocorra rápida e coordenadamente.

A primeira etapa (Fig. 9.9) é a descarboxilação do piruvato pela piruvato desidrogenase, que transfere o grupo hidroxietil para o TPP, em uma reação análoga à da piruvato descarboxilase, que participa da fermentação alcoólica (p. 127). A piruvato desidrogenase liga o grupo hidroxietil ao ácido lipóico, o cofator da próxima enzima do complexo, a diidrolipoil transacetilase: o grupo hidroxietil é oxidado a acetil e os elétrons são transferidos para o ácido lipóico (forma dissulfeto), reduzindo-o a ácido acetil lipóico. Em seguida, a diidrolipoil transacetilase transfere o grupo acetil para a coenzima A, formando acetil-CoA. O ácido lipóico (forma ditiol) é reoxidado pela diidrolipoil desidrogenase, uma flavoproteína contendo FAD como grupo prostético, que recebe os ($H^+ + e^-$) e os transfere finalmente para o NAD^+ . O NADH formado será oxidado na cadeia de transporte de elétrons (Cap. 11).

10

CICLO DE KREBS

O piruvato proveniente de glicose origina o radical acetil presente na acetil-CoA mitocondrial. Além da glicose, vários aminoácidos produzem piruvato e, portanto, acetil-CoA, ao serem degradados. Outros aminoácidos e os ácidos graxos também produzem acetil-CoA sem a formação intermediária de piruvato (Fig. 8.3). A acetil-CoA constitui, portanto, o ponto de convergência do metabolismo degradativo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. Completando o catabolismo destes compostos, a acetil-CoA, qualquer que seja sua proveniência, será totalmente oxidada a CO₂ pelo ciclo de Krebs, com a concomitante produção de coenzimas reduzidas. Paralelamente a esta oxidação, o ciclo de Krebs produz um grande número de compostos utilizados como precursores para biossínteses.

10.1 REAÇÕES DO CICLO DE KREBS

O ciclo de Krebs (Fig. 10.1) inicia-se com a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato, formando citrato, uma reação catalisada pela *citrato sintase*. O citrato é isomerizado a isocitrato, por ação da *aconitase*, com a formação intermediária de cis-aconitato (Fig. 10.2). A *isocitrato desidrogenase* promove a oxidação de isocitrato a α -cetoglutarato, com redução de NAD⁺ e liberação de CO₂. O α -cetoglutarato é então transformado a succinil-CoA, em uma reação catalisada pelo complexo *α -cetoglutarato desidrogenase*, um complexo enzimático com mecanismo de reação semelhante ao complexo piruvato desidrogenase. Trata-se, em ambos os casos, da descarboxilação oxidativa de um α -cetoácido (piruvato ou α -cetoglutarato) com redução de NAD⁺ e ligação do radical remanescente (acetil ou succinil) à coenzima A, com participação de TPP, ácido lipóico e FAD; esta reação, portanto, também libera CO₂ e reduz NAD⁺. A *succinil-CoA sintetase* catalisa a transformação de succinil-CoA a succinato, em uma reação que forma GTP (guanosina trifosfato), a partir de GDP (guanosina difosfato) e P_i. O GTP (Fig. 10.3) tem o mesmo nível energético do ATP e, portanto, a formação de GTP equivale à formação de ATP: o GTP pode transferir um grupo fosfato ao ADP, produzindo ATP e regenerando GDP, por ação da *nucleosídeo difosfato quinase*:



O succinato é oxidado a fumarato pela *succinato desidrogenase*, cujo grupo prostético, FAD, é reduzido a FADH₂. A succinato desidrogenase é a única enzima do ciclo de Krebs que é parte integrante da membrana interna da mitocôndria; as demais estão em forma solúvel na matriz mitocondrial. O fumarato é hidratado a malato pela *fumarase*. A *malato desidrogenase* oxida o malato a oxaloacetato, reduzindo NAD⁺ e fechando o ciclo. Como o oxaloacetato é sempre regenerado ao final de cada volta, o ciclo de Krebs pode oxidar acetil-CoA continuamente, sem gasto efetivo de oxaloacetato.

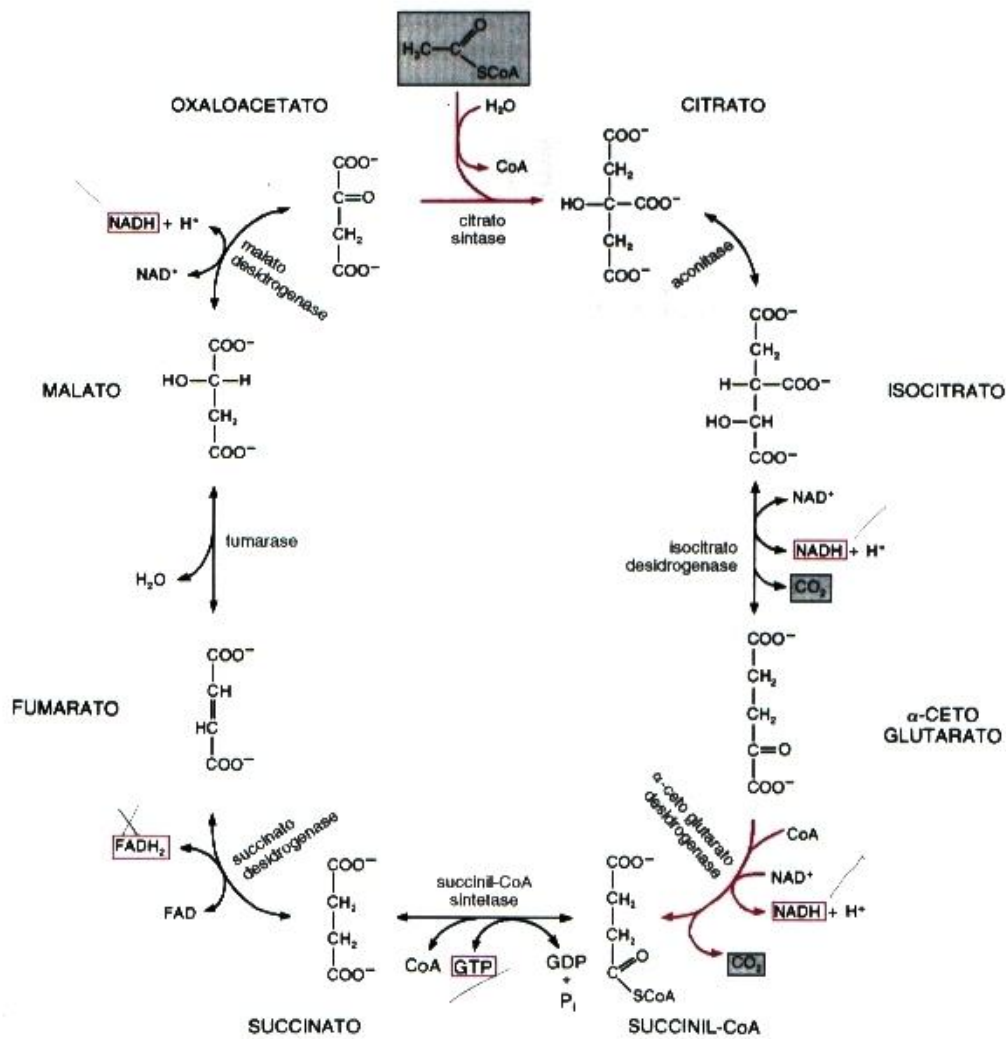


Fig. 10.1 Ciclo de Krebs.

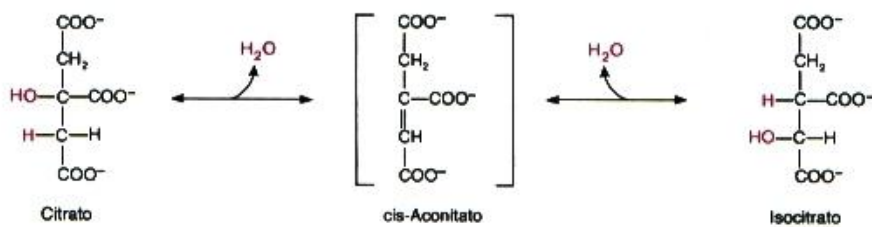


Fig. 10.2 Isomerização de citrato a isocitrato: durante a reação, forma-se transitoriamente cis-aconitato.

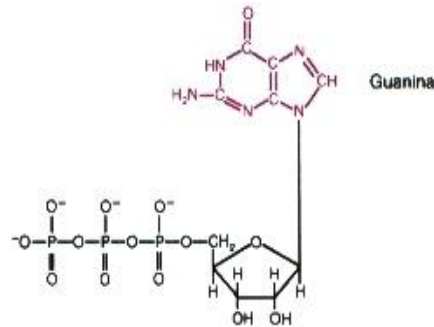


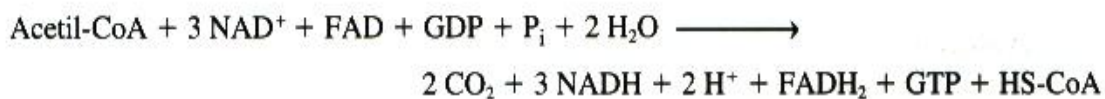
Fig. 10.3 O GTP difere do ATP por conter guanina como base nitrogenada.

Observa-se, pela descrição das reações que o compõem, que o ciclo de Krebs é uma via eminentemente oxidativa para a acetil-CoA: os átomos de carbono do seu radical acetil são estequiometricamente convertidos a CO_2 , e em paralelo a esta oxidação são reduzidos 3 NAD^+ e 1 FAD .

A maior parte das reações do ciclo de Krebs é reversível, mas o sentido do ciclo é determinado pela irreversibilidade das reações catalisadas pela citrato sintase e α -cetoglutarato desidrogenase (setas coloridas na Fig. 10.1). Esta última reação mantém baixas as concentrações de α -cetoglutarato e, indiretamente, de isocitrato. Assim, apesar de o equilíbrio da reação catalisada pela aconitase favorecer acentuadamente a formação de citrato, este composto não se acumula na mitocôndria enquanto se processar a oxidação de isocitrato.

O ciclo de Krebs depende da cadeia de transporte de elétrons para a reoxidação de coenzimas

A equação geral do ciclo de Krebs é:

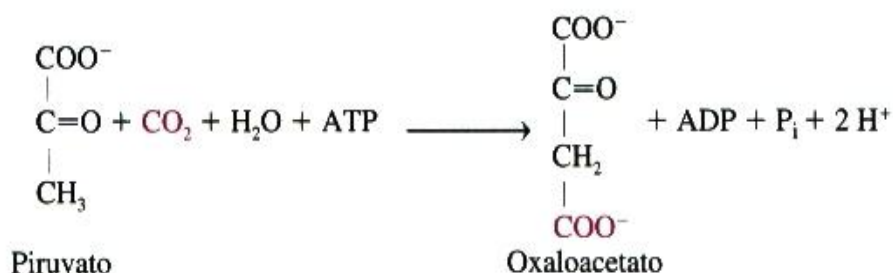


Embora o ciclo de Krebs produza diretamente apenas 1 ATP, contribui para a formação de grande parte do ATP produzido pela célula, pois a energia da oxidação da acetil-CoA é conservada sob a forma de coenzimas reduzidas e, posteriormente, usada para síntese de ATP. A oxidação das coenzimas é obrigatoriamente feita pela cadeia de transporte de elétrons e, portanto, o ciclo de Krebs, assim como a conversão de piruvato a acetil-CoA, só pode funcionar em condições aeróbias, ao contrário da glicólise.

10.2 FUNÇÃO ANABÓLICA DO CICLO DE KREBS

A redução de coenzimas não é a única função do ciclo de Krebs

Os compostos intermediários do ciclo de Krebs podem ser utilizados como precursores em vias biossintéticas: oxaloacetato e α -cetoglutarato formam aspartato e glutamato, respectivamente; succinil-CoA é precursora do grupo heme etc. A eventual retirada desses intermediários pode ser compensada por reações que permitem restabelecer o seu nível. Entre essas reações, chamadas *reações anapleróticas* (reações de preenchimento), a mais importante é a que leva à formação de oxaloacetato a partir do piruvato, catalisada pela *piruvato carboxilase*:



O oxaloacetato, além de ser um intermediário do ciclo de Krebs, participa da gliconeogênese. No capítulo referente a esta via metabólica (Capítulo 14), a reação catalisada pela piruvato carboxilase será analisada com maiores detalhes.

A degradação de vários aminoácidos também produz intermediários do ciclo de Krebs, constituindo reações anapleróticas adicionais.

A atividade da piruvato carboxilase permite regular a velocidade do ciclo de Krebs

A regulação completa do ciclo de Krebs será descrita no Capítulo 20. Neste ponto, entretanto, é conveniente antecipar um aspecto importante desta regulação que permite entender a relação entre a glicólise e o próprio ciclo.

No ciclo de Krebs, o oxaloacetato tem um papel até certo ponto catalítico: como não é efetivamente consumido pelas reações do ciclo, já que é repostado pela última reação, teoricamente com apenas uma molécula de oxaloacetato poder-se-ia oxidar uma quantidade qualquer de acetil-CoA. Entretanto, a velocidade com que esta oxidação ocorreria seria muito baixa, uma vez que, após a condensação de acetil-CoA com oxaloacetato, iniciando o ciclo, novas moléculas de acetil-CoA só poderiam ser oxidadas quando, ao final das reações do ciclo, o oxaloacetato fosse regenerado. O ajuste da velocidade de consumo de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs à sua própria concentração é feito por intervenção da reação catalisada pela piruvato carboxilase. *Esta enzima é fortemente ativada pela própria acetil-CoA.* Desta forma, quando, por exemplo, a glicólise é intensa e grande quantidade de piruvato é transformada em acetil-CoA, o acúmulo desta coenzima ativa a piruvato carboxilase e o piruvato passa a originar oxaloacetato. Com concentrações concomitantemente altas de oxaloacetato e acetil-CoA, a citrato sintase, que dá início ao ciclo, pode funcionar a velocidades altas.

10.3 CICLO DO GLIOXILATO

O ciclo do glioxilato permite a síntese de glicose a partir de acetil-CoA

Nos vegetais e em algumas bactérias, encontra-se uma via alternativa de metabolismo de acetil-CoA, chamada *ciclo do glioxilato* (Fig. 10.4), que permite a produção líquida de intermediários do ciclo a partir de acetil-CoA. Esta via conta com a participação de enzimas do ciclo de Krebs, além de duas enzimas **ausentes de tecidos animais**: a *isocitrato liase* e a *malato sintase*. Por ação da isocitrato liase, o isocitrato é cindido em succinato e glioxilato; o glioxilato condensa-se com acetil-CoA, produzindo malato, na reação catalisada pela malato sintase. Nos vegetais, estas duas enzimas localizam-se em organelas chamadas *glioxissomos*, que também efetuam a oxidação de ácidos graxos e têm, portanto, uma fonte de acetil-CoA.

No ciclo de Krebs, isocitrato converte-se em succinato através de reações que envolvem a perda de dois carbonos, sob a forma de CO_2 . No ciclo do glioxilato, os seis carbonos de isocitrato originam succinato (C_4) e glioxilato (C_2). O succinato regenera o oxaloacetato e o glioxilato reage com outra molécula de acetil-CoA, formando malato. *O ciclo do glioxilato consome, portanto, duas moléculas de acetil-CoA ($\text{C}_2 + \text{C}_2$) e produz uma molécula de malato (C_4).*

A conversão de acetil-CoA em glicose nos vegetais envolve a participação de diferentes compartimentos celulares. Os glioxissomos são incapazes de utilizar o succinato, que é transportado para a mitocôndria, onde será convertido a oxaloacetato (que, portanto, é regenerado) através das reações do ciclo de Krebs. O glioxilato, ainda nos glioxissomos, reage com acetil-CoA, formando malato, que passa para o citossol, onde origina oxaloacetato, que pode ser transformado em glicose pelas reações da gliconeogênese.

O ciclo de glioxilato, dessa forma, permite a conversão da acetil-CoA e, portanto, de ácidos graxos, a glicose. **Esta é uma impossibilidade metabólica dos animais**, pois, no ciclo de Krebs, para cada molécula de acetil-CoA introduzida, são liberadas duas moléculas de CO_2 , não havendo, assim, ganho líquido de carbonos para a formação de oxaloacetato.

O ciclo do glioxilato é particularmente ativo em sementes em germinação, para a transformação de suas reservas lipídicas em glicose, precursor da celulose. Este ciclo possibilita, ainda, a certas bactérias, crescerem em meios contendo apenas ácidos graxos como fonte de carbonos.

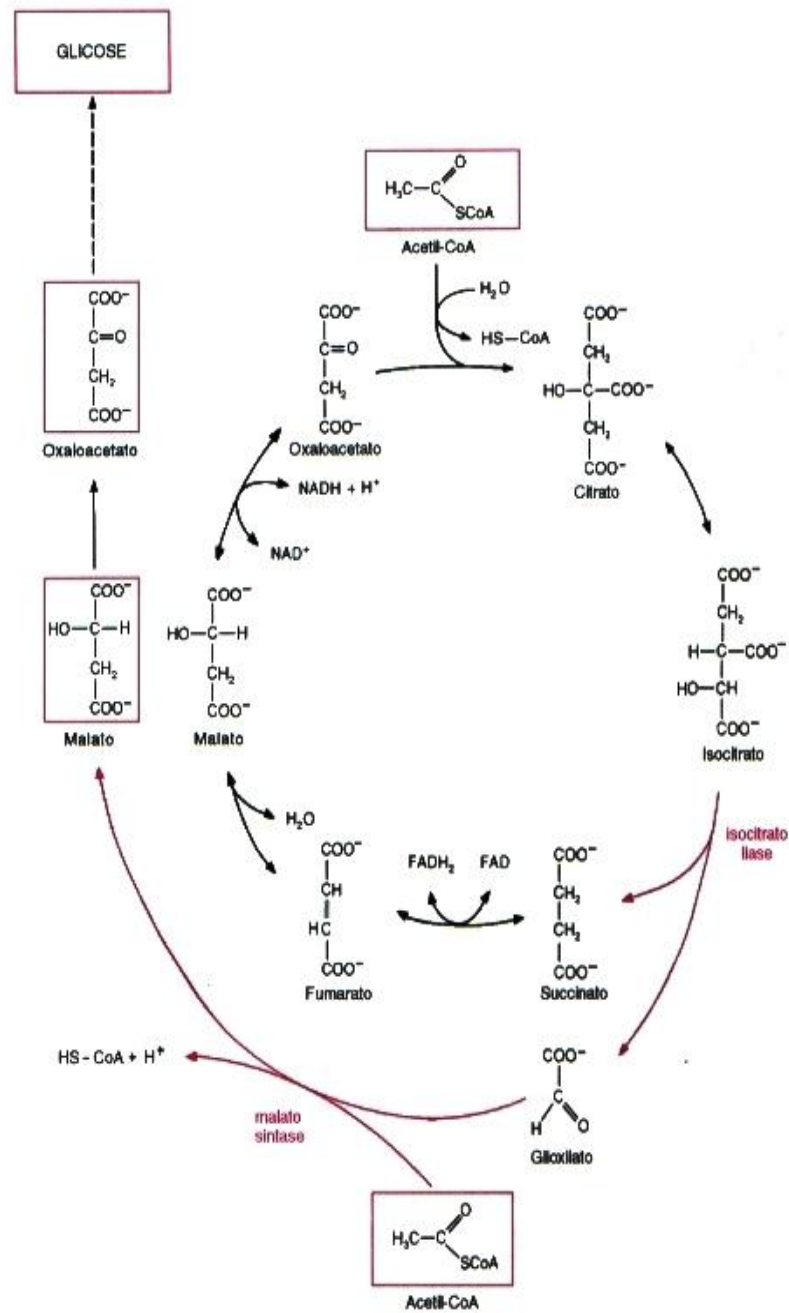


Fig. 10.4 Ciclo do glioxilato. As enzimas isocitrato liase e malato sintase (em vermelho), presentes em plantas e bactérias, permitem a síntese líquida de malato e, portanto, de oxaloacetato a partir de acetil-CoA. No citossol, o oxaloacetato pode originar glicose.

11

CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

11.1 OXIDAÇÃO DE COENZIMAS E SÍNTESE DE ATP

Os processos de oxidação da glicose, de vários aminoácidos e de ácidos graxos levam à produção de acetil-CoA, que, no ciclo de Krebs, é totalmente oxidada a CO_2 . O ciclo de Krebs constitui, portanto, o estágio final e máximo de oxidação dos átomos de carbono que compõem os carboidratos, proteínas e lipídios. A oxidação destes compostos é acompanhada da redução de grande quantidade das coenzimas NAD^+ e FAD . Para exemplificar, pode-se computar o número de mols destas coenzimas reduzidas durante a oxidação de um mol de glicose. O resultado está apresentado no quadro seguinte:

Reação	Mols de NADH	Mols de FADH_2
Glicólise		
Gliceraldeído 3-fosfato \rightarrow 1,3-Bisfosfoglicerato	2	—
Piruvato \rightarrow Acetil-CoA	2	—
Ciclo de Krebs		
Isocitrato \rightarrow α -Cetoglutarato	2	—
α -Cetoglutarato \rightarrow Succinil-CoA	2	—
Malato \rightarrow Oxaloacetato	2	—
Succinato \rightarrow Fumarato	—	2
Total	10	2

Concomitantemente, há produção de 4 mols de ATP: 2 mols de saldo da glicólise e 2 mols produzidos como GTP no ciclo de Krebs. Do ponto de vista energético, verifica-se, então, que da energia total inicialmente disponível na molécula de glicose, uma fração muito pequena levou à produção de ATP; a maior parte foi conservada nas coenzimas reduzidas. Este fenômeno repete-se na oxidação de aminoácidos e lipídios: há uma pequena síntese direta de ATP ao longo das reações de sua degradação e a maior parte da energia disponível

é armazenada em coenzimas reduzidas. Estas coenzimas devem ser reoxidadas por duas razões. Primeiramente, para que, voltando à forma oxidada, possam participar outra vez das vias de degradação dos nutrientes. Em segundo lugar, é a partir da oxidação destas coenzimas que a energia nelas conservada pode ser aproveitada pelas células, para sintetizar ATP. As células aeróbias produzem a maior parte do seu ATP por oxidação das coenzimas pelo O_2 , através de uma cadeia de transporte de elétrons, à qual está intimamente associada a fosforilação oxidativa, ou seja, a síntese de ATP.

A oxidação de coenzimas libera grande quantidade de energia

Nos organismos aeróbios, a oxidação das coenzimas é feita por transferência de seus elétrons para o oxigênio; recebendo elétrons, o oxigênio liga-se a prótons do meio, formando água. Este processo libera grande quantidade de energia, em virtude da diferença de potenciais de óxido-redução (Capítulo 4) entre a coenzima reduzida e o oxigênio, como será visto pelo cálculo a seguir. O potencial de óxido-redução de $NAD^+/NADH$ vale $-0,32$ V, e o potencial de O_2/H_2O vale $+0,82$ V. Usando a expressão

$$\Delta G^{\circ} = -nF \cdot \Delta E^{\circ}$$

pode-se calcular o valor de ΔG° para a transferência de 2 elétrons do NADH para o oxigênio:

$$\begin{aligned} \Delta G^{\circ} &= -2 \times 96,5 \times [0,82 - (-0,32)] \\ \Delta G^{\circ} &= -220 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \end{aligned}$$

O valor encontrado é bastante alto quando comparado ao valor de ΔG° da síntese de ATP, $31 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Em outras palavras, do ponto de vista meramente quantitativo, a energia liberada na oxidação de um mol de NADH permite a síntese de alguns mols de ATP. A questão fundamental, entretanto, é: como aproveitar esta energia? Se a transferência de elétrons das coenzimas reduzidas fosse feita diretamente para o oxigênio, toda a energia do processo seria liberada como calor, portanto, inutilizável pelas células para promover os processos que requerem energia. Vale lembrar que a única forma de energia utilizável pelas células em tais processos é a energia química presente no ATP. Segue-se, portanto, a descrição de *como* esta energia é aproveitada pelas células para a síntese de ATP.

11.2 CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

A estratégia adotada pelas células consiste em transformar a energia contida nas coenzimas reduzidas em um *gradiente de prótons* e utilizar este gradiente para promover a síntese de ATP. A primeira parte deste processo, ou seja, a produção do gradiente de prótons, é conseguida pela transferência dos elétrons das coenzimas para o oxigênio, não diretamente, mas através de passagens intermediárias por vários compostos, que constituem uma *cadeia de transporte de elétrons*. Para cumprir esta função, os compostos selecionados para compor a cadeia de transporte de elétrons são organizados de acordo com seus potenciais de óxido-redução. Assim, os elétrons partem da coenzima reduzida, que tem potencial de óxido-redução menor que os componentes da cadeia de transporte de elétrons, e percorrem uma seqüência de transportadores com potenciais de óxido-redução crescentes, até atingirem o oxigênio, que tem o maior potencial de óxido-redução. As transferências de elétrons entre estes compostos são sempre, portanto, acompanhadas de queda de energia livre (ver equação anterior). O transporte de elétrons é facilitado 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. Ao mesmo tempo que as passagens de elétrons se processam, forma-se um gradiente de prótons, ou seja, estabelece-se uma concentração de prótons diferente de cada lado da membrana onde ocorre o transporte de elétrons. A síntese de ATP é possível porque aproveita a energia potencial contida no gradiente de prótons. Esta síntese consiste na fosforilação do ADP ($ADP + P_i \rightarrow ATP$) e, por utilizar a energia derivada da oxidação das coenzimas, é denominada *fosforilação oxidativa*.

Os transportadores de elétrons estão agrupados em quatro complexos

A oxidação das coenzimas reduzidas pela cadeia de transporte de elétrons processa-se na membrana interna da mitocôndria, da qual fazem parte os componentes da cadeia. Estes componentes, cuja natureza química será descrita mais adiante, agrupam-se em quatro complexos, designados I, II, III e IV. Sua posição na membrana interna da mitocôndria está esquematizada na Fig. 11.1, e sua composição, no Quadro 11.1. Sem fazer parte de complexos, aparecem ainda dois componentes da cadeia de transporte de elétrons: a coenzima Q (CoQ), que conecta os Complexos I e II ao Complexo III, e o citocromo *c*, que conecta o Complexo III ao Complexo IV. Os elétrons presentes no NADH são transferidos desta coenzima para o Complexo I, do Complexo I para a coenzima Q, depois para o Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e finalmente para o oxigênio. Os elétrons presentes no succinato e em outros substratos têm uma entrada especial na cadeia de transporte de elétrons: são transferidos ao Complexo II e deste para a coenzima Q; deste ponto em diante, seguem o caminho comum: Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e oxigênio. Estas transferências são possíveis porque todos os compostos presentes nos complexos, mais a coenzima Q e o citocromo *c*, podem apresentar-se nos estados reduzido e oxidado — ao receberem um elétron do componente anterior da cadeia, reduzem-se; transferindo o elétron para o componente seguinte, oxidam-se e estão aptas a receber elétrons novamente.

Com exceção da coenzima Q, todos os componentes da cadeia de transporte de elétrons são proteínas. A estas proteínas estão associados grupos prostéticos, como FAD, FMN e centros ferro-enxofre (centros Fe-S). As estruturas destes componentes serão apresentadas junto à composição de cada complexo. Os potenciais de óxido-redução padrão dos componentes da cadeia de transporte de elétrons estão apresentados no Quadro 11.2.

Quadro 11.1 Composição dos complexos da cadeia de transporte de elétrons

	Componentes transportadores de elétrons	Número aproximado de polipeptídios
Complexo I (NADH-CoQ redutase)	FMN Centros Fe-S	26
Complexo II (Succinato-CoQ redutase)	FAD Centros Fe-S Citocromo <i>b</i>	5
Complexo III (CoQ-citocromo <i>c</i> redutase)	Citocromos <i>b</i> e <i>c</i> , Centro Fe-S	10
Complexo IV (Citocromo <i>c</i> oxidase)	Citocromos <i>a</i> e <i>a</i> ₃ , Íons de cobre	6-13

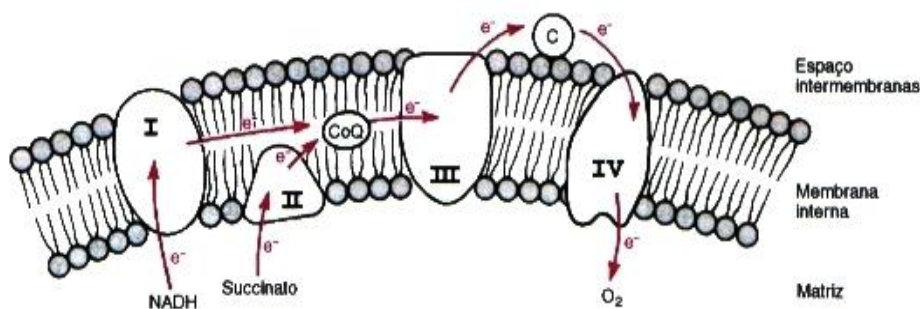


Fig. 11.1 Disposição dos Complexos I, II, III e IV, transportadores de elétrons, na membrana interna da mitocôndria. As setas indicam a trajetória dos elétrons provenientes do NADH ou do succinato até o oxigênio. C: citocromo *c*.

Quadro 11.2 Potenciais de óxido-redução padrão dos componentes da cadeia de transporte de elétrons

Par oxidado/reduzido	E° (volts)
NAD ⁺ /NADH	-0,32
Complexo I	
FMN/FMNH ₂	-0,30
Centros Fe-S ox/red ¹	-0,38 a -0,27
Succinato/Fumarato	+0,03
Complexo II	
FAD/FADH ₂	-0,04
Centros Fe-S ox/red	-0,03 a +0,06
Citocromo b ₅₆₀ ox/red ¹	-0,08
CoQ/CoQH ₂	+0,05
Complexo III	
Citocromo b ₅₆₂ ox/red	+0,03
Citocromo b ₅₆₆ ox/red	-0,03
Centros Fe-S ox/red	+0,28
Citocromo c ₁ ox/red	+0,22
Citocromo c ox/red	+0,24
Complexo IV	
Citocromo a ox/red	+0,29
Cu ²⁺ /Cu ¹⁺	+0,34
Citocromo a ₃ ox/red	+0,55
O ₂ /H ₂ O	+0,82

¹As formas oxidada e reduzida dos centros Fe-S e citocromos contêm Fe³⁺ e Fe²⁺, respectivamente.

O Complexo I oxida o NADH, transferindo seus elétrons para a coenzima Q

O Complexo I, também chamado *NADH-coenzima Q redutase*, é um complexo enorme, formado por cerca de 26 cadeias polipeptídicas. A estas cadeias estão associados: uma molécula de flavina mononucleotídeo (FMN) e 6 ou 7 centros ferro-enxofre (Fig. 11.2). A *flavina mononucleotídeo (FMN)* é um derivado de riboflavina, com estrutura semelhante à do FAD, e, como este, capaz de receber 2 prótons e 2 elétrons, passando à forma reduzida FMNH₂ (Fig. 11.3).

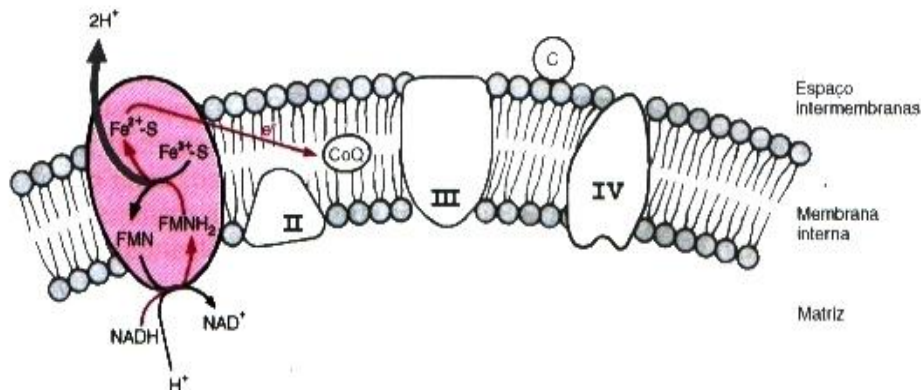


Fig. 11.2 Transferências de elétrons através do Complexo I. As setas coloridas indicam o caminho que percorrem: são doados do NADH ao FMN, e, deste, a centros Fe-S para então serem transferidos à CoQ. A seta cinza indica movimentação de prótons.

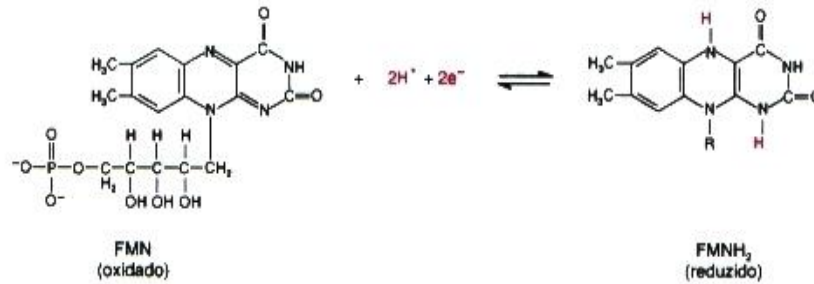
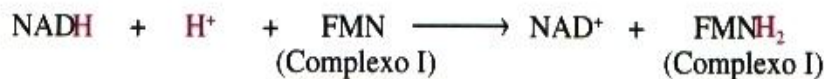


Fig. 11.3 Estruturas das formas oxidada e reduzida da flavina mononucleotídio (FMN).

O doador de elétrons para a redução de FMN, que constitui a primeira transferência de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons, é o NADH produzido por várias reações do metabolismo. São exemplos de reações produtoras de NADH as reações de oxidação de gliceraldeído 3-fosfato (glicólise), piruvato (conversão piruvato → acetil-CoA), isocitrato, α -cetoglutarato e malato (ciclo de Krebs) e β -hidroxiacil-CoA (ciclo de Lynen), todas catalisadas por desidrogenases. A disposição do Complexo I na membrana favorece esta transferência (exceto no caso da reação da glicólise, que se processa no citossol), uma vez que a região à qual o NADH se liga está voltada para a matriz mitocondrial. A reação processada é:



O resultado desta etapa é, portanto, a oxidação do NADH e a entrada dos elétrons na membrana interna da mitocôndria, de onde só sairão para serem doados ao oxigênio, no final da cadeia.

Os *centros ferro-enxofre* (*Fe-S*), presentes no Complexo I e também nos Complexos II e III, são formados de íons de ferro e de enxofre, podendo apresentar diversas configurações. Estão associados a cadeias polipeptídicas através de ligação a resíduos de cisteína (Fig. 11.4). As proteínas que contêm centros desta natureza são chamadas *proteínas ferro-enxofre* (ou *proteínas com ferro não-hêmico*, para indicar que o íon de ferro não faz parte de um grupo heme). Os centros *Fe-S* não recebem prótons; são transportadores de elétrons unicamente, recebidos pelo íon de ferro, cuja valência é alterada de Fe^{3+} para Fe^{2+} .

Continuando seu percurso, os elétrons do FMNH_2 são transferidos para o primeiro centro *Fe-S*; depois, através de passagens intermediárias por outros centros *Fe-S*, deixam o Complexo I, sendo entregues à coenzima Q.

Neste ponto deve ser analisado um fenômeno essencial da cadeia de transporte de elétrons, referente à movimentação dos prótons. Como foi assinalado, os centros *Fe-S* não recebem prótons. Por isto, no processo de transferência de elétrons do FMNH_2 para estes centros, os prótons são excluídos, sendo transferidos da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranas. Observa-se aqui, portanto, a primeira etapa da formação do gradiente de prótons: da matriz mitocondrial são retirados prótons (provenientes de $\text{NADH} + \text{H}^+$);

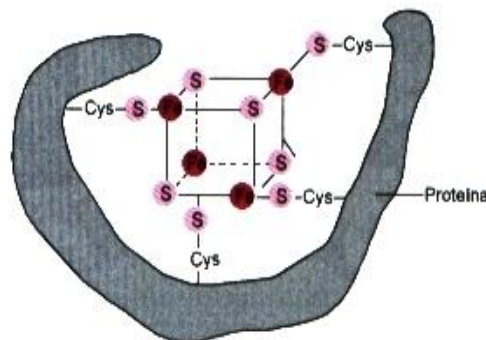


Fig. 11.4 Estrutura de um centro ferro-enxofre do tipo $\text{Fe}_4\text{-S}_4$. Os átomos de ferro estão ligados a átomos de enxofre inorgânico e a resíduos de cisteína da proteína ferro-enxofre. São possíveis outros arranjos, do tipo Fe-S e $\text{Fe}_2\text{-S}_2$.

no espaço intermembranas são introduzidos prótons. Este processo, que irá repetir-se outras vezes ao longo das transferências de elétrons, termina por gerar uma diferença de concentração de prótons apreciável entre a matriz e o espaço intermembranas.

O Complexo II oxida o succinato, transferindo seus elétrons também para a coenzima Q

O Complexo II, também chamado *succinato-coenzima Q redutase*, representa uma segunda porta de entrada de elétrons na cadeia de transporte de elétrons, em direção ao oxigênio. De fato, faz parte deste complexo a enzima succinato desidrogenase, a única enzima do ciclo de Krebs presente na membrana e não na matriz mitocondrial. Esta enzima tem FAD como grupo prostético e catalisa a oxidação de succinato a fumarato: os elétrons e os prótons do succinato são transferidos para o FAD, que se reduz a FADH₂. Também fazem parte do Complexo II (Fig. 11.5) alguns centros Fe-S e o *citocromo b₅₆₀* (a estrutura dos citocromos será descrita mais adiante). Por estes componentes passam os elétrons derivados do FADH₂, antes de, finalmente, serem doados à coenzima Q. Nem os centros Fe-S nem o citocromo b₅₆₀ recebem prótons; os prótons presentes no FADH₂ são devolvidos à matriz mitocondrial. Em outras palavras, o Complexo II *não* contribui para a formação do gradiente de prótons, talvez porque o valor de ΔE° e, conseqüentemente, o valor de ΔG° para a transferência de elétrons do succinato à coenzima Q seja muito pequeno ou ainda porque este complexo, ao contrário do Complexo I, não atinja a parte externa da membrana, tendo contato apenas com a matriz mitocondrial.

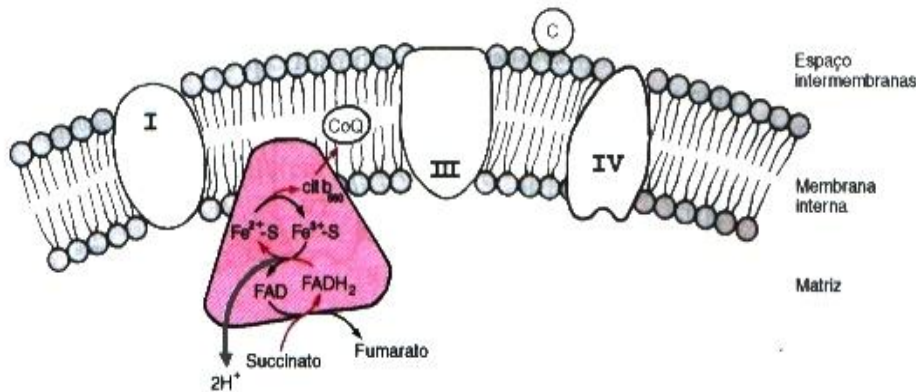


Fig. 11.5 No Complexo II, os elétrons provenientes do succinato são transferidos ao FAD, grupo prostético da succinato desidrogenase; a seguir são captados por centros Fe-S e pelo citocromo b₅₆₀, passando, então, para a coenzima Q.

A coenzima Q é o ponto de convergência de elétrons provenientes de NADH (Complexo I), succinato (Complexo II), glicerol 3-fosfato e acil-CoA

A *coenzima Q* ou *ubiquinona* (*CoQ* ou *Q*) é uma quinona com uma longa cadeia lateral composta de unidades isoprênicas. Em diferentes organismos, existem várias formas de CoQ, que diferem pelo número dessas unidades. A forma mais comum encontrada nos mamíferos apresenta 10 unidades. As características hidrofóbicas da CoQ permitem sua mobilidade na fase lipídica da membrana, ao contrário dos outros componentes da cadeia de transporte de elétrons, que têm posições relativamente fixas na membrana mitocondrial, com exceção do citocromo *c*. A coenzima Q recebe 2 prótons e 2 elétrons, passando à forma reduzida, QH₂. A redução ocorre através de uma forma parcialmente reduzida, a semiquinona (Fig. 11.6).

A coenzima Q, como foi visto, recebe os elétrons provenientes dos Complexos I e II. Adicionalmente, existem outras vias de transferência de elétrons também convergentes para a coenzima Q. Nestas vias, o substrato é oxidado por uma desidrogenase, que é uma flavoproteína, com redução de FAD a FADH₂; os elétrons, depois de passarem por compostos intermediários, são entregues à coenzima Q. Exemplos deste tipo de substrato são encontrados no metabolismo de triacilgliceróis (Capítulo 16). Um deles, o glicerol 3-fosfato, origina

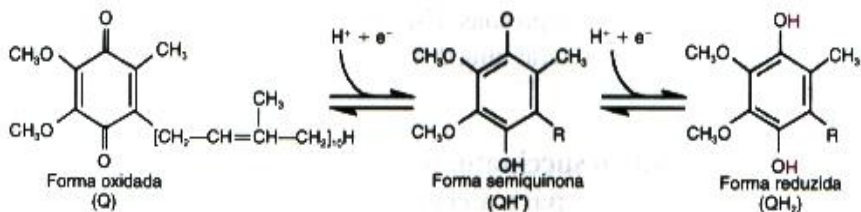


Fig. 11.6 Formas da coenzima Q. A forma oxidada (Q) reage com um próton e um elétron, convertendo-se na forma semiquinona (QH[•]); a incorporação de mais um próton e um elétron resulta na forma totalmente reduzida (QH₂).

diidroxiacetona fosfato, por ação da *glicerol 3-fosfato desidrogenase*, localizada na face externa da membrana interna da mitocôndria. Os elétrons do substrato passam para o FAD e um centro Fe-S associados à enzima e, em seguida, para a coenzima Q. Uma outra via que reduz CoQ inicia-se com a oxidação de acil-CoA (primeira reação da β-oxidação de ácidos graxos, p. 197), catalisada pela *acil-CoA desidrogenase*, cuja coenzima, FAD, é reduzida. Os elétrons do FADH₂ são transferidos, pela *ETF* (da denominação inglesa para *flavoproteína transferidora de elétrons*), para uma outra flavoproteína, que contém um centro Fe-S, a *ETF-ubiquinona óxido-redutase*, que, finalmente, doa o par de elétrons para a coenzima Q (Fig. 11.7 a).

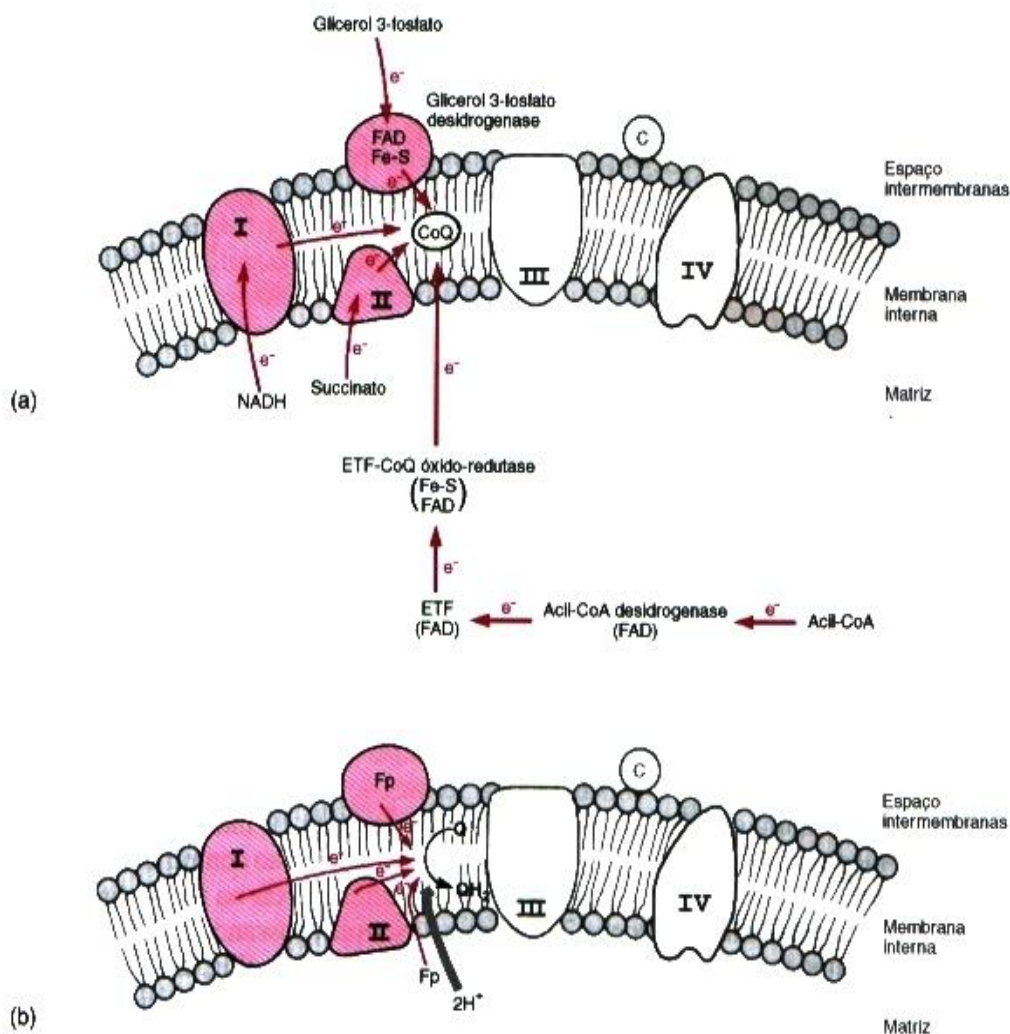


Fig. 11.7 a) A coenzima Q é o ponto de convergência dos elétrons provenientes do Complexo I, do Complexo II, do glicerol 3-fosfato e acil-CoA. ETF: flavoproteína transferidora de elétrons. b) A redução de uma molécula de coenzima Q consome dois prótons da matriz mitocondrial. Fp: flavoproteínas.

Deve-se notar que os compostos que transferem elétrons para a coenzima Q, quer estejam presentes no Complexo I, no Complexo II ou nas flavoproteínas citadas, não transferem prótons. Ao receber elétrons, a coenzima Q retira prótons da matriz mitocondrial, convertendo-se na forma reduzida, QH_2 (Fig. 11.7 b). Por outro lado, o componente seguinte da cadeia de transporte de elétrons, o Complexo III, que recebe elétrons de QH_2 , não recebe prótons e estes sofrem extrusão para o espaço intermembranas. Esta é, portanto, mais uma transferência de elétrons que contribui para a formação do gradiente de prótons.

Os elétrons das diferentes procedências descritas percorrem, a partir da coenzima Q, um caminho comum até o oxigênio; desta trajetória fazem parte centros Fe-S, átomos de cobre e vários citocromos. A estrutura dos citocromos, as proteínas mais típicas da cadeia de transporte de elétrons, será descrita a seguir.

Citocromos de vários tipos participam da cadeia de transporte de elétrons

Os citocromos são proteínas transportadoras de elétrons, que contêm heme (Fig. 3.2) como grupo prostético. Em células de eucariotos, proteínas deste tipo fazem parte da membrana interna da mitocôndria, das membranas do retículo endoplasmático e da membrana tilacóide dos cloroplastos; em bactérias, fazem parte da membrana plasmática. Em todas essas membranas ocorre transporte de elétrons. O íon de ferro presente no grupo heme é responsável pela capacidade de transferência de elétrons destas proteínas: o íon pode alternar entre os estados de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} .

Os citocromos são classificados em *a*, *b* e *c*, segundo o espectro de absorção que apresentam. Os três tipos estão representados na cadeia de transporte de elétrons. Naturalmente, cada citocromo é constituído por uma cadeia polipeptídica com uma seqüência de aminoácidos que lhe é própria. Nos citocromos dos tipos *b* e *c*, o heme é idêntico ao da hemoglobina quanto aos radicais substituintes; no tipo *a* aparece um heme modificado, com um grupo isoprênico e um grupo formila em lugar de grupos vinila e metila, respectivamente. Os citocromos diferem também quanto à forma com que o grupo heme está ligado à cadeia proteica. Nos tipos *a* e *b*, a ligação à proteína é não-covalente e, no tipo *c*, é covalente (tioéter), formada com resíduos de cisteína (Fig. 11.8). Os citocromos também diferem quanto aos ligantes axiais do íon ferro: no caso dos citocromos *a*

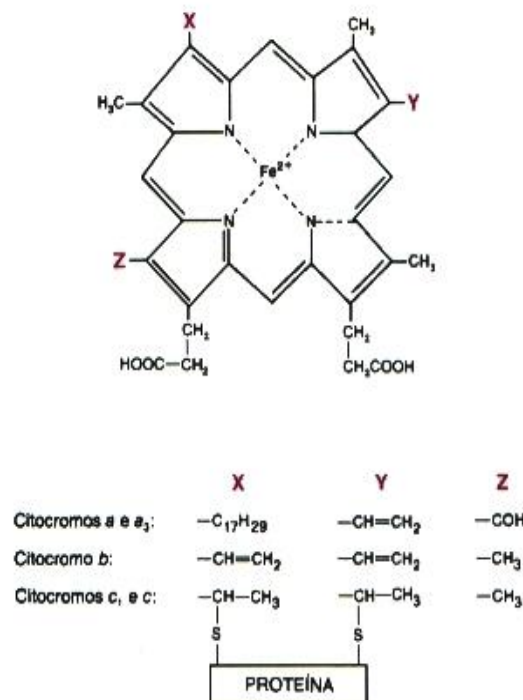


Fig. 11.8 Estrutura dos grupos prostéticos dos citocromos. Os citocromos dos tipos *a*, *b* e *c* apresentam o grupo heme caracterizado pelos substituintes indicados na figura. Nos citocromos do tipo *c*, o grupo heme estabelece ligações tioéter com resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica; nos outros dois tipos, a ligação é não-covalente.

e *b*, as ligações axiais são feitas com resíduos de histidina da cadeia proteica; nos citocromos do tipo *c*, uma das ligações é feita com histidina, a outra com cisteína.

O Complexo III transfere elétrons da coenzima Q para o citocromo *c*

O Complexo III, também chamado *coenzima Q-citocromo c redutase*, é constituído por dois citocromos *b* (b_{562} e b_{566} — o índice indica, em nanômetros, o pico máximo de absorção e caracteriza cada subtipo de citocromo), por um centro Fe-S e pelo citocromo c_1 . As transferências de elétrons da coenzima Q para os componentes do Complexo III, e deste para o citocromo *c*, são acompanhadas de movimento de prótons: os citocromos e o centro Fe-S recebem apenas elétrons, e os prótons presentes na coenzima Q reduzida (QH_2) são liberados no espaço intermembranas. Acredita-se, ainda, que mais dois prótons são translocados da matriz para o exterior da mitocôndria durante a interação entre a coenzima Q e o Complexo III. Esta interação ocorre através do proposto *ciclo Q*, que consta de duas etapas, nas quais os dois elétrons de QH_2 são passados, um a um, para o citocromo *c*, com a formação intermediária da semiquinona, QH^\bullet .

Na primeira etapa (Fig. 11.9 a), QH_2 perde 1 elétron e 1 próton, formando QH^\bullet : o elétron segue a rota $\text{QH}_2 \rightarrow \text{Fe-S} \rightarrow c_1 \rightarrow c$ e o H^+ é liberado no espaço intermembranas. A semiquinona converte-se na forma oxidada, Q, por transferência de seu elétron aos citocromos *b* e por extrusão do próton. O elétron volta para Q, que reage com um H^+ da matriz, reconstituindo QH^\bullet . A transferência de um dos elétrons de QH_2 para o citocromo *c* resulta, portanto, na extrusão de 2 H^+ e no consumo de um H^+ da matriz para formar QH^\bullet .

Na segunda etapa (Fig. 11.9 b), outra molécula de QH_2 percorre a mesma seqüência de reações que na primeira etapa, até a passagem do elétron para os citocromos *b* e formação de Q. Na presente etapa, esse elétron é utilizado para reduzir a semiquinona formada na etapa anterior (QH^\bullet), e, à custa de um H^+ do interior da mitocôndria, regenerar QH_2 . A redução da segunda molécula de citocromo *c* promove a extrusão de mais 2 H^+ , o consumo de um outro H^+ da matriz, a regeneração da molécula de QH_2 consumida e a produção da forma oxidada, Q, que se torna disponível para receber elétrons dos componentes da cadeia que a antecedem (Complexo I, II etc.).

O ciclo Q pode ser assim resumido:

Primeira etapa	Segunda etapa
$\text{QH}_2 \rightarrow \text{QH}^\bullet$	$\text{QH}_2 \rightarrow \text{Q}$
$\text{cit } c (\text{Fe}^{3+}) \rightarrow \text{cit } c (\text{Fe}^{2+})$	$\text{QH}^\bullet \rightarrow \text{QH}_2$
$1 \text{ H}^+ \text{ matriz} \rightarrow 2 \text{ H}^+ \text{ exterior}$	$\text{cit } c (\text{Fe}^{3+}) \rightarrow \text{cit } c (\text{Fe}^{2+})$
	$1 \text{ H}^+ \text{ matriz} \rightarrow 2 \text{ H}^+ \text{ exterior}$



Deste modo, o Complexo III, além de promover a oxidação da coenzima Q e a redução do citocromo *c*, contribui decisivamente para a criação do gradiente de prótons.

O citocromo *c* é uma proteína pequena, situada na face externa da membrana interna da mitocôndria

Ao contrário dos outros citocromos, que são proteínas integradas, o citocromo *c* é uma proteína periférica e relativamente pequena. Seu tamanho e mobilidade permitem-lhe cumprir sua função na cadeia de transporte de elétrons, qual seja, a de conectar o Complexo III, do qual recebe elétrons, ao Complexo IV, ao qual doa elétrons.

O Complexo IV transfere elétrons para o oxigênio

O Complexo IV, também chamado *citocromo c oxidase*, contém dois citocromos do tipo *a* (*a* e a_3) e dois íons de cobre, cada qual associado a um dos dois citocromos. Os íons de cobre, alternando entre os estados de oxidação Cu^{2+} e Cu^{1+} , fazem parte do transporte de elétrons. O Complexo IV é responsável pela doação de quatro elétrons para a molécula de oxigênio (O_2), que, ligando-se a prótons do meio, converte-se em $2 \text{ H}_2\text{O}$.

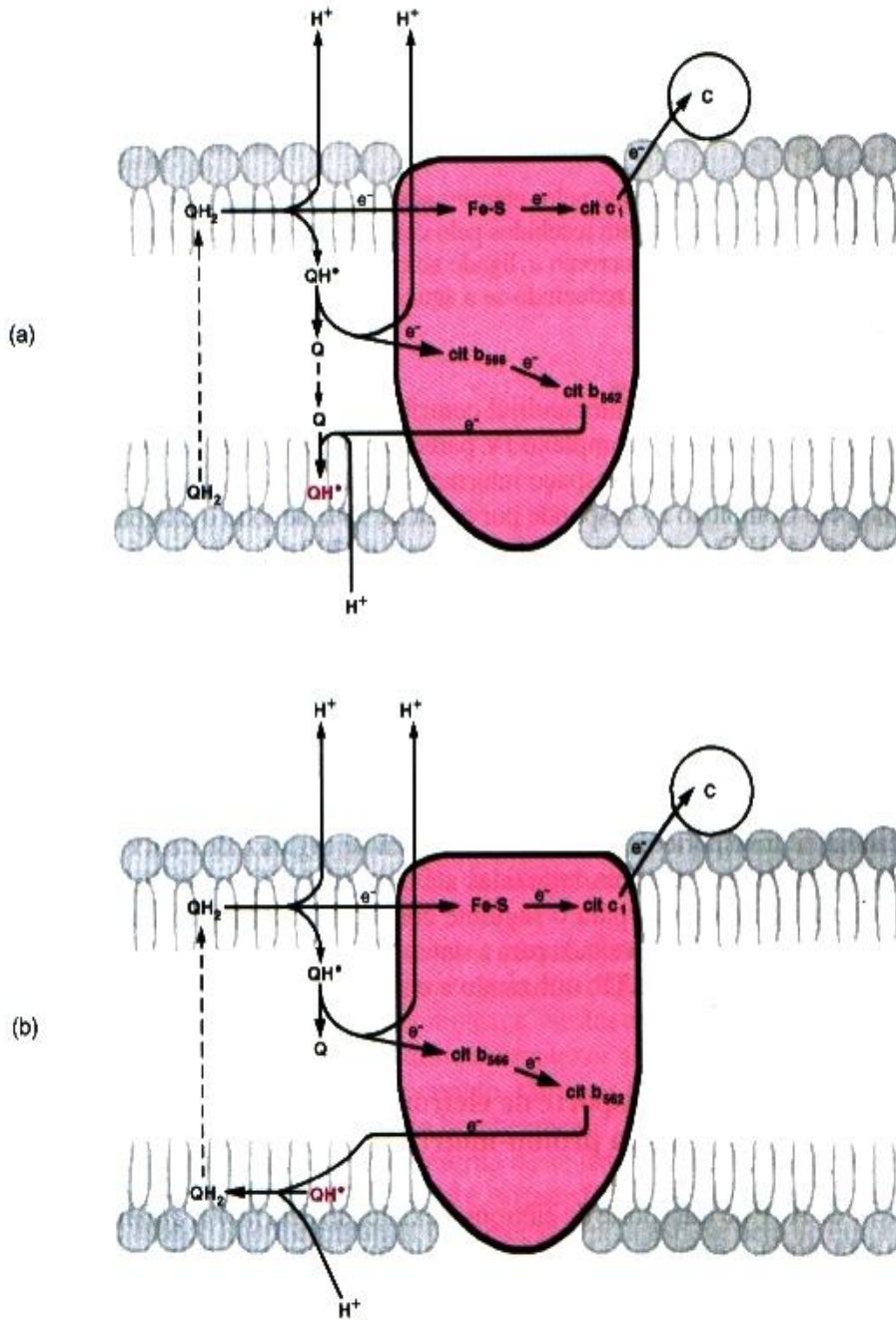


Fig. 11.9 Passagem de elétrons da coenzima Q para o Complexo III e, deste, para o citocromo c: o ciclo Q. Os elétrons de QH₂ são transferidos, um de cada vez, em duas etapas. a) Primeira etapa: QH₂ → QH•. b) Segunda etapa: QH₂ → Q e QH• → QH₂, o que equivale a QH• → Q. As setas pontilhadas indicam a movimentação da coenzima Q através da bicamada lipídica.

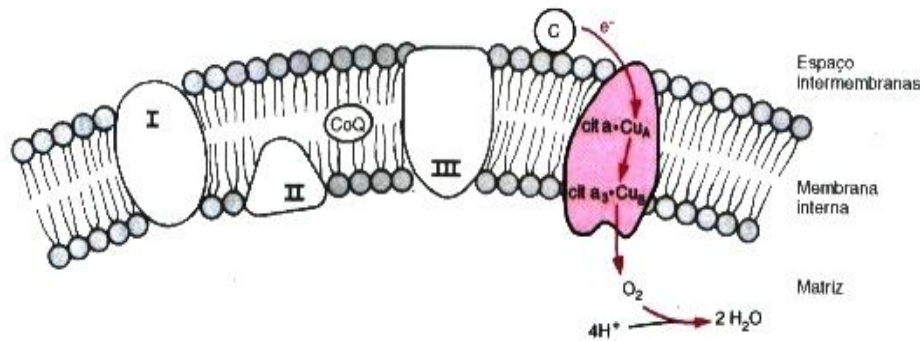


Fig. 11.10 Complexo IV. O caminho exato percorrido pelos elétrons neste complexo não é ainda conhecido. Acredita-se que os elétrons provenientes do citocromo *c* sejam recebidos pelo complexo formado entre o citocromo *a* e um íon de cobre (Cu_A), em seguida transferidos para o citocromo a_3 ligado ao outro íon de cobre (Cu_B), e, finalmente, para o oxigênio. Este combina-se com prótons da matriz, reduzindo-se a água.

(Fig. 11.10). A retirada de prótons da matriz mitocondrial contribui para o estabelecimento do gradiente de prótons. Na realidade, além desta retirada, o Complexo IV parece contribuir ativamente para a produção do gradiente, bombeando prótons da matriz para o espaço intermembranas.

A utilização de oxigênio pelo Complexo IV responde por cerca de 95% de todo o oxigênio consumido pelo organismo humano; a produção de H_2O neste processo chega a cerca de 300 mL diários e é, muitas vezes, referida como *água metabólica*. Em determinadas espécies, esta produção de água é fundamental para a sobrevivência do indivíduo, como no caso de animais que hibernam ou de camelos, que passam longos períodos sem ingerir água.

11.3 FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

Os componentes da cadeia de transporte de elétrons apresentam-se organizados em ordem crescente de potenciais de óxido-redução, desde as coenzimas reduzidas até o oxigênio (Quadro 11.2). Desta forma, as transferências de elétrons de um componente para o seguinte constituem reações de óxido-redução que se processam com liberação de energia, que é aproveitada para a síntese de ATP. O processo chamado *fosforilação oxidativa* refere-se à fosforilação do ADP a ATP, utilizando a energia liberada por essas reações de óxido-redução.

A energia derivada do transporte de elétrons é convertida em uma força próton-motriz

O acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons é explicado pela *teoria quimiosmótica*, proposta por Mitchell. Segundo esta teoria, a energia do transporte de elétrons é primariamente utilizada para bombear prótons (contragradiente, portanto, um processo endergônico) para o exterior da matriz mitocondrial (Fig. 11.11). O transporte unidirecional de prótons é possível graças à disposição assimétrica dos componentes da cadeia de transporte de elétrons em relação às duas faces da membrana interna. A consequência do bombeamento é a produção de um *gradiente de prótons*, isto é, uma concentração diferente de prótons dentro e fora da mitocôndria. Em mitocôndrias consumindo O_2 ativamente, a diferença de pH entre a matriz e o exterior pode chegar a 1,4 unidades. Adicionalmente, a face da membrana interna voltada para a matriz fica ainda mais negativa do que a face voltada para o espaço intermembranas, e a diferença de carga elétrica (*gradiente elétrico*) gera um potencial de membrana, da ordem de 0,1 a 0,2 V. A energia conservada nesse gradiente eletroquímico é chamada de *força próton-motriz* e é constituída, portanto, de dois componentes: o gradiente de pH (concentração de prótons maior no espaço intermembranas) e o gradiente elétrico (a matriz é negativa em relação ao espaço intermembranas). O retorno dos prótons ao interior da mitocôndria é um pro-

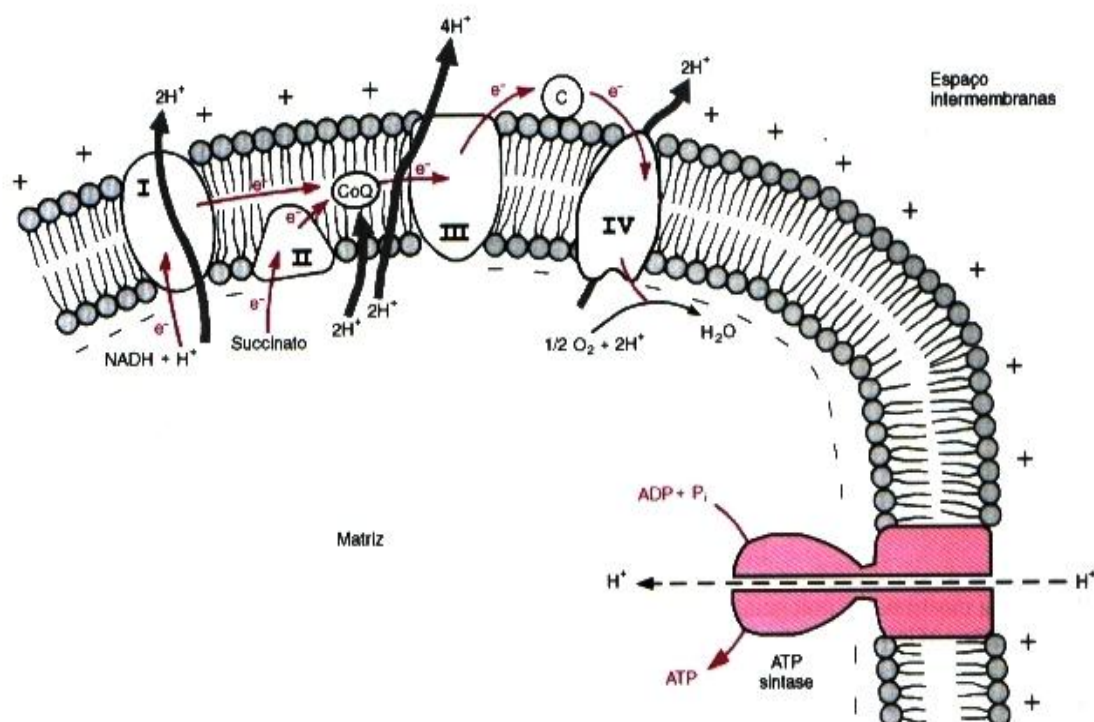


Fig. 11.11 Esquema mostrando o bombeamento de prótons (setas cinzas) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar pelos Complexos I, III e IV, à custa da energia derivada do transporte de elétrons (setas vermelhas). O gradiente de prótons (concentração maior de H^+ fora da mitocôndria) e o gradiente elétrico (face interna da membrana interna mais negativa) constituem uma força próton-motriz que é utilizada para sintetizar ATP pela ATP sintase, a única via de acesso de prótons para a matriz (seta tracejada).

cesso espontâneo, a favor do gradiente eletroquímico, que libera energia, a força próton-motriz, capaz de levar à síntese de ATP. Como a membrana interna é impermeável a prótons, estes só podem voltar à matriz e desfazer o gradiente através de sítios específicos da membrana interna, constituídos pelo complexo sintetizador de ATP: a *ATP sintase* (Fig. 11.11).

A translocação de prótons através da membrana interna da mitocôndria é feita pelos Complexos I, III e IV. Este fato pôde ser verificado experimentalmente pela utilização de lipossomos (Capítulo 7), aos quais foram incorporados isoladamente cada um destes complexos. Nestes experimentos foi possível demonstrar que transferências de elétrons envolvendo cada um destes complexos são acompanhadas de deslocamento de prótons através da membrana das vesículas e que, portanto, são estes complexos as bombas de prótons geradoras do gradiente. Entretanto, o exato mecanismo do bombeamento de prótons ainda é objeto de controvérsia. Uma possibilidade consistente é a que tem sido descrita neste texto: alguns transportadores de elétrons ao serem reduzidos captam prótons da matriz mitocondrial e, ao transferirem elétrons para o composto seguinte da cadeia, liberam prótons no espaço intermembranar. Este mecanismo ajusta-se bem ao bombeamento de prótons nos Complexos I e III. Outra hipótese explicativa baseia-se na diferença de conformação dos transportadores nos estados oxidado e reduzido. Estas diferenças de conformação provocariam alteração no valor de pK_a de alguns grupos ionizáveis de aminoácidos e também mudança na localização destes grupos, que ficariam expostos na face externa da membrana, liberando prótons para o espaço intermembranar. Esta possibilidade parece apropriada para o mecanismo de bombeamento de prótons no Complexo IV, que não dispõe de componentes que apresentem prótons no estado reduzido (o Complexo IV é formado de citocromos e íons de cobre, transportadores apenas de elétrons).

A variação de energia livre associada à transferência de elétrons através de cada um dos três complexos corresponde a uma força próton-motriz suficientemente grande para promover a síntese de ATP (Fig. 11.12). Para cada NADH que se oxida, ou seja, para cada par de elétrons transportados pelos Complexos I, III e IV, há síntese de 3 ATP. Pode-se chegar a esta mesma conclusão medindo-se o número de moléculas de

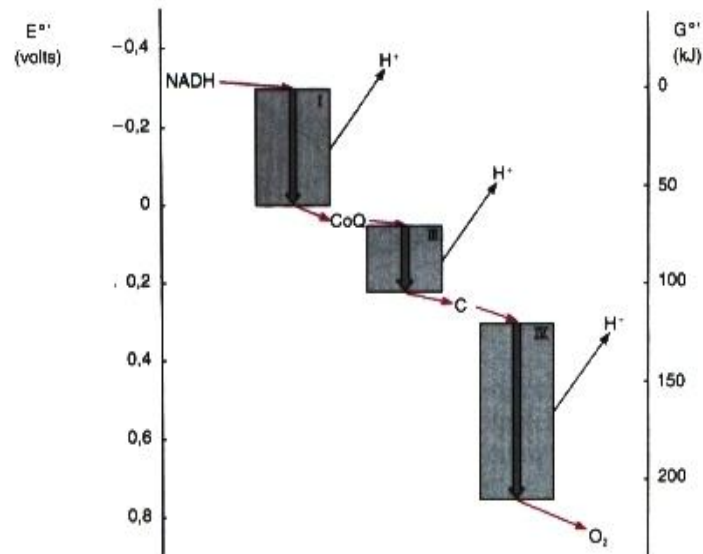
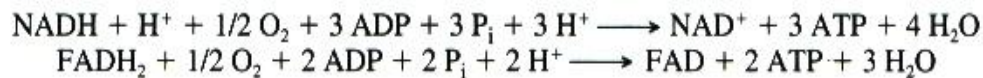


Fig. 11.12 Diagrama mostrando o potencial de óxido-redução padrão (E°) dos transportadores de elétrons. A variação de energia livre padrão (ΔG°) associada ao transporte dos elétrons do NADH ao oxigênio pode ser calculada a partir da ordenada à direita (G°). Nas etapas de que participam os Complexos I, III e IV, o decréscimo de energia livre (setas largas) é suficiente para gerar um gradiente de prótons capaz de promover a síntese de ATP.

ATP formadas e o número de átomos de oxigênio consumidos na oxidação de diferentes substratos; a razão entre estes valores é chamada *relação P/O*. Quando o substrato é o NADH, cujos elétrons passam pelos três complexos enzimáticos até chegarem ao oxigênio, a relação P/O é 3; no caso do succinato, os elétrons são transferidos para o FAD e, a seguir, para a coenzima Q; como o Complexo I é “saltado”, o gradiente de prótons formado é menor e a relação P/O do succinato é 2. As equações respectivas de oxidação são as seguintes:



Na verdade, os valores da relação P/O para o NADH e o succinato (3 e 2), aceitos durante muito tempo, estão atualmente sendo revistos. Medidas recentes indicam números menores, respectivamente 2,5 e 1,5. Como a questão ainda está longe de ser esclarecida e como os valores de produção de ATP, neste texto, servirão principalmente para comparações, adotaremos sempre os primeiros dados.

A ATP sintase constitui as microesferas da membrana interna da mitocôndria

Através de micrografias eletrônicas, pode-se observar que a face interna da membrana interna da mitocôndria é recoberta por microesferas, ligadas à membrana por pequenas hastes. O tratamento de preparações de mitocôndrias com ultra-som produz fragmentos de membrana que formam, espontaneamente, *vesículas invertidas*, nas quais a face com as microesferas situa-se do lado de fora (Fig. 11.13). Estas vesículas são capazes de efetuar o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa. Se as microesferas forem removidas, as vesículas remanescentes conservam apenas a capacidade de transportar elétrons. Por outro lado, as microesferas isoladas contêm a atividade catalítica de síntese que, nestas condições, sem o gradiente de prótons, é demonstrada pela capacidade de promover a reação no sentido da hidrólise do ATP. Estas experiências demonstram a localização da ATP sintase nas microesferas.

A ATP sintase compreende dois componentes, cada um constituído por várias cadeias polipeptídicas (Fig. 11.14). Uma porção esférica, chamada *fator de acoplamento 1* (F_1), corresponde às microesferas observadas em micrografias eletrônicas e contém os sítios de síntese de ATP. A segunda porção fica embebida na mem-

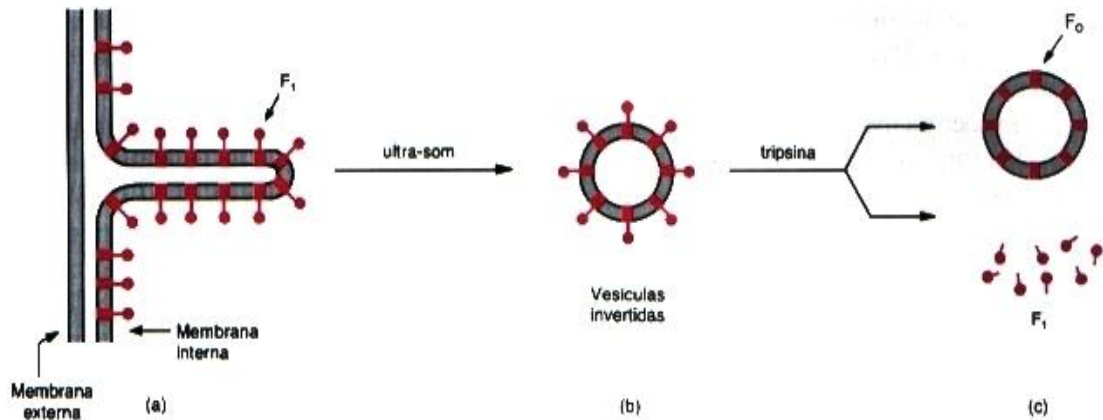


Fig. 11.13 Formação de vesículas invertidas por tratamento de mitocôndria com ultra-som. O componente F_1 pode ser removido por tratamento com tripsina e mantém sua atividade catalítica; as vesículas remanescentes apenas transportam elétrons.

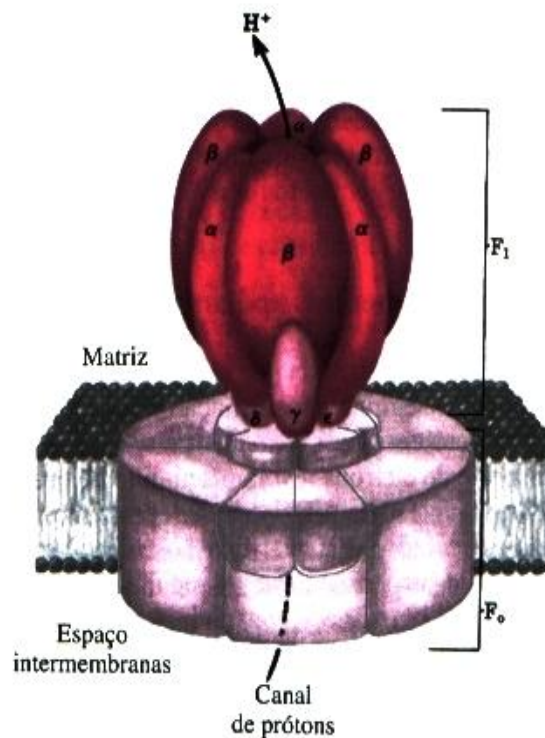


Fig. 11.14 Esquema da ATP sintase. As subunidades indicadas por letras gregas associam-se formando o componente F_1 , que catalisa a síntese de ATP; o componente F_0 , também constituído por diversas cadeias polipeptídicas, contém o canal por onde os prótons retornam à matriz mitocondrial. (De Albert L. Lehninger, David L. Nelson e Michael M. Cox, *Principles of Biochemistry*, Second Edition. Worth Publishers, New York, 1993. Reproduzida com permissão.)

brana interna, constituindo um canal através do qual os prótons retornam à matriz mitocondrial; é chamada F_0 porque contém o sítio de ligação para *oligomicina*, um inibidor da ATP sintase.

O ATP é sintetizado quando os prótons voltam à matriz mitocondrial

Como foi descrito, a energia do transporte de elétrons gera uma concentração de prótons maior no espaço intermembranar do que na matriz mitocondrial. A volta dos prótons ao interior da mitocôndria é, portanto,

termodinamicamente favorável. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a prótons em toda a sua extensão, *exceto* na ATP sintase; é por este canal que os prótons atravessam a membrana, de volta à matriz mitocondrial.

A variação de energia livre associada ao transporte de um próton através da membrana interna da mitocôndria pode ser determinada através de medidas da diferença de pH e do potencial de membrana estabelecidos em mitocôndrias consumindo oxigênio; tais medidas indicam um valor próximo de $20 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Considerando-se que cerca de $50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ são consumidos para a síntese de ATP nas condições intracelulares, admite-se que seja necessária a passagem de três prótons pela ATP sintase para cada ATP sintetizado.

A hipótese mais aceita atualmente para o mecanismo de síntese de ATP estabelece que a ATP sintase tem três sítios catalíticos idênticos, que podem apresentar-se, cada um, em três conformações, segundo a intensidade de sua ligação com ATP: aberta, frouxa e apertada, denominadas *O*, *L* e *T*, de “open”, “loose” e “tight”, respectivamente. Em um instante dado, cada um dos três sítios assumirá uma das conformações. As etapas que levariam à síntese de ATP estão descritas na Fig. 11.15. Antes de ser iniciado um ciclo catalítico, encontrar-se-ia o seguinte quadro: um sítio, que será considerado como o primeiro, na conformação *O* (aberta), o segundo na conformação *L* (frouxa) e o terceiro sítio na conformação *T* (apertada), contendo ATP sintetizado em um ciclo anterior. A primeira etapa do ciclo (etapa 1) consiste na ligação de ADP e P_i ao sítio com conformação *L* (frouxa). A passagem de prótons através da ATP sintase provoca alterações conformacionais nestes três sítios (etapa 2), de tal forma que o primeiro passa à configuração *L* (aberta \rightarrow frouxa), o segundo passa à configuração *T* (frouxa \rightarrow apertada) e o terceiro passa à configuração *O* (apertada \rightarrow aberta). No sítio onde havia ADP e P_i e que assumiu a configuração *T*, o ATP é sintetizado e o sítio com configuração *O*, libera ATP (etapa 3). Encontra-se novamente, portanto, o mesmo quadro existente no início do ciclo, com a única diferença que cada um dos sítios apresenta a conformação inicialmente exibida pelo sítio anterior (na Fig. 11.15, no sentido anti-horário). O processo prossegue enquanto for mantida a força próton-motriz e a volta dos prótons pela ATP sintase.

Muitos resultados experimentais apóiam a teoria quimiosmótica

A teoria quimiosmótica vem sendo consubstanciada por um número crescente de evidências experimentais, algumas das quais são apresentadas a seguir. A fosforilação oxidativa só se processa em mitocôndrias intactas ou em vesículas fechadas, compatíveis com a formação de um gradiente de prótons. Medidas de concentração de prótons durante o transporte de elétrons revelam acúmulo de prótons no exterior da mitocôndria ou no interior de vesículas invertidas. A síntese de ATP pode ser obtida mesmo na ausência de transporte de elétrons, desde que exista o gradiente de prótons. Esta verificação é feita através do uso de vesículas invertidas. Quando se adiciona álcali ao meio de suspensão destas vesículas, a concentração de H^+ diminui subitamente; como a concentração interna de H^+ permanece constante, é gerado momentaneamente um gradiente de prótons. Há extrusão de prótons pela ATP sintase, acompanhada de síntese de ATP no exterior das vesículas.

É importante assinalar que, apesar dos progressos obtidos nesta área, ainda não estão perfeitamente esclarecidos pontos fundamentais da fosforilação oxidativa, como o mecanismo do bombeamento de prótons e a seqüência de eventos que provocam as mudanças conformacionais na ATP sintase, o que, em última análise, leva à síntese de ATP.

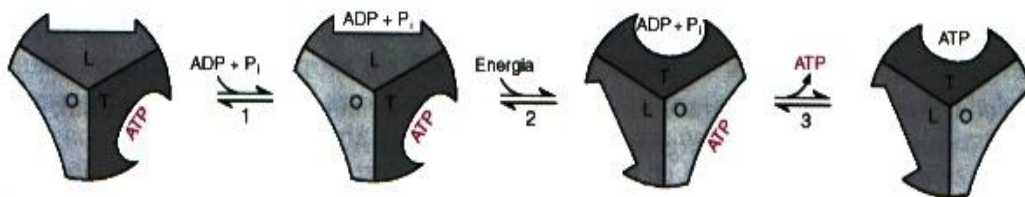


Fig. 11.15 Mecanismo de síntese de ATP. O esquema mostra os três sítios catalíticos idênticos da ATP sintase, que podem assumir três conformações diferentes: aberta (*O*, de *open*), frouxa (*L*, de *loose*) e apertada (*T*, de *tight*). As etapas 1 a 3 estão descritas no texto. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

11.4 ACOPLAMENTO DO TRANSPORTE DE ELÉTRONS À SÍNTESE DE ATP: CONTROLE RESPIRATÓRIO

As velocidades do transporte de elétrons e da síntese de ATP são reguladas pela concentração de ADP

As necessidades celulares de ATP variam grandemente segundo o estado fisiológico. Uma fibra muscular, por exemplo, pode ter suas necessidades aumentadas de 100 vezes em segundos, quando passa do repouso para o exercício intenso. Para promover o ajuste da produção de ATP ao seu gasto, *o transporte de elétrons e a síntese de ATP são processos intimamente acoplados*, isto é, só há oxidação de coenzimas se houver síntese de ATP, e vice-versa. Os substratos destes processos são: coenzimas reduzidas, oxigênio, ADP e P_i . Dentre estes, o ADP é o único que atinge concentrações limitantes nas células, sendo, por isso, o regulador de ambos os processos. Esta regulação da velocidade de oxidação de coenzimas (equivalente à velocidade de consumo de oxigênio) exercida pela concentração de ADP chama-se *controle respiratório*. Assim, quando a célula realiza processos que consomem energia, transformando ATP em ADP, há um estímulo da síntese de ATP e do transporte de elétrons: devido à maior disponibilidade de um dos substratos (ADP), o fluxo de prótons pela ATP sintase é acelerado, dissipando-se mais rapidamente o gradiente eletroquímico, o que acelera também o transporte de elétrons e, conseqüentemente, a oxidação de coenzimas. Deste modo, a velocidade das vias que dependem da reciclagem de coenzimas oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons (por exemplo, o ciclo de Krebs) é também regulada pela razão ATP/ADP. Além disso, o próprio ADP participa de regulações alostéricas dessas vias (Capítulo 20).

O resultado do controle respiratório é, então, um perfeito ajuste entre a velocidade de produção de coenzimas reduzidas e a velocidade de sua oxidação pela cadeia de transporte de elétrons, com produção de ATP. Este ajuste fino regulará, portanto, a produção de energia pela célula.

11.5 INIBIDORES E DESACOPLADORES

A transferência de elétrons pode ser bloqueada por inibidores específicos

Há drogas capazes de atuar especificamente sobre cada um dos complexos da cadeia de transporte de elétrons, impedindo o prosseguimento da transferência de elétrons (Quadro 11.3). O resultado desta ação inibitória é a virtual paralisação do transporte de elétrons e das vias metabólicas que dependem da cadeia para a reoxidação de coenzimas. Deve-se notar que o resultado é o mesmo, qualquer que seja o componente da cadeia sobre o qual este tipo de droga atue. De fato, um transportador reduzido, incapaz de passar adiante seus elétrons, é também incapaz de receber elétrons do transportador antecedente. Deste modo, em instantes, todos os componentes da cadeia que se situam antes do ponto de atuação da droga estarão reduzidos, e a cadeia, inoperante. Sem o transporte de elétrons não se forma o gradiente de prótons e, conseqüentemente, não há síntese de ATP. Estas drogas são, portanto, potencialmente letais.

Quadro 11.3 Inibidores da cadeia de transporte de elétrons e o complexo sobre o qual cada um atua

Inibidores	Complexo
Barbituratos (hipnóticos)	I
Rotenona (inseticida)	I
Malonato (análogo do succinato, inibidor competitivo da succinato desidrogenase)	II
Antimicina A	III
Cianeto, monóxido de carbono, ácido sulfídrico, azida sódica	IV

Em condições especiais, o transporte de elétrons pode ocorrer sem a síntese de ATP

No início do século, foi verificada uma doença grave em trabalhadores da indústria de explosivos que estavam expostos ao contato com ácido pícrico (trinitrofenol). O sintoma mais notável da moléstia, que com frequência levava a óbito, era a hiperpirexia. Foi este o fato inicial que levou à descoberta de um grupo de substâncias capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP com o transporte de elétrons. Hoje se sabe que algumas substâncias lipofílicas, como o *2,4-dinitrofenol (DNP)*, são capazes de dissociar o transporte de elétrons da fosforilação oxidativa; estas substâncias são chamadas *desacopladores*. Quando os dois processos são desacoplados, o transporte de elétrons, termodinamicamente autônomo, pode prosseguir; a síntese de ATP pára.

Graças ao seu caráter hidrofóbico, o DNP pode atravessar membranas e, como é também um ácido fraco, associa-se a prótons no exterior da mitocôndria (onde o pH é menor), liberando-os na matriz (Fig. 11.16). Impede assim a formação do gradiente de prótons, e a energia que seria usada na síntese de ATP é dissipada como calor. Nessas condições, com o gradiente de prótons desfeito, o transporte de elétrons, feito sem o concomitante transporte de prótons contragradiente, torna-se energeticamente mais favorável e sua velocidade aumenta. De fato, medidas experimentais simples mostram que, em presença de desacopladores, uma suspensão de mitocôndrias consome oxigênio com velocidade maior do que na sua ausência. Nos anos que se seguiram a esta descoberta, o DNP chegou a ser usado como agente emagrecedor. A expectativa de sua administração era que, acelerando a oxidação de coenzimas sem a concomitante síntese de ATP, a degradação das reservas lipídicas fosse acelerada, ainda mais porque, com pequena produção de ATP, a síntese das gorduras também seria afetada. Este tipo de tratamento foi logo abandonado, porque levou a alguns acidentes fatais. Posteriormente, verificou-se também que o DNP é um agente mutagênico.

A produção de calor artificialmente provocada pela presença de desacopladores tem seu correspondente fisiológico no tecido adiposo marrom. A membrana da mitocôndria deste tecido contém, além da ATP sintase, uma proteína transportadora de prótons, denominada *termogenina*. Na presença desta proteína, que atua como um canal de prótons, o gradiente de prótons nunca se estabelece com a mesma eficácia, e uma fração considerável da energia derivada do transporte de elétrons é continuamente dissipada como calor. Desta forma, a oxidação de substratos neste tecido corresponde a uma *termogênese*, importante na proteção de certas zonas corpóreas de recém-nascidos e na recuperação da temperatura normal de animais em hibernação.

A oligomicina impede a síntese de ATP

A *oligomicina* é um antibiótico que inibe a síntese de ATP. Sua ação é provocada por ligação ao componente F_0 da ATP sintase, que se torna então impermeável a prótons. Como os processos de síntese de ATP e de transporte de elétrons são fortemente acoplados, a interrupção de um deles é de imediato refletida no ou-

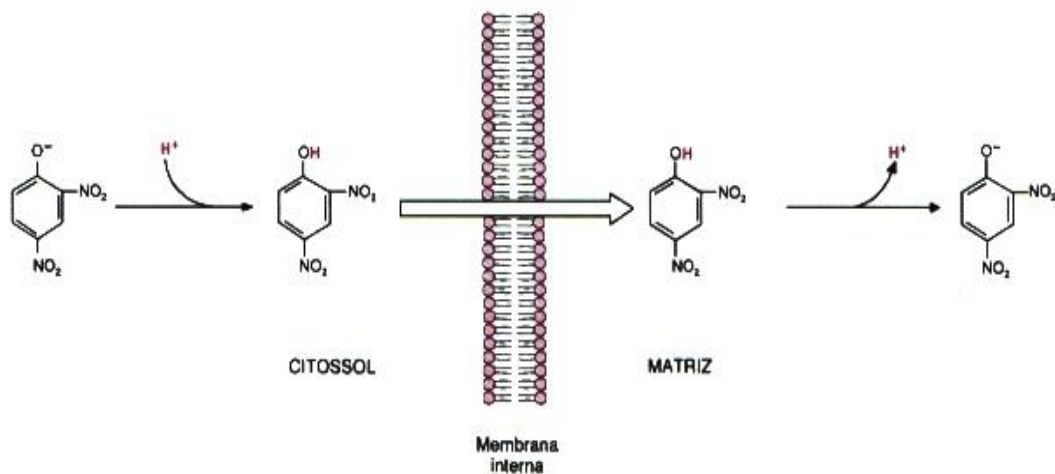


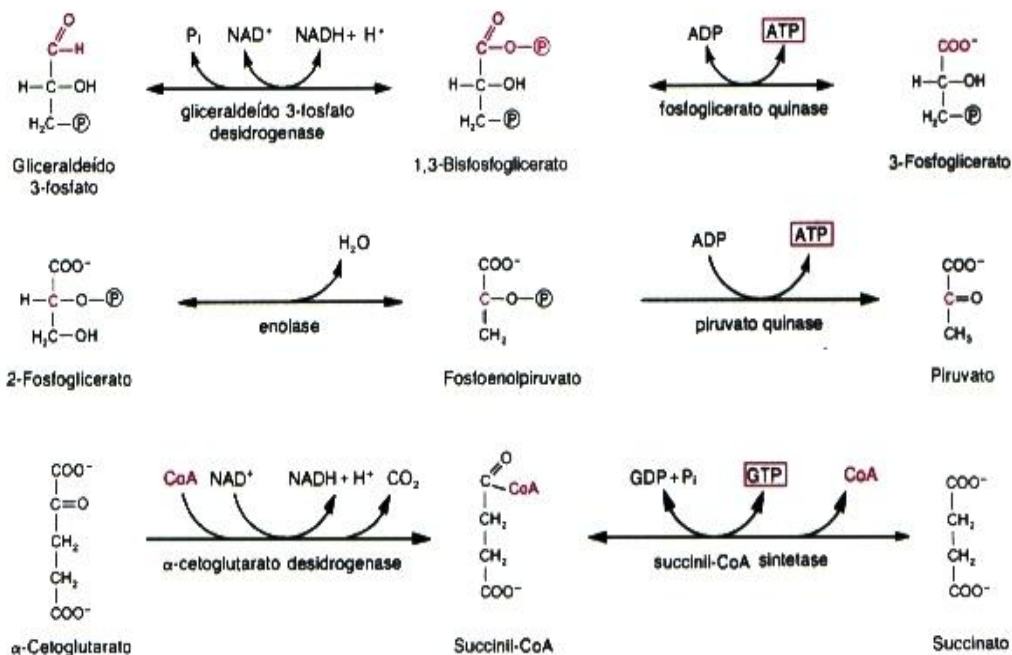
Fig. 11.16 Atuação do 2,4 dinitrofenol como desacoplador — o transporte de prótons através da membrana desfaz o gradiente necessário à síntese de ATP.

tro. De fato, a manutenção do gradiente de prótons impede o prosseguimento do transporte de elétrons. Embora atuando em outro processo, a fosforilação oxidativa, o efeito deste tipo de inibidor é, portanto, idêntico ao dos inibidores da cadeia de transporte de elétrons (antimicina A, cianeto etc.): pára a síntese de ATP e pára o consumo de oxigênio, indicativo da parada do transporte de elétrons. Apesar disso, experimentalmente, pode-se distinguir com facilidade a inibição da ATP sintase da inibição da cadeia de transporte de elétrons. Basta adicionar à preparação inibida um desacoplador: se a inibição se exerce sobre a ATP sintase, o consumo de oxigênio é restaurado; se a inibição está sendo feita na cadeia de transporte de elétrons, o desacoplador é inócuo. Naturalmente, em ambos os casos, a síntese de ATP permanece inibida.

11.6 FOSFORILAÇÃO NO NÍVEL DO SUBSTRATO

A fosforilação no nível do substrato não é afetada por desacopladores

Chama-se *fosforilação no nível do substrato* a síntese de ATP obtida diretamente em reações que fazem parte da glicólise e do ciclo de Krebs e que utilizam como substratos compostos ricos em energia: 1,3-bisfosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e succinil-CoA. Estas reações são sempre precedidas por reações de óxido-redução (no caso da desidratação do 2-fosfoglicerato, há uma óxido-redução intramolecular, onde um carbono é oxidado e outro reduzido). Na reação de óxido-redução, a energia é acumulada em uma ligação com fosfato ou CoA. Na reação seguinte, a ligação rica em energia é rompida e a energia é utilizada para a síntese de ATP ou GTP:



A produção de ATP pela fosforilação no nível do substrato responde por uma pequena fração do total produzido em condições aeróbias e, por ser independente do transporte de elétrons, não é afetada por desacopladores.

11.7 CADEIAS DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS BACTERIANAS

Nem sempre o acceptor final de elétrons é o oxigênio

As características da cadeia de transporte de elétrons descritas anteriormente são referentes àquela que se processa nas mitocôndrias, bastante conservada entre os eucariotos. Não é, entretanto, o único tipo de cadeia

de transporte de elétrons encontrada nos seres vivos. Nas bactérias, encontram-se cadeias de transporte de elétrons muito mais diversificadas. Nestes organismos, embora os princípios gerais já descritos sejam obedecidos, há grandes variações quanto aos componentes da cadeia, desde os substratos iniciais fornecedores de elétrons até o seu aceptor final. Assim, além das coenzimas reduzidas, podem ser fornecedores de elétrons uma série de substratos inorgânicos, como NH_4^+ , NO_2^- , H_2S , H_2 , enxofre e ferro. Por outro lado, o aceptor final pode também variar, e, além do oxigênio, podem ter esta função: NO_3^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} e substâncias orgânicas, como o fumarato. Quando o aceptor final é diferente do oxigênio, a cadeia é dita anaeróbia e caracteriza a chamada *respiração anaeróbia* (em contraposição à “*respiração aeróbia*”, que utiliza O_2 como aceptor final de elétrons). As diferentes modalidades de cadeias de transporte de elétrons bacterianas constituem adaptações importantes para o aproveitamento das substâncias disponíveis no meio ambiente. São, portanto, características favoráveis na competição com outras espécies e na colonização de diferentes nichos ecológicos.

11.8 RENDIMENTO DA OXIDAÇÃO DA GLICOSE

A oxidação completa da glicose produz 38 ATP

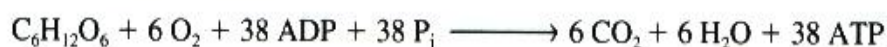
A importância da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa como mecanismo de obtenção de energia dos organismos aeróbios fica evidenciada quando se analisa a produção de ATP a partir da oxidação de um nutriente como a glicose. O cômputo da quantidade total de ATP resultante da oxidação de glicose é facilitado pela análise, em separado, das etapas em que o processo se divide, ou seja, oxidação de:

- I. glicose a 2 piruvato
- II. 2 piruvato a 2 acetil-CoA
- III. 2 acetil-CoA pelo ciclo de Krebs
- IV. NADH e FADH_2 pela cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa.

Em cada uma das etapas I a III, verifica-se a formação de coenzimas reduzidas e de ATP por fosforilação no nível do substrato, e somam-se estes valores. A quantidade de ATP obtida na fase IV por fosforilação oxidativa acoplada à oxidação deste total de coenzimas (considerando-se a síntese de 3 ATP para cada NADH e 2 para cada FADH_2) é, então, obtida. A oxidação completa de um mol de glicose está discriminada no quadro seguinte:

Etapas	I	II	III	I+II+III	IV	Moles de ATP formados
Coenzimas produzidas	2 NADH	2 NADH	6 NADH 2 FADH_2	10 NADH 2 FADH_2	30 ATP 4 ATP	30 4
Fosforilação no nível do substrato	2 ATP		2 GTP	4 ATP		4
Total						38

A oxidação biológica da glicose em condições aeróbias produz, portanto, 38 ATP. A equação geral deste processo pode ser escrita como se segue:



Em algumas células de eucariotos, o rendimento da oxidação da glicose é reduzido de 38 para 36 ATP porque a oxidação de cada NADH produzido no citossol (glicólise) permite a síntese de apenas 2 ATP (Seção 11.9).

11.9 OXIDAÇÃO DO NADH CITOSSÓLICO

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a NAD^+ e NADH e, portanto, a oxidação do NADH citossólico não pode ser feita diretamente pela cadeia de transporte de elétrons. Entretanto, as coenzimas reduzidas no citossol podem ser indiretamente oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons, graças a sistemas designados *lançadeiras*. Nestes sistemas, os elétrons do NADH são transferidos para um composto citossólico, que, reduzido, pode atravessar a membrana interna da mitocôndria; alternativamente, os elétrons são transferidos para um composto que, reduzido, pode transferir elétrons para um componente da membrana interna. Por qualquer dos dois processos, o composto que transporta os elétrons é reoxidado ao doá-los, retorna ao citossol e pode participar de um novo ciclo. Há dois tipos conhecidos de lançadeiras: a do malato-aspartato e a do glicerol 3-fosfato.

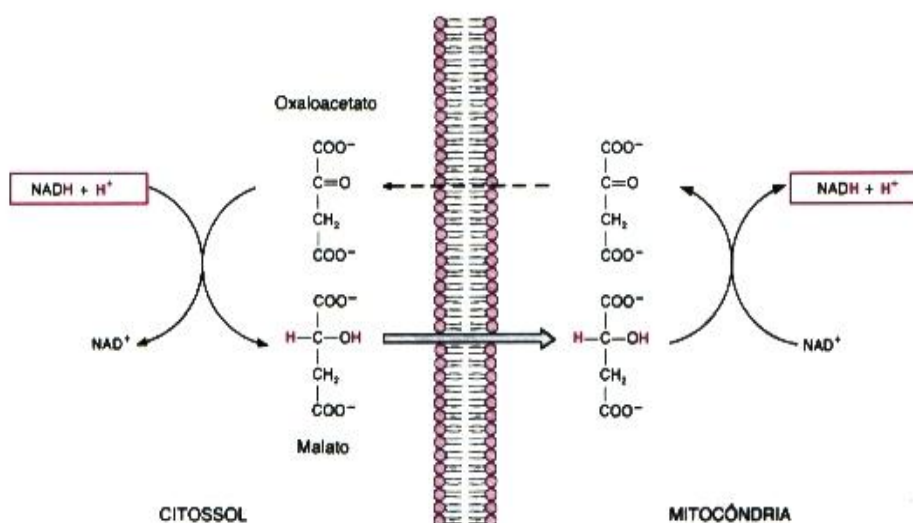


Fig. 11.17 Esquema simplificado da lançadeira malato-aspartato. O transporte do malato e a regeneração de oxaloacetato no citossol estão apresentados na Fig. 11.18.

1. *Lançadeira do malato-aspartato.* Nas células hepáticas, cardíacas e renais de mamíferos, o NADH citossólico reduz oxaloacetato, em uma reação catalisada pela *malato desidrogenase* citossólica. O malato formado entra na mitocôndria, onde é oxidado pela malato desidrogenase mitocondrial, que também utiliza NAD^+ como coenzima (Fig. 11.17). Este processo leva, portanto, à produção de NADH mitocondrial a partir de NADH citossólico, apesar de não haver permeabilidade da membrana interna da mitocôndria ao NADH . O oxaloacetato formado na mitocôndria não atravessa a membrana interna, mas pode receber um grupo amino do glutamato (p. 218), formando aspartato. Este sai da mitocôndria e, no citossol, regenera o oxaloacetato (Fig. 11.18). Como esta lançadeira é reversível, o seu sentido depende dos níveis de NADH citossólico e mitocondrial. A passagem de malato e aspartato através da membrana interna da mitocôndria é efetuada por proteínas presentes nesta membrana, as permeases, que serão descritas na Seção 11.10.

2. *Lançadeira do glicerol fosfato.* O NADH citossólico reduz diidroxiacetona fosfato, em uma reação catalisada pela *glicerol 3-fosfato desidrogenase*. O glicerol 3-fosfato formado difunde-se até a face externa da membrana interna, onde se localiza uma outra glicerol 3-fosfato desidrogenase que contém FAD com grupo prostético (p. 142). A diidroxiacetona fosfato é regenerada, produzindo FADH_2 (Fig. 11.19). O FADH_2 , através de um centro Fe-S , entrega seus elétrons à coenzima Q . Deve-se notar que, quando a lançadeira do glicerol 3-fosfato é acionada, cada NADH origina apenas 2 ATP . Este decréscimo na produção de ATP por NADH citossólico oxidado garante a irreversibilidade do transporte de seus elétrons para o interior da mitocôndria, mesmo que a concentração de NADH no citossol seja baixa. Este sistema opera no músculo de vôo de insetos e provavelmente, em músculo esquelético e cérebro de mamíferos.

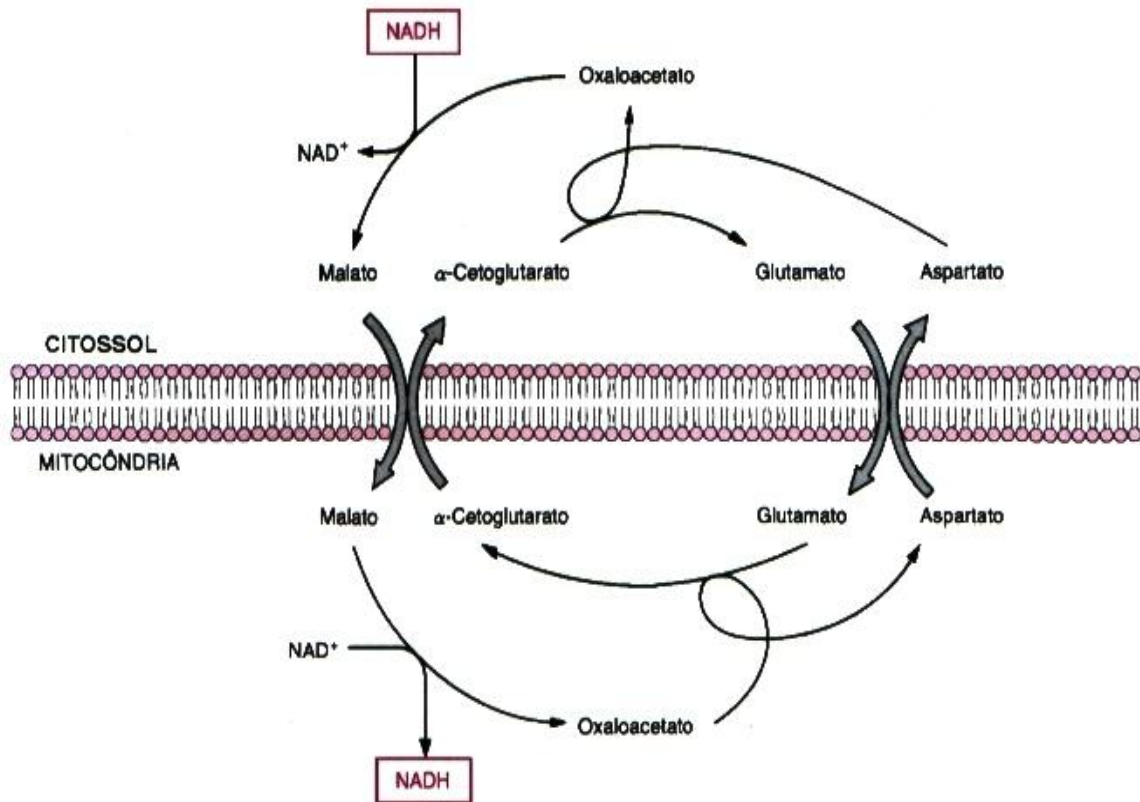


Fig. 11.18 Lançadeira do malato-aspartato. As setas grossas representam transporte através de translocases, e não reações químicas.

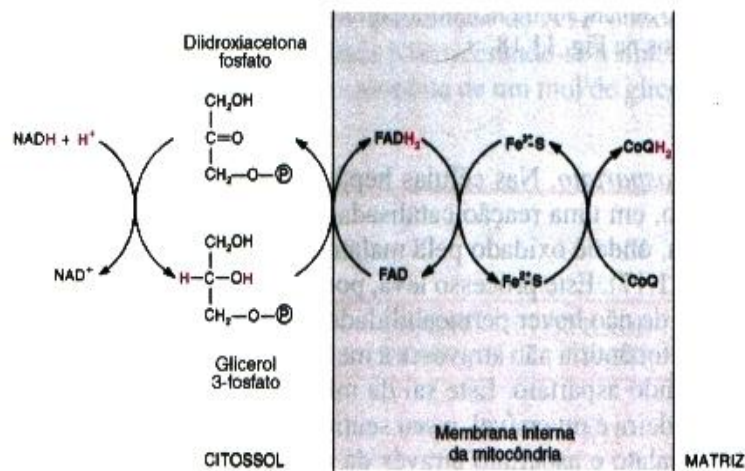


Fig. 11.19 Lançadeira do glicerol-fosfato.

11.10 TRANSPORTE DE METABÓLITOS ATRAVÉS DA MEMBRANA INTERNA DA MITOCÔNDRIA

A membrana interna da mitocôndria, ao contrário da membrana externa, é impermeável à maioria dos compostos. Apesar desta alta seletividade, o trânsito de muitos compostos entre a matriz mitocondrial e o citossol é propiciado pela existência de sistemas transportadores presentes na membrana interna da mitocôndria (Fig.

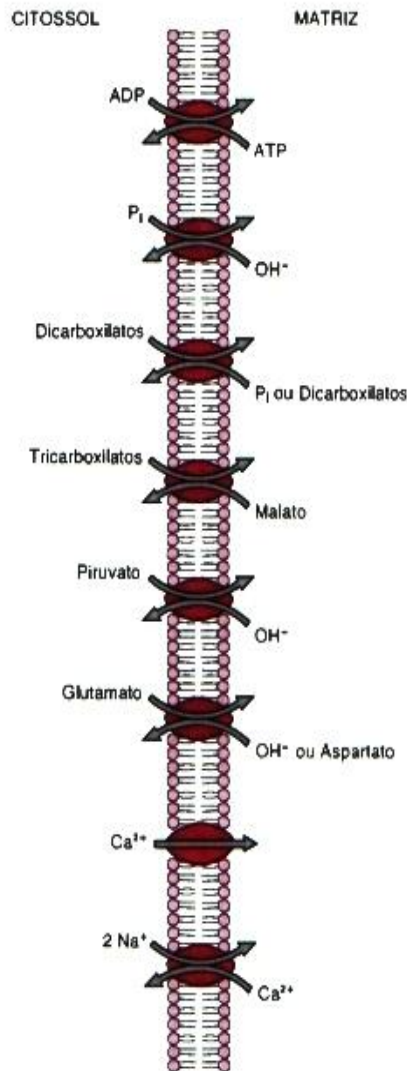


Fig. 11.20 Translocases da membrana interna da mitocôndria.

11.20). Quando não há um transportador específico, o composto é incapaz de atravessar a membrana, como o caso, já mencionado, da coenzima NAD⁺/NADH.

Uma das permeases mais bem conhecidas é a *adenina nucleotídeo translocase* ou *ATP/ADP translocase*, uma proteína muito abundante, que, em células cardíacas, representa 15% do conteúdo proteico da membrana interna da mitocôndria. Esta translocase efetua a troca de uma molécula de ATP da matriz mitocondrial por uma molécula de ADP, externa. Sua atuação permite que o ATP sintetizado dentro da mitocôndria possa ser exportado para o compartimento extramitocondrial, onde ocorre a maioria dos processos que consomem energia; contribui, ainda, para a manutenção da relação ATP/ADP no citossol, caracteristicamente maior que a da mitocôndria. Quando se eleva a concentração citossólica de ADP, há estímulo para a troca e, portanto, saída de ATP.

A ATP/ADP translocase pode ser inativada por inibidores específicos, com o conseqüente bloqueio da fosforilação oxidativa. Um deles, *atractilosídeo*, é um glicosídeo tóxico, isolado de uma espécie de erva-daninha que cresce em pastagens, podendo ocasionar o envenenamento do gado. Outro inibidor conhecido é o *ácido bongcréquico*, antibiótico produzido por um fungo que cresce em uma comida típica à base de coco (*bongkrek*, em indonésio). O resultado da inibição da ATP/ADP translocase é o colapso da fosforilação oxidativa e da cadeia de transporte de elétrons. De fato, uma vez fosforilado todo o ADP presente na matriz mitocondrial, a ATP sintase torna-se inativa, por falta de substrato (ADP); a cadeia de transporte de elétrons, que atua sempre acoplada à fosforilação oxidativa, também não pode prosseguir.

A atuação da ATP/ADP translocase é coadjuvada por outra proteína, chamada *fosfato translocase*, que permite a entrada de fosfato na mitocôndria, acompanhada da saída de OH^- . O transporte de fosfato é inibido por reagentes específicos para grupos sulfidríla, como a *N-etil-maleimida*. É o resultado das ações conjugadas das duas translocases que provê a ATP sintase dos substratos — ADP e P_i — de que necessita.

A membrana interna da mitocôndria apresenta, ainda, vários outros sistemas de transporte, sendo importantes os seguintes:

1. *Dicarboxilato translocase*. Promove a troca de dicarboxilatos (malato, succinato e fumarato) por fosfato, ou troca de um dicarboxilato por outro.
2. *Tricarboxilato translocase*. Efetua o antiporte de citrato ou isocitrato por malato.
3. *Piruvato translocase*. Permite a entrada, na mitocôndria, do piruvato produzido no citossol, sempre acoplada à saída de OH^- .
4. *Glutamato translocase*. Específica para glutamato, que pode ser trocado por aspartato ou OH^- .

A dicarboxilato translocase e a glutamato translocase participam da lançadeira do malato-aspartato (p. 155); a atuação de outras translocases está incluída na descrição das vias metabólicas.

O transporte de fosfato, piruvato e glutamato, através das permeases específicas referidas, é do tipo ativo. Admite-se que a entrada destes compostos na mitocôndria seja acompanhada da saída de OH^- , mas este processo não pode ser formalmente distinguido de um co-transporte de H^+ . Deste modo, estas permeases tendem a dissipar o gradiente de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons, já que, direta ou indiretamente, permitem o retorno de prótons para a matriz. Portanto, uma parcela significativa da energia derivada do transporte de elétrons é utilizada para contornar a impermeabilidade da membrana interna a metabólitos, reduzindo o rendimento em ATP. De fato, calcula-se que, em situação de repouso, 50% do total de energia gasto pelo organismo humano são utilizados para o transporte de compostos e íons através de membranas.

Um outro exemplo de transporte ativo é representado pelo *transporte de íons Ca^{2+}* . As mitocôndrias, assim como o retículo endoplasmático, constituem um reservatório de cálcio e participam da regulação de sua concentração celular, colaborando para manter os níveis citossólicos de Ca^{2+} caracteristicamente baixos (cerca de 10^{-7} M). Esta regulação é fundamental, porque pequenas alterações na concentração de cálcio sinalizam o início de processos celulares de grande importância, que serão analisados na Parte 4 — Regulação do Metabolismo. A membrana interna da mitocôndria contém dois sistemas transportadores de cálcio. Um deles é uniportador e possibilita a entrada de Ca^{2+} à custa da energia derivada do transporte de elétrons. O outro sistema é constituído por uma translocase $\text{Ca}^{2+}/2\text{Na}^+$, que introduz na mitocôndria 2Na^+ para cada Ca^{2+} que sai e é, portanto, eletricamente neutro.

12

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS: VIA DAS PENTOSSES FOSFATO

12.1 FUNÇÕES DA VIA DAS PENTOSSES

A via das pentoses fosfato é uma via alternativa de oxidação de glicose, que leva à produção de dois compostos importantes: *ribose 5-fosfato* e a forma reduzida da *nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH)* (Fig. 12.1), uma coenzima semelhante ao NADH. A ribose 5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídios que compõem os ácidos nucleicos e de várias coenzimas; o NADPH atua como coenzima doadora de hidrogênio em sínteses redutoras e em reações de proteção contra compostos oxidantes. São ainda produzidos nesta via vários açúcares fosforilados, com número variável de átomos de carbono.

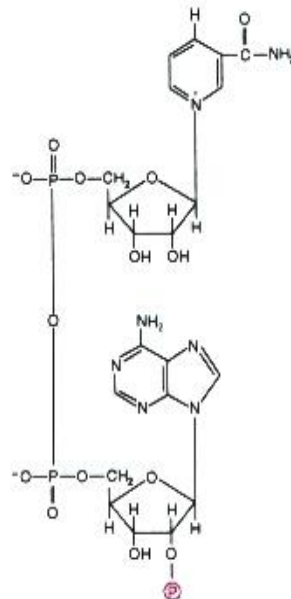


Fig. 12.1 Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADP⁺). Este dinucleotídio difere do NAD⁺ (Fig. 9.2) apenas pela presença de um grupo fosfato (em vermelho) esterificado ao carbono 2 da ribose componente do nucleotídio de adenina.

Na glicólise e em outras vias degradativas, o substrato é oxidado, gerando coenzimas reduzidas — NADH e FADH₂ —, a partir de cuja oxidação se produz ATP. Na síntese de muitos compostos ocorre o reverso: há consumo de ATP e redução do substrato a partir de coenzimas reduzidas. A coenzima reduzida utilizada em tais reduções não é o NADH, mas o NADPH; quando utilizada nas reduções, a coenzima passa à forma NADP⁺ e volta à forma reduzida na via das pentoses fosfato. As duas coenzimas — NAD⁺ e NADPH — têm, portanto, papéis metabólicos opostos: a primeira é utilizada quando o substrato está sendo oxidado e a segunda, quando o substrato está sendo reduzido. Igualmente diferentes são os processos de regeneração das duas coenzimas: o NAD⁺, reduzido em vias degradativas, como glicólise, ciclo de Krebs e outras, é reoxidado na cadeia de transporte de elétrons; o NADPH não é substrato da cadeia de transporte de elétrons, e sua oxidação é feita, como foi mencionado, quando participa de vias de sínteses redutoras, como a síntese de ácidos graxos e de colesterol.

Na via das pentoses fosfato, a energia derivada da oxidação da glicose é armazenada sob a forma de poder redutor (NADPH) e não de ATP, como na glicólise.

12.2 ETAPAS DA VIA DAS PENTOSSES FOSFATO

A via das pentoses fosfato consta de uma parte oxidativa, que produz NADPH, e de uma parte não-oxidativa, que interconverte açúcares fosforilados

A via das pentoses fosfato (Fig. 12.2) compreende uma etapa inicial, *oxidativa*, em que a glicose 6-fosfato é convertida a ribulose 5-fosfato e CO₂ por duas oxidações catalisadas por *desidrogenases* específicas para NADP⁺, intercaladas por uma reação de hidrólise. A equação geral desta etapa é:



A etapa oxidativa ocorre no sentido da conversão de NADP⁺ a NADPH, graças à irreversibilidade da reação catalisada pela *lactonase*.

A etapa subsequente, *não-oxidativa*, compreende a transformação da ribulose 5-fosfato a ribose 5-fosfato ou xilulose 5-fosfato, por ação de uma *isomerase* ou de uma *epimerase*, respectivamente. Estas pentoses sofrem, a seguir, uma série de conversões, originando açúcares fosforilados com número de átomos de carbono variando entre 3 e 7. Estas conversões são catalisadas por duas enzimas: a *transcetolase*, com tiamina pirofosfato (TPP) como grupo prostético, que transfere grupos de dois carbonos, e a *transaldolase*, que transfere grupos de três carbonos. Nos dois casos, a transferência é feita de uma cetose para uma aldose. Todas as reações da etapa não-oxidativa são reversíveis, permitindo a livre interconversão de açúcares diferentes.

A via das pentoses fosfato ocorre no citossol, como a glicólise. As duas vias, apesar de terem funções tão diferentes, estão intimamente relacionadas através de compostos comuns: glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. O compartilhamento de compostos e a reversibilidade das reações da etapa não-oxidativa dão grande flexibilidade às vias. Por exemplo, quando a demanda de NADPH aumenta devido à síntese aumentada de ácidos graxos, é possível a contínua produção de NADPH sem o concomitante acúmulo de ribulose 5-fosfato, já que este composto pode ser convertido a gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato que são utilizados pela glicólise. Por outro lado, estes intermediários da via glicolítica podem originar ribose 5-fosfato para a síntese de nucleotídeos, precursores, por exemplo, de ácidos nucleicos. Outras situações metabólicas, além das mencionadas, serão analisadas juntamente com a regulação da via das pentoses fosfato no Capítulo 20.

As reações que compõem a parte não-oxidativa da via das pentoses são amplamente distribuídas pelos tecidos, mas a parte oxidativa atua significativamente apenas em tecidos ativos em sínteses redutoras, como as de ácidos graxos e colesterol, que utilizam NADPH como agente redutor. Estas sínteses (Capítulo 16) ocorrem principalmente no fígado, tecido adiposo, glândulas mamárias e córtex da supra-renal. No fígado, um órgão muito ativo nas sínteses mencionadas, cerca de 30% do total de oxidação da glicose ocorre pela via das pentoses fosfato.

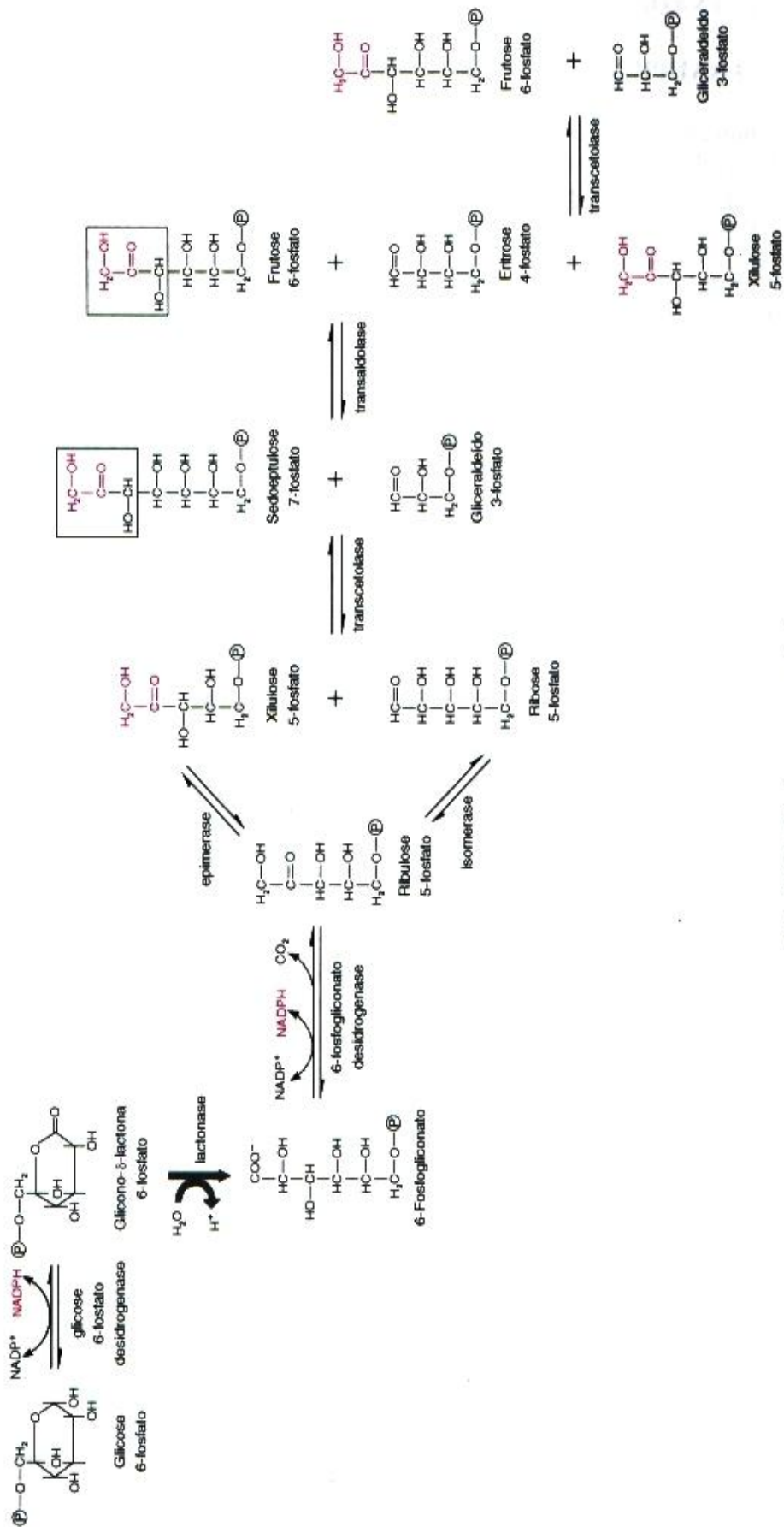


Fig. 12.2 Via das pentoses fosfato.

12.3 O NADPH COMO RESERVATÓRIO DE PODER REDUTOR

O NADPH também trabalha em associação com a glutaciona

O NADPH constitui uma reserva importante de poder redutor, imprescindível para a manutenção da integridade funcional das células. Sua atuação está, muitas vezes, associada ao tripeptídeo glutaciona. A *glutaciona* (Fig. 12.3) constitui o redutor mais imediato de vários processos celulares. Ao exercer sua ação redutora, os grupos SH de duas moléculas de glutaciona (GSH) são oxidados, passando a constituir o grupo S—S da glutaciona dissulfeto (GSSG). A restauração da forma SH da glutaciona é obtida por reação com NADPH (equações na pág. seguinte). Desta forma, podem ser mantidos como tais os grupos SH de resíduos de cisteína em proteínas (Fig. 12.4).

Muito importante também é a atuação da glutaciona na eliminação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos, formados em muitos processos oxidativos, particularmente em hemácias. A água oxigenada reage com duplas ligações de moléculas de ácidos graxos componentes da membrana plasmática,

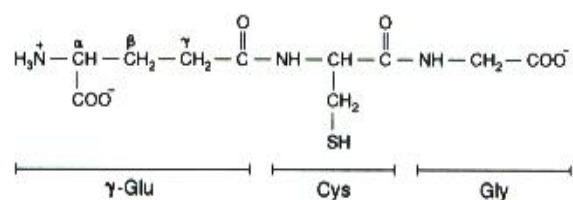


Fig. 12.3 Estrutura da glutaciona, um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina; a ligação peptídica entre Glu e Cys é exótica, porque envolve a γ -carboxila do glutamato.

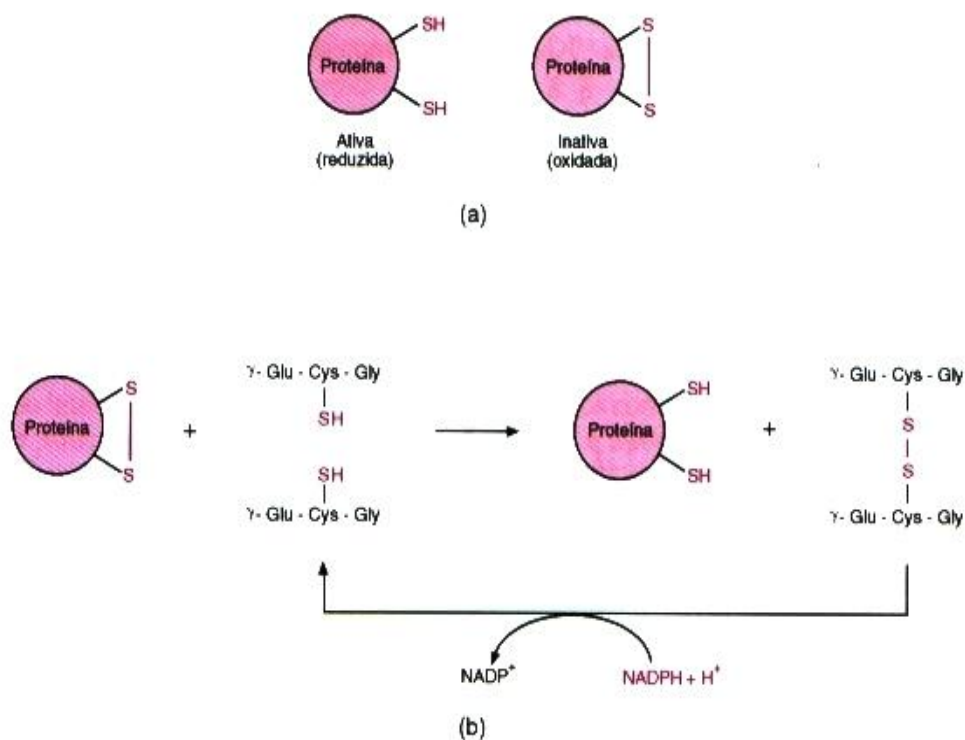


Fig. 12.4 Atuação da glutaciona como agente redutor. No exemplo, a proteína torna-se inativa por oxidação de grupos sulfidríla de resíduos de cisteína (a). A forma ativa (grupos SH) é recuperada por reação com glutaciona, que se converte a glutaciona dissulfeto. A regeneração da forma reduzida da glutaciona é obtida por reação com NADPH, catalisada por glutaciona redutase (b).

levando à peroxidação de ácidos graxos, causando danos à membrana e lise da hemácia. Além disso, a peroxidação de lipídios leva à formação de radicais livres, associados atualmente com a instalação de diversos quadros patológicos.

Os peróxidos são reduzidos pela glutatona em uma reação catalisada pela *glutathione peroxidase* (1), uma enzima peculiar por conter selênio. A glutatona dissulfeto é reduzida por NADPH, a coenzima da *glutathione reductase* (2):



É ainda a glutatona a responsável pela manutenção do íon de ferro presente na hemoglobina no estado de oxidação 2^+ , capacitando a hemoglobina a ligar-se com o oxigênio.

12.4 DEFICIÊNCIA GENÉTICA DE GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE

A deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase pode ser vantajosa

A deficiência hereditária de uma enzima geralmente provoca uma moléstia. Paradoxalmente, a falta parcial da enzima que inicia a via das pentoses fosfato, a glicose 6-fosfato desidrogenase, pode ser vantajosa para seus portadores, embora em circunstâncias muito definidas e restritas. Estima-se que há no mundo cerca de 400 milhões de portadores desta carência enzimática, e somente este dado revela sua importância relativa.

Na maioria dos casos de deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase, a atividade da enzima nas hemácias não é completamente ausente, mas drasticamente diminuída. Esta atividade residual é suficiente para que os portadores levem uma vida normal. Entretanto, quando são submetidos a condições em que são geradas quantidades grandes de peróxidos, são também exigidas quantidades grandes de NADPH, que esses indivíduos são incapazes de produzir. Instala-se, então, um quadro de grave anemia hemolítica. Uma destas condições é a administração de *primaquina*, um antimalárico de uso corrente. Por outro lado, a porcentagem de portadores da deficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase é alta em regiões onde a malária é moléstia endêmica, mostrando que a carência enzimática confere alguma proteção contra o *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária. Como este parasita cumpre parte de seu ciclo vital nas hemácias, é provável que hemácias deficientes em glicose 6-fosfato desidrogenase e, portanto, também deficientes em produtos da via das pentoses sejam incapazes de abrigar o parasita, sendo lisadas e interrompendo o processo de parasitismo. Este é mais um exemplo de vantagem seletiva de genes defectivos, como acontece com a anemia falciforme e as talassemias (Capítulo 2).

13

METABOLISMO DE CARBOIDRATOS: GLICOGÊNIO, AMIDO, SACAROSE E LACTOSE

13.1 METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

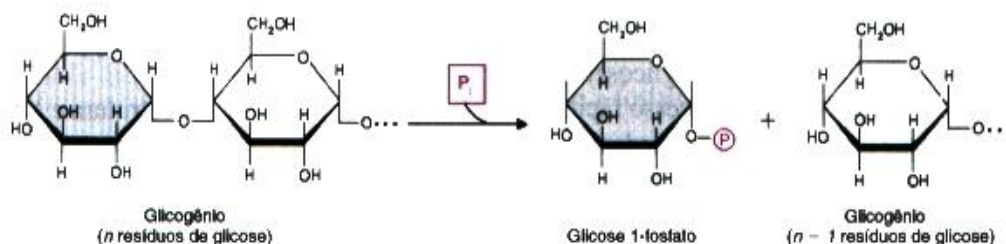
O glicogênio é um polímero de glicose e constitui uma forma de reserva deste açúcar. A vantagem biológica de armazenar a glicose como polímero é, naturalmente, a redução da osmolaridade, resultante do menor número de partículas em solução. O glicogênio é sintetizado principalmente pelo fígado e músculos quando a oferta de glicose supera as necessidades energéticas imediatas destes órgãos. Realmente, após as refeições, o fígado remove cerca de dois terços dos monossacarídeos absorvidos e utiliza parte deles para recompor sua reserva de glicogênio. Esta reserva atinge cerca de 100 g, aproximadamente um terço da reserva muscular. Ao serem degradadas, entretanto, essas reservas atendem necessidades diferentes. O glicogênio hepático é degradado produzindo glicose, que é exportada para manter a *glicemia* (concentração de glicose sangüínea) nos períodos entre as refeições e no jejum noturno. O glicogênio muscular provê energia exclusivamente para a própria fibra muscular em contração intensa, quando a demanda energética ultrapassa o aporte de oxigênio. Nestas condições, apenas os carboidratos podem servir como substrato para a obtenção de ATP, pois lipídios e aminoácidos só podem ser degradados aerobiamente. Em anaerobiose relativa, o glicogênio é convertido a lactato.

A estrutura do glicogênio está descrita no Capítulo 6, p. 93. O glicogênio e as enzimas que catalisam sua síntese e degradação, além de enzimas encarregadas da regulação destes processos, associam-se formando grânulos citossólicos.

A degradação do glicogênio produz glicose 1-fosfato

A degradação do glicogênio consiste na remoção sucessiva de resíduos de glicose, a partir das extremidades não-redutoras, por ação da *glicogênio fosforilase*, uma enzima que tem piridoxal fosfato, um derivado da vitamina B₆, como grupo prostético. Esta enzima catalisa a fosforólise da ligação α -1,4, liberando um resíduo

de glicose como glicose 1-fosfato. A reação é semelhante a uma hidrólise, com a diferença de usar fosfato inorgânico no lugar da água:



A ação da glicogênio fosforilase prossegue ao longo da cadeia, liberando um a um os resíduos de glicose, mas termina 4 resíduos antes de uma ramificação. A degradação pode continuar por ação de outra enzima, chamada *enzima desramificadora*, que apresenta duas atividades distintas. Através de sua ação como *transferase*, transfere 3 dos 4 resíduos de glicose remanescentes junto à ramificação para uma outra extremidade da cadeia de glicogênio, formando uma nova ligação α -1,4; na sua nova posição, estes resíduos podem ser liberados por ação da glicogênio fosforilase. O resíduo de glicose restante é aquele que está ligado à cadeia principal por ligação α -1,6. Esta ligação é hidrolisada pela segunda atividade da enzima desramificadora, a

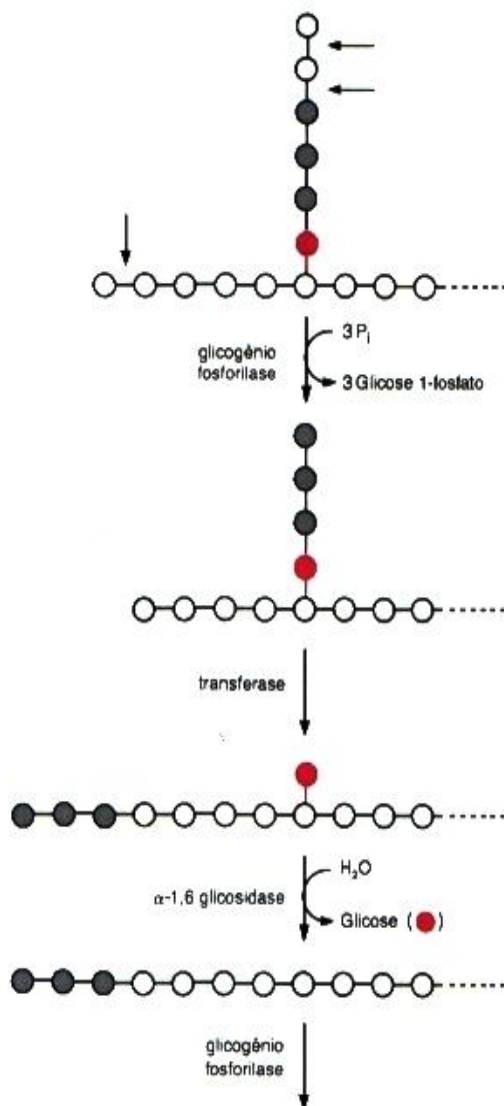


Fig. 13.1 Esquema da degradação do glicogênio.

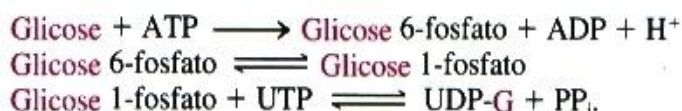
atividade de α -1,6 glicosidase. É interessante que, neste caso, ocorre uma hidrólise, em lugar da fosforólise produzida pela glicogênio fosforilase (Fig. 13.1).

A glicose 1-fosfato é convertida pela *fosfoglicomutase* a glicose 6-fosfato, que pode ser degradada pela glicólise, formando lactato, no músculo. No fígado, a glicose 6-fosfato é preferencialmente hidrolisada por ação da *glicose 6-fosfatase*, produzindo glicose, que é liberada na circulação.

A degradação de glicogênio é um processo rápido e eficiente, graças à sua própria estrutura e à presença das enzimas de degradação intimamente associadas aos grânulos de glicogênio: o grande número de ramificações da cadeia possibilita a ação simultânea de muitas moléculas de fosforilase a partir de cada uma das extremidades não-redutoras. Assim, mais de 50% das ramificações da cadeia de glicogênio muscular são degradados em poucos segundos, quando a demanda energética é intensa. No caso da degradação do glicogênio hepático, a rapidez do processo corrige o nível glicêmico, evitando a hipoglicemia. A degradação do glicogênio, entretanto, quase nunca é completa, restando um núcleo não degradado que serve de ponto de partida para a ressíntese.

A síntese de glicogênio utiliza como precursor uma forma ativada de glicose e gasta 2 ATP por glicose incorporada

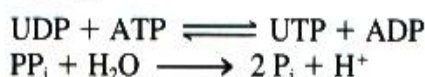
O glicogênio é sintetizado por uma via diferente da via de degradação. A síntese consiste na repetida adição de resíduos de glicose às extremidades de um núcleo de glicogênio. A glicose a ser incorporada deve estar sob uma forma ativada, ligada a um nucleotídeo de uracila, constituindo a *uridina difosfato glicose (UDP-G)*. O UDP-G (Fig. 13.2) é produzido, a partir de glicose, pela seguinte série de reações:



Esta última reação é catalisada pela *glicose 1-fosfato uridil transferase* (Fig. 13.3). O UDP-G é substrato da *glicogênio sintase*, a enzima que, efetivamente, catalisa a síntese:



O UDP produzido na reação catalisada pela glicogênio sintase é reconvertido a UTP à custa de ATP, pela *nucleosídeo difosfato quinase*, e o pirofosfato ($\text{HP}_2\text{O}_7^{3-}$ ou PP_i) é hidrolisado por ação da *pirofosfatase*, produzindo fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} ou P_i):



A soma de todas as reações anteriores é:

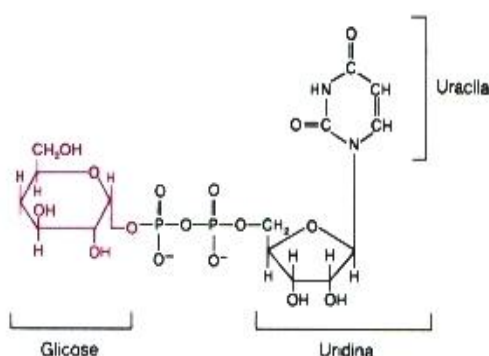
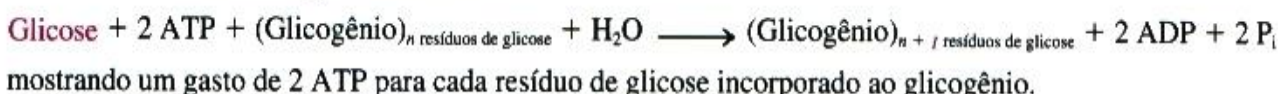


Fig. 13.2 Estrutura da uridina difosfato glicose (UDP-G).



Fig. 13.3 Reação catalisada pela glicose 1-fosfato uridil transferase.

Além da síntese de glicogênio, muitos processos biossintéticos contêm reações reversíveis que produzem PP_i . Este produto, entretanto, é sempre hidrolisado por pirofosfatases, enzimas muito ativas e amplamente distribuídas pelos tecidos. Esta hidrólise, altamente irreversível, é um fator importante para encaminhar os processos no sentido da síntese.

A glicogênio sintase catalisa apenas a síntese de ligações α -1,4. As ramificações são feitas por uma *enzima ramificadora*, que transfere uma pequena cadeia de 6 ou 7 resíduos de glicose da extremidade para uma parte mais interna da molécula, criando uma ligação α -1,6 (Fig. 13.4).

A reação de síntese de glicogênio catalisada pela glicogênio sintase prevê a existência de uma cadeia de glicogênio já constituída, à qual são agregados novos resíduos de glicose. Este processo é viável desde que, na degradação anterior, tenha permanecido um núcleo do polímero que dê o suporte para a extensão da cadeia. Quando isto não ocorre, o processo inicia-se de forma um pouco diferente, já que a glicogênio sintase não é capaz de catalisar a união dos dois primeiros resíduos de glicose, iniciando a cadeia do polímero. Uma proteína, chamada *glicogenina*, serve de apoio ao início da síntese, através de um dos seus resíduos de tirosina. Ao radical OH do grupo R desta tirosina é transferido o primeiro resíduo de glicose, sempre derivado de UDP-G, por ação de uma *glicosil transferase*. A própria glicogenina, então, catalisa a incorporação de novos resíduos de glicose, até formar uma pequena cadeia de 6 ou 7 resíduos. Neste momento entra em ação a glicogênio sintase, que estende a polimerização, enquanto a glicogenina desliga-se do polímero em crescimento.

As vias de degradação e síntese do glicogênio hepático estão resumidas na Fig. 13.5. No músculo, as reações que interconvertem glicogênio e glicose 6-fosfato são idênticas às do fígado. No entanto, no músculo, a glicose 6-fosfato não pode originar glicose, devido à ausência de glicose 6-fosfatase; além disso, a fosforilação da glicose é feita pela hexoquinase. **No Capítulo 20 serão descritos os processos de regulação da síntese e degradação do glicogênio hepático e muscular.**

Doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio

São conhecidas várias moléstias hereditárias cuja causa primária é a deficiência (ausência ou diminuição da atividade) de uma das enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio. Os portadores destas moléstias

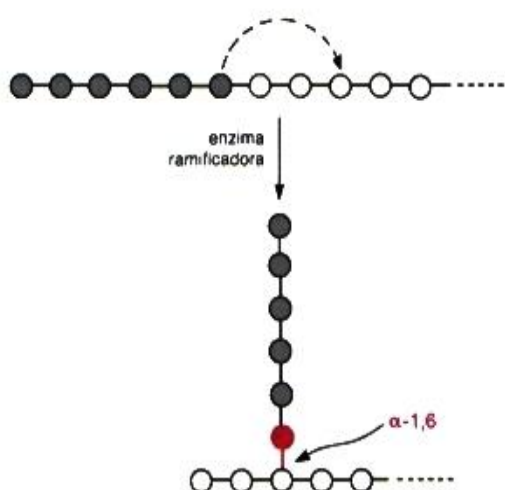


Fig. 13.4 Formação de uma ramificação da cadeia do glicogênio. A síntese prossegue por adição de resíduos de glicose às extremidades não-redutoras catalisada pela glicogênio sintase.

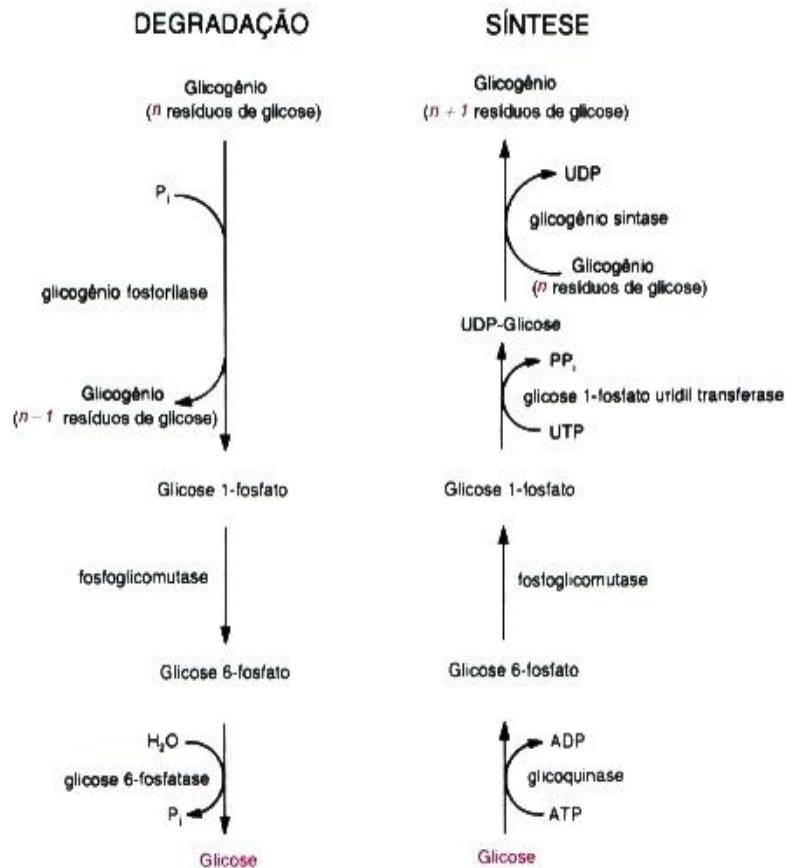


Fig. 13.5 Esquema geral da degradação e síntese de glicogênio no fígado.

geralmente apresentam aumento do depósito de glicogênio que, em alguns casos, aparece com estrutura anormal. O Quadro 13.1 apresenta uma lista das doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio, indicando a enzima alterada e alguns dos sintomas observados nos portadores destas anomalias.

Quadro 13.1 Doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio

Tipo	Enzima deficiente	Conseqüências
I	von Gierke Glicose 6-fosfatase	Acúmulo de glicogênio hepático e aumento do fígado; incapacidade de corrigir a glicemia no jejum
II	Pompe α -1,4 Glicosidase ¹	Acúmulo generalizado de glicogênio, insuficiência cardiorrespiratória e morte precoce
III	Cori Enzima desramificadora	Glicogênio com ramificações curtas, resultantes da ação da glicogênio fosforilase
IV	Andersen Enzima ramificadora	Glicogênio com cadeias muito longas não ramificadas; morte precoce
V	McArdle Glicogênio fosforilase muscular	Incapacidade de realizar exercícios intensos
VI	Hers Glicogênio fosforilase hepática	Semelhantes às do tipo I, mas menos intensas
VII	— Fosfofrutoquinase muscular	Semelhantes à do tipo V
VIII	Tarui Fosforilase quinase hepática	Semelhantes às do tipo I, mas menos intensas
IX	— Glicogênio sintase hepática	Diminuição do glicogênio hepático

¹Enzima lisossômica que hidrolisa os segmentos lineares do glicogênio; em indivíduos normais, constitui uma via secundária do metabolismo do glicogênio.

13.2 SÍNTESE DE AMIDO

Nos vegetais, o polímero de glicose utilizado como reserva é o amido, que tem estrutura muito similar à do glicogênio, muito menos ramificado, porém. O amido é composto de α -*amilose*, uma cadeia linear de resíduos de glicose unidos por ligações α -1,4 e de *amilopectina*, de cadeia principal idêntica à amilose, mas contendo ramificações formadas, como no glicogênio, por ligações α -1,6. Na amilopectina estas ramificações ocorrem a cada 20 ou 30 resíduos de glicose, enquanto, no glicogênio, a frequência é, em média, de uma ramificação a cada 10 resíduos. A síntese do amido é muito semelhante à do glicogênio, com a substituição da forma ativada da glicose de UDP-glicose por *ADP-glicose* (*ADP-G*). As reações que se processam são as seguintes:



A reação é catalisada pela *ADP-glicose sintase*. *ADP-G* é substrato da *amido sintase*, a enzima que, efetivamente, catalisa a incorporação de glicose ao polímero:



13.3 METABOLISMO DE SACAROSE E LACTOSE

Sacarose e lactose originam, além de glicose, frutose e galactose

A sacarose da dieta constitui uma fonte quantitativamente importante de monossacarídeos para o homem; a lactose, o açúcar presente no leite, tem importância principalmente nos primeiros meses de vida. Estes dissacarídeos são hidrolisados no intestino delgado, por *sacarase* e *lactase*, respectivamente (Fig. 13.6). A sacarose produz glicose e frutose; a lactose libera glicose e galactose. A deficiência de lactase ("intolerância à lactose") em indivíduos adultos é relativamente comum. Não sendo hidrolisada, a lactose permanece no intestino delgado, onde sofre fermentação bacteriana, que resulta na produção de gases e ocasiona diarreia.

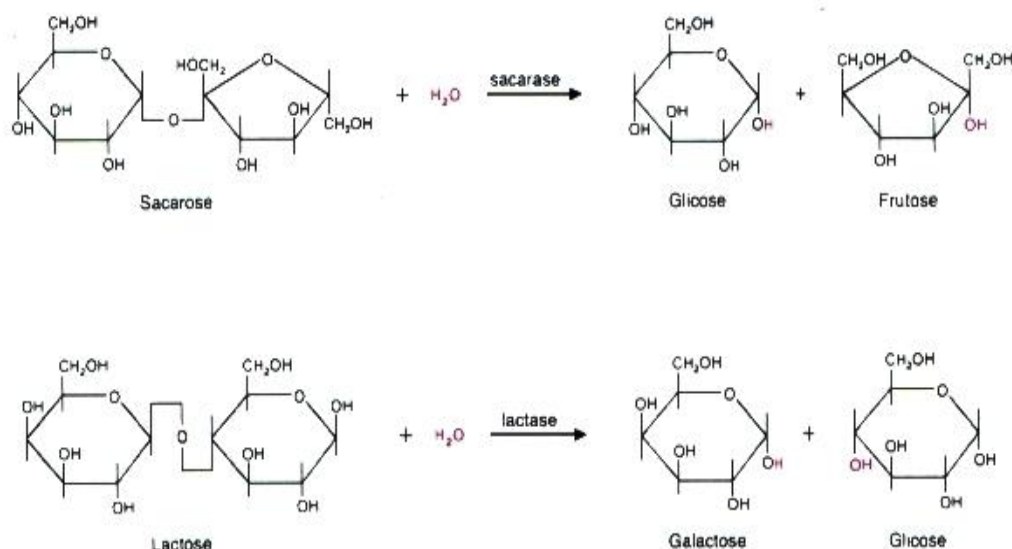


Fig. 13.6 Hidrólise de sacarose e lactose.

Frutose e galactose são absorvidas e metabolizadas, em sua maior parte, no fígado, através de sua conversão a intermediários da glicólise (Fig. 13.7).

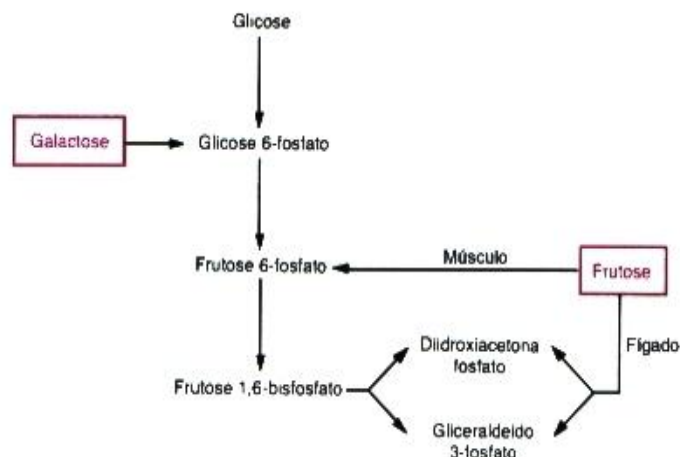
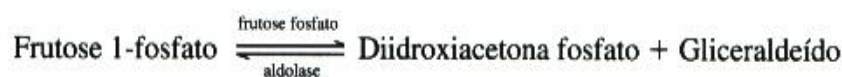


Fig. 13.7 A frutose e a galactose são metabolizadas através da via glicolítica.

A **frutose** é convertida a diidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, através das seguintes reações:



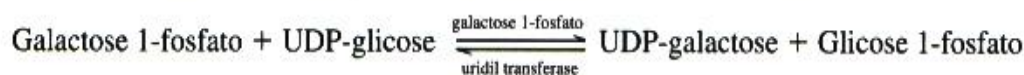
A soma destas reações mostra a transformação de frutose em intermediários da via glicolítica:



Em outros tecidos (adiposo e músculo), a frutose é convertida a frutose 6-fosfato pela hexoquinase:



Galactose e glicose são *epímeros*, isto é, são açúcares que diferem apenas quanto à configuração de um único átomo de carbono, neste caso o carbono 4. A transformação de uma destas hexoses na outra compreende, entretanto, uma série de reações, uma vez que a epimerização só é feita com os açúcares ligados a UDP:

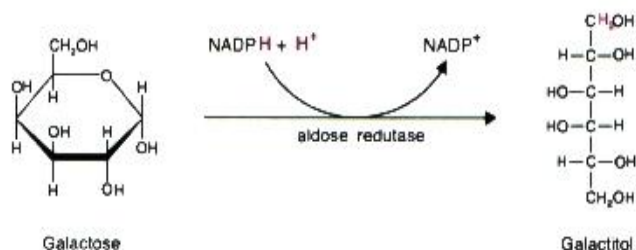


A soma destas reações é:



A galactosemia resulta do metabolismo anormal da galactose

A deficiência hereditária da *galactose 1-fosfato uridil transferase* provoca uma doença grave, a *galactosemia*, manifestada logo após o nascimento e que leva a desenvolvimento físico e mental retardados. A impossibilidade de metabolizar normalmente a galactose leva à sua utilização por vias pouco significativas em indivíduos saudáveis, como, por exemplo, a redução a *galactitol*:



O acúmulo de galactitol no cristalino, que tem uma aldose redutase muito ativa, leva à catarata.

Os efeitos da moléstia podem ser evitados suprimindo precocemente a lactose da dieta. O diagnóstico, que portanto também deve ser precoce, é feito pela dosagem de galactose 1-fosfato uridil transferase nos glóbulos vermelhos.

14

GLICONEOGÊNESE

14.1 ORIGEM DA GLICOSE CIRCULANTE EM ANIMAIS SUPERIORES

A maioria dos tecidos animais é capaz de suprir suas necessidades energéticas a partir da oxidação de vários tipos de compostos: açúcares, aminoácidos, ácidos graxos. Alguns tecidos e células de animais superiores, entretanto, utilizam exclusivamente glicose como fonte de energia (Quadro 14.1). Este é o caso do cérebro, que consome cerca de 120 g de glicose por dia, e das hemácias, que necessitam de cerca de 30 g diários. Mais de 20% do conteúdo calórico de uma dieta normal são destinados apenas a suprir as necessidades energéticas do cérebro e das hemácias. Para que este suprimento seja ininterrupto, o organismo dispõe de mecanismos destinados a manter a oferta de glicose circulante, possibilitando sua captação contínua por aqueles tipos de célula, mesmo em tempos afastados da ingestão de refeições. À medida que vai diminuindo a concentração de glicose circulante derivada diretamente da absorção dos alimentos, a degradação crescente do glicogênio hepático incumbe-se da manutenção da concentração adequada de glicose sanguínea. No entanto, a reserva hepática de glicogênio é limitada e insuficiente para manter níveis glicêmicos normais além de 8 horas de jejum. Após este período, a contribuição da reserva de glicogênio decresce, ao mesmo tempo em que é acionada uma outra via metabólica de produção de glicose. Esta outra via, que se processa no fígado e, minoritariamente, nos rins, é a *gliconeogênese*. Como seu nome indica, a *gliconeogênese* consiste na síntese de glicose a partir de compostos que não são carboidratos: *aminoácidos*, *lactato* e *glicerol*.

Quadro 14.1 Fonte de energia para diferentes tecidos

Tecido	Composto		
	Glicose	Ácidos graxos	Corpos cetônicos
Cérebro	+		
Hemácias e leucócitos	+		
Medula renal	+		
Retina	+		
Mucosa intestinal	+		
Fígado	+	+	
Adiposo	+	+	
Músculos esqueléticos e cardíaco	+	+	+
Córtex renal	+	+	+

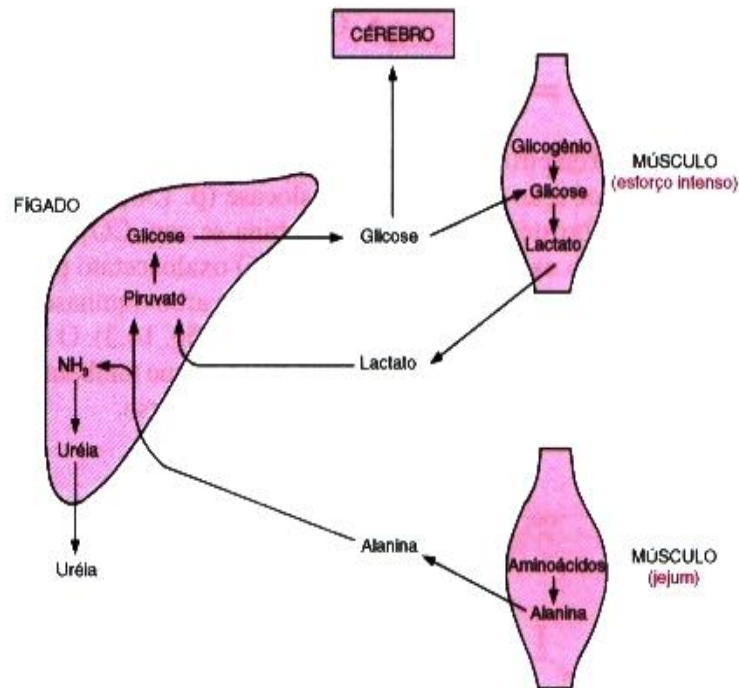


Fig. 14.1 Relação entre diferentes órgãos na gliconeogênese — esta via ocorre no fígado a partir de substratos produzidos pelo músculo: lactato no esforço intenso e alanina no jejum; o lactato origina-se, ainda, de hemácias. A maior parte da glicose sintetizada destina-se ao cérebro.

Com exceção de lisina e leucina (Capítulo 17), todos os aminoácidos podem originar glicose. Os aminoácidos são provenientes de degradação de proteínas endógenas, principalmente as musculares, durante o jejum; ainda no músculo, são convertidos a alanina, a forma de transporte de aminoácidos até o fígado (Fig. 14.1). O lactato origina-se dos músculos submetidos a contração intensa e de outras células que degradam glicose anaerobiamente — medula renal, retina e, principalmente, hemácias. O glicerol é derivado da hidrólise de triacilgliceróis do tecido adiposo durante o jejum e tem pequena importância quantitativa na produção de glicose.

O fígado é o principal órgão responsável pela gliconeogênese, e, apenas em casos de jejum muito prolongado, o córtex renal chega a dar uma contribuição importante.

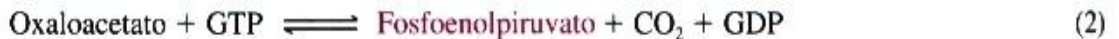
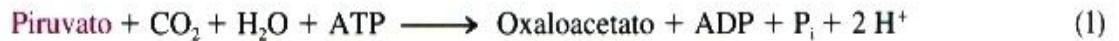
14.2 REAÇÕES DA GLICONEOGÊNESE

A gliconeogênese utiliza as reações reversíveis da glicólise e substitui por outras as reações irreversíveis

A transformação de alanina e lactato em glicose inicia-se por sua conversão a piruvato. A alanina origina piruvato por ação da *alanina aminotransferase*, que será descrita na degradação de aminoácidos (p. 218); o lactato é convertido a piruvato por ação da lactato desidrogenase (p. 126). A transformação de piruvato em glicose pela gliconeogênese processa-se no sentido oposto ao da glicólise, utilizando quase todas as suas enzimas, com exceção daquelas que catalisam reações irreversíveis — piruvato quinase, fosfofrutoquinase e glicoquinase. Estas reações são contornadas através de **outras** reações, catalisadas, naturalmente, por **outras** enzimas. As três etapas em que a gliconeogênese difere da glicólise — etapas 1 a 3 — serão analisadas a seguir.

Etapa 1. Conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato

A reação catalisada pela *piruvato quinase* [Fosfoenolpiruvato + ADP → Piruvato + ATP] é substituída por duas reações, catalisadas pela *piruvato carboxilase* (1) e pela *fosfoenolpiruvato carboxiquinase* (2):



Para ser utilizado como substrato da piruvato carboxilase, uma enzima mitocondrial, o piruvato produzido no citossol entra na mitocôndria por ação da piruvato translocase (p. 158). A piruvato carboxilase contém *biotina* (vitamina B₇), como grupo prostético. A biotina combina-se com CO₂ à custa de ATP e promove a carboxilação do piruvato, produzindo oxaloacetato (Fig. 14.2). O oxaloacetato passa para o citossol através da lançadeira do malato-aspartato e, por ação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, é convertido a fosfoenolpiruvato, através de descarboxilação e fosforilação à custa de GTP (Fig. 14.3). O fosfoenolpiruvato produzido nesta etapa é transformado em **frutose 1,6-bisfosfato** pelas enzimas que também compõem a glicólise, que, como catalisam reações reversíveis, podem operar a via no sentido inverso.

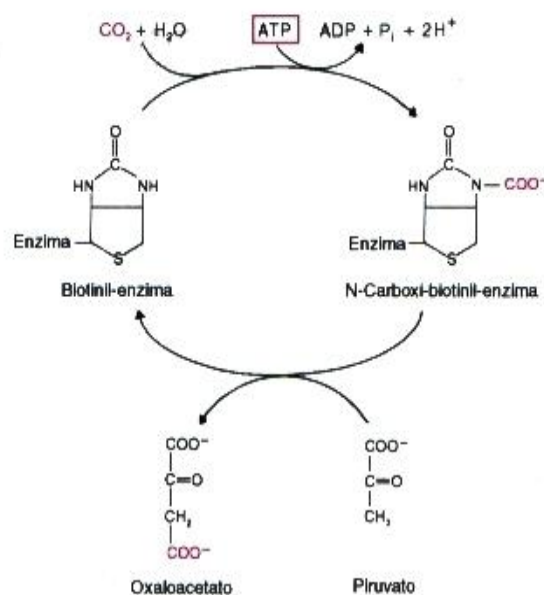
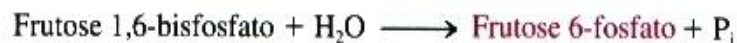


Fig. 14.2 Carboxilação de piruvato formando oxaloacetato: o ATP é consumido na carboxilação da biotina, que transfere o grupo -COO⁻ para o piruvato.

Etapa 2. Conversão de frutose 1,6-bisfosfato a frutose 6-fosfato

A reação irreversível catalisada pela fosfofrutoquinase é substituída por uma reação de hidrólise do grupo fosfato do carbono 1, catalisada pela *frutose 1,6-bisfosfatase*.



A frutose 6-fosfato pode ser isomerizada a **glicose 6-fosfato** pela fosfoglicoisomerase.

Etapa 3. Conversão de glicose 6-fosfato a glicose

Para contornar a irreversibilidade da reação catalisada pela glicoquinase, esta reação é substituída por uma reação de hidrólise do grupo fosfato ligado ao carbono 6, catalisada pela *glicose 6-fosfatase*. É, portanto, uma reação semelhante à anterior.



O produto da reação, a *glicose*, ao contrário da glicose fosforilada, pode atravessar livremente a membrana plasmática. A *glicose 6-fosfatase* ocorre **exclusivamente** em fígado e rins, e é graças à sua presença que estes órgãos, principalmente o fígado, podem exportar glicose para corrigir a glicemia.

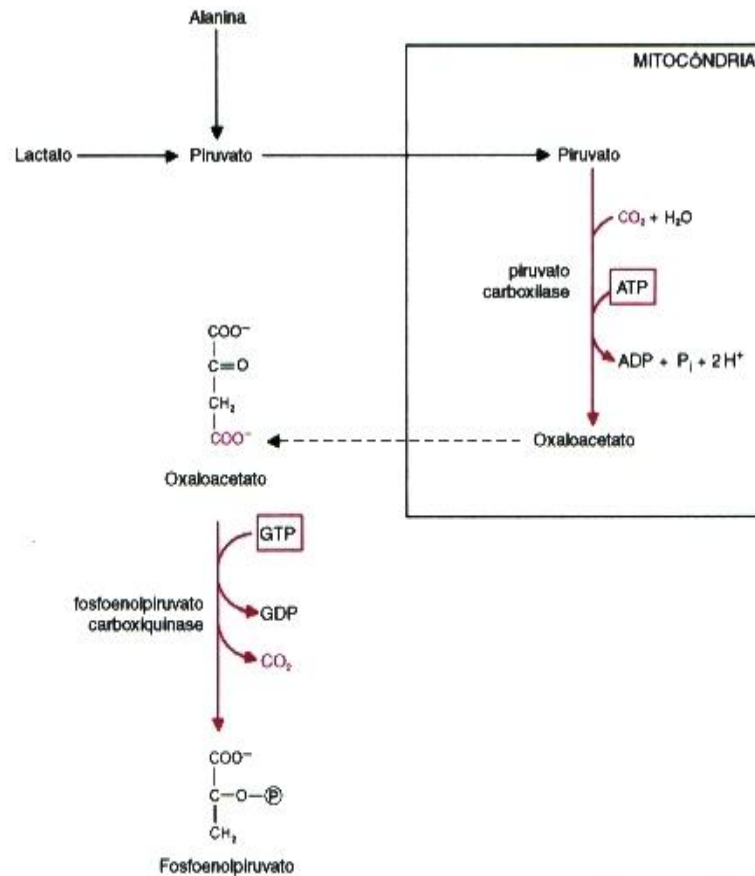


Fig. 14.3 A conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato compreende o transporte de piruvato para a mitocôndria, sua carboxilação a oxaloacetato, o transporte de oxaloacetato para o citossol e a transformação deste composto em fosfoenolpiruvato.

O glicerol, para ser usado como composto gliconeogênico, é fosforilado a glicerol 3-fosfato, que é oxidado a diidroxiacetona fosfato (p. 195). Este é um composto da via glicolítica e pode, portanto, prosseguir em direção à glicose pelas reações da glicólise e as substitutivas (frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase). A Fig. 14.4 apresenta um esquema geral da gliconeogênese.

14.3 BALANÇO ENERGÉTICO DA GLICONEOGÊNESE

Pelo processo descrito, a glicose é produzida no fígado e pode ser exportada do hepatócito, destinando-se às células que dela necessitam. A gliconeogênese é uma síntese, pois utiliza um precursor de três carbonos e tem como produto final um composto de seis carbonos, a glicose. Como todas as sínteses, é um processo que consome energia, sob a forma de ATP. De fato, para cada molécula de glicose formada a partir de duas moléculas de piruvato são necessários 6 ATP, utilizados nas reações catalisadas por piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (que, na verdade, usa GTP mas, para o balanço energético, pode ser computado como ATP) e fosfoglicerato quinase.

A equação geral da gliconeogênese a partir de piruvato é:



Se o composto inicial for o lactato, a equação transforma-se em:



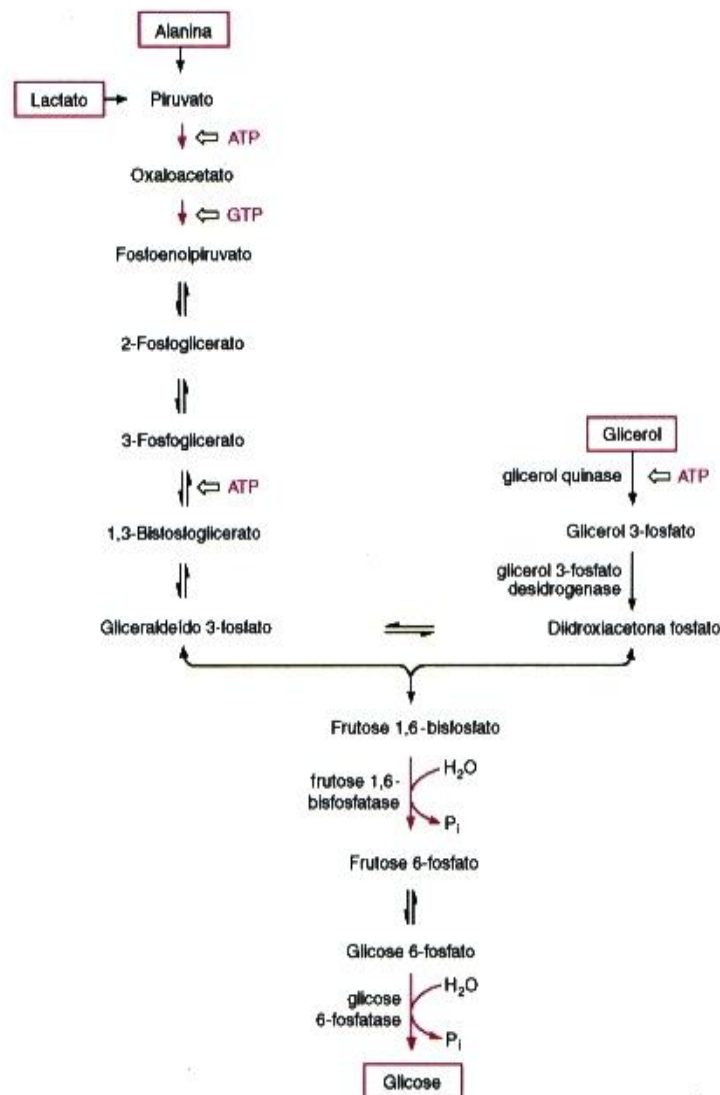


Fig. 14.4 Esquema simplificado da gliconeogênese. As reações que convertem piruvato a oxaloacetato e fosfoenolpiruvato estão detalhadas na Fig. 14.3. As reações comuns à via glicolítica podem ser encontradas na sua forma completa na Fig. 9.5. Deve-se ressaltar que são necessárias *duas* moléculas de cada um dos compostos gliconeogênicos — alanina, lactato, glicerol — para sintetizar *uma* molécula de glicose.

No caso do glicerol, a síntese de uma molécula de glicose consome apenas 2 ATP na reação catalisada pela glicerol quinase.

14.4 DEGRADAÇÃO DE PROTEÍNAS E GLICONEOGÊNESE

A degradação de proteínas é um processo normal

A utilização de aminoácidos para a gliconeogênese não é um processo excepcional, que ocorra em condições extremas, mas uma via metabólica habitual que opera quotidianamente, contribuindo para a manutenção da glicemia durante o jejum noturno (Fig. 21.3). Não é, portanto, verdadeira a idéia difundida de que a degradação de proteínas com finalidade de obter energia só se processa quando estão esgotadas as reservas de carboidratos e de lipídios, após jejum prolongado. Nem poderia ser diferente, uma vez que a reserva de carboidratos é pequena e *os mamíferos não dispõem de vias capazes de transformar os ácidos graxos, principais constituintes da reserva lipídica, em glicose.*

Os ácidos graxos habitualmente presentes nos alimentos e nas reservas lipídicas são moléculas lineares e de número par de átomos de carbono. Na sua degradação, estes ácidos graxos (ou seja, a grande maioria dos ácidos graxos) são convertidos a acetil-CoA (Capítulo 16) e *não há vias de conversão de acetil-CoA a glicose nos mamíferos*. A exceção está nos ácidos graxos de número ímpar de carbonos ou contendo ramificações na sua molécula, que, quando oxidados, originam, além de acetil-CoA, propionil-CoA (Capítulo 16). Este composto pode ser transformado em succinil-CoA, um intermediário do ciclo de Krebs, que pode, portanto, gerar glicose. A contribuição desses ácidos graxos para a gliconeogênese, no entanto, *é bastante pequena*, pela sua pouca representatividade nas dietas e, principalmente, por não serem armazenados como tais pelos mamíferos. Vegetais e bactérias é que são capazes de sintetizar glicose a partir de ácidos graxos, por possuírem as enzimas do ciclo do glioxilato (p. 134), *ausente nos mamíferos*.

Assim, a degradação de proteínas e a utilização de seus aminoácidos para a gliconeogênese é um processo fisiológico normal, acionado precocemente, antes mesmo que a reserva hepática de glicogênio torne-se insuficiente para a manutenção da glicemia.

A glicólise e a gliconeogênese são vias praticamente opostas, compartilhando a maioria de suas enzimas. Para que haja um ganho líquido é, portanto, imprescindível que uma das vias funcione enquanto a outra está inativa. De fato, *as atividades destas duas vias são inversamente reguladas, como será analisado no Capítulo 20*.

15

FOTOSSÍNTESE

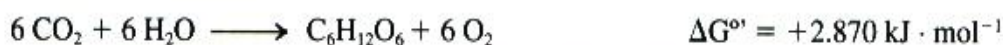
Para o desempenho de suas funções, os seres vivos utilizam, fundamentalmente, a energia química contida na molécula de ATP, e nisto todos se assemelham. O processo de obtenção de ATP, entretanto, difere e permite separar os organismos em dois grandes grupos: os que produzem ATP a partir da energia gerada pela oxidação de compostos químicos (*quimiotróficos*) e os que o produzem a partir da energia luminosa (*fototróficos*).

A *fotossíntese* é o processo pelo qual a energia luminosa é transformada em energia química, armazenada nas moléculas de ATP e de NADPH. Os organismos capazes de efetuar este processo são as bactérias verdes e púrpuras, as cianobactérias, as algas e as plantas. O processo é apropriadamente denominado *fotossíntese* porque, além da síntese de ATP, em uma segunda etapa, as coenzimas ATP e NADPH são utilizadas para adicionar CO₂ a moléculas orgânicas preexistentes, caracterizando outra síntese, esta de carboidrato. A incorporação de CO₂ a compostos orgânicos não é um processo exclusivo de células fotossintetizantes. Ao contrário, tem ocorrência generalizada em outras células, como nas dos animais, através de várias reações de carboxilação, presentes em seu metabolismo: através de carboxilação o piruvato origina oxaloacetato, a acetil-CoA produz malonil-CoA etc. A síntese de moléculas orgânicas também é um processo celular trivial, qualquer que seja a célula considerada. Os animais são capazes, por exemplo, de sintetizar glicose a partir de piruvato, originado de aminoácidos ou lactato (gliconeogênese) e de sintetizar macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, glicogênio e triacilgliceróis, a partir de moléculas precursoras pequenas. Em todos estes casos, entretanto, a energia (ATP) utilizada para a carboxilação ou outras sínteses é sempre derivada da oxidação de compostos orgânicos, de tal maneira que, no saldo final, *nunca* há incorporação líquida de CO₂. Estes organismos, por dependerem sempre da obtenção de carbono na forma de compostos orgânicos oxidáveis, são designados *heterotróficos*. Nos organismos que fazem fotossíntese, por outro lado, a incorporação de CO₂ também utiliza ATP e NADPH, mas como estas coenzimas são obtidas a partir da energia luminosa (sem "gasto" de compostos orgânicos transformados em CO₂), há aumento real da massa de compostos orgânicos; como estes organismos independem de uma fonte externa de compostos orgânicos, podendo viver à custa de CO₂ como única fonte de carbono, são designados *autotróficos*.

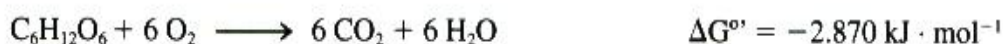
Como quase todos os organismos que não fazem fotossíntese dependem da energia química presente nos compostos produzidos pelos seres fotossintetizadores, pode-se dizer que toda a energia consumida pelos sistemas biológicos deriva primariamente da energia solar.

15.1 FOTOSSÍNTESE VERSUS OXIDAÇÃO DA GLICOSE

A equação geral da fotossíntese é



Esta equação é exatamente o inverso da equação de oxidação total da glicose, que ocorre em todas as células aeróbias:



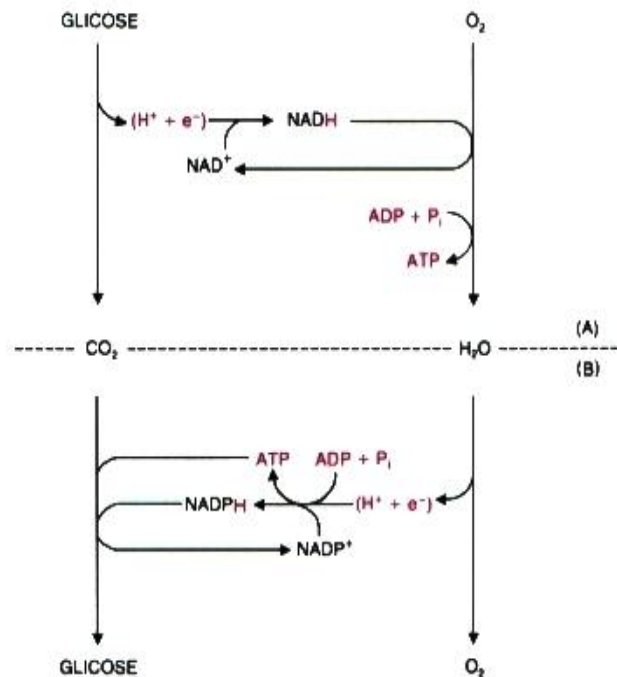


Fig. 15.1 Esquema comparativo entre a oxidação completa de glicose (A) e sua síntese através da fotossíntese (B).

Entretanto, deve ser ressaltado que a fotossíntese *não* é um processo inverso ao da *respiração*, comumente definida como a oxidação da glicose a CO₂ e H₂O. Esta definição é imprecisa, porque outros compostos, como ácidos graxos ou aminoácidos, podem igualmente ser oxidados pela respiração (oxidação aeróbia), levando a equações bastante diferentes. A equação apresentada refere-se particularmente à oxidação aeróbia da glicose. Respiração e fotossíntese têm, na realidade, vários aspectos comuns.

Um esquema comparativo dos processos de fotossíntese e de oxidação de glicose está apresentado na Fig. 15.1. A equação geral da fotossíntese, tal como a da oxidação completa de glicose, é a tradução em uma equação química simplificada de um processo extremamente complexo. O estudo termodinâmico desta equação revela, pelo valor de seu ΔG° ou de sua constante de equilíbrio (da ordem de 10^{-500}), a inviabilidade espontânea desta síntese. A produção de glicose a partir de CO₂ e H₂O só é possível nos organismos que desenvolveram sistemas que lhes permitem utilizar a energia luminosa para atender o enorme gasto de energia que viabiliza o processo.

Como foi assinalado, a fotossíntese e a oxidação aeróbia de glicose apresentam características comuns, incluindo a utilização de uma cadeia de transporte de elétrons. Na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, o doador inicial de elétrons é uma coenzima reduzida, NADH ou FADH₂, e o aceptor final é o oxigênio; na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese dos vegetais, o doador inicial de elétrons é a água, e o aceptor final, a coenzima NADP⁺. Em ambos os casos, o transporte de elétrons gera um gradiente de prótons, a partir do qual o ATP é sintetizado.

A utilização da água como agente redutor significou um avanço evolutivo da capacidade fotossintética

Acredita-se que, nos estágios mais primitivos da evolução, as células viviam em um meio rico, de composição variada, mas sem oxigênio. Obtinham energia por metabolismo anaeróbio, fermentando compostos orgânicos disponíveis no meio. A partir da fermentação eram produzidos ATP e poder redutor (NADH ou NADPH), utilizados em seu metabolismo; álcoois e ácidos orgânicos resultantes das fermentações eram excretados para o meio. Em um estágio posterior da evolução, a escassez crescente de material orgânico pron-

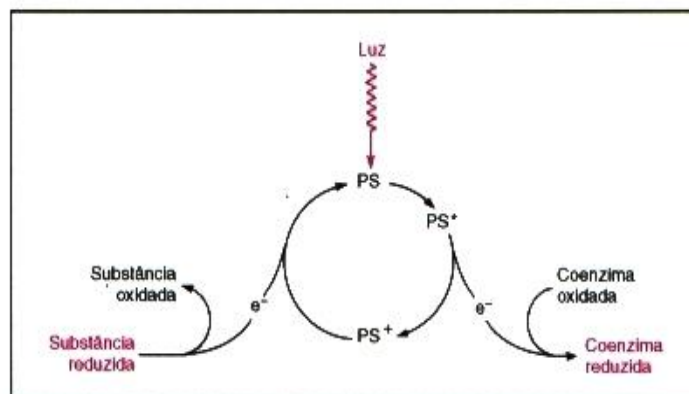
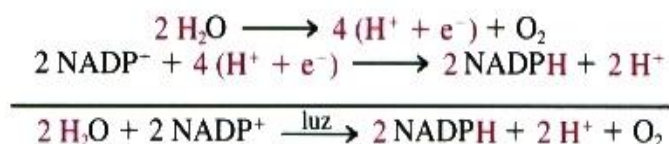


Fig. 15.2 Funcionamento de um fotossistema simples (PS) que, por absorção de luz, torna-se excitado (PS*) e emite elétrons (e^-), recebidos por uma coenzima; o fotossistema oxidado (PS⁺) recupera sua forma original recebendo elétrons de um composto redutor presente no meio.

tamente fermentável favorecia a utilização de uma fonte de carbono alternativa. Uma fonte provável, devido à sua abundância no meio, era o gás carbônico, que poderia ser convertido em moléculas orgânicas. Todavia, para esta transformação, eram necessários redutores potentes como NADH e NADPH, que não estavam mais sendo produzidos por fermentação; ainda mais, os doadores de hidrogênio disponíveis — ácidos orgânicos originados de fermentação, H_2S , H_2 , H_2O etc. — tinham um poder redutor insuficiente para a fixação do CO_2 . Todas estas condições propiciaram o desenvolvimento de um mecanismo que utilizasse a energia luminosa para transferir ($H^+ + e^-$) de um composto reduzido presente no meio para o NAD^+ formando NADPH, capaz de reduzir o CO_2 . Em outras palavras, estas condições permitiram o aparecimento das primeiras bactérias fotossintetizadoras.

Estas bactérias, semelhantes às bactérias verdes atuais, desenvolveram um aparelho fotossintético simples, composto de um fotossistema capaz de captar luz, tornando-se excitado, isto é, passando a ter um elétron de alta energia que podia ser transferido a uma coenzima ($NADP^+$). Como consequência desta transferência, a molécula que havia captado a energia luminosa ficava com deficiência de um elétron, ou seja, ficava oxidada; para que o processo pudesse prosseguir, era necessária a existência, no meio ambiente, de um redutor capaz de repor esse elétron (Fig. 15.2). A sobrevivência dessas bactérias estava, portanto, restrita aos locais onde havia disponibilidade desse redutor (H_2S , H_2 etc.).

Foram as cianobactérias (anteriormente denominadas de algas azuis), os primeiros organismos a se libertarem do uso desses redutores específicos, ao desenvolverem um aparelho fotossintético capaz de utilizar um redutor abundante: a água. De fato, a água pode ser usada como um redutor, originando quatro prótons e quatro elétrons e liberando oxigênio molecular. Os elétrons e prótons são usados na redução de $NADP^+$. A equação geral do processo pode, portanto, ser desmembrada em duas etapas:



A fotossíntese trouxe modificações profundas para a composição da atmosfera terrestre primitiva. O ambiente, antes desprovido de oxigênio, era fortemente redutor. Gradativamente foi tornando-se oxidante, criando condições para o metabolismo aeróbio e, portanto, para o desenvolvimento dos animais.

Neste capítulo, será inicialmente descrita a fotossíntese que se processa em plantas (seções 15.3 a 15.6) e, posteriormente, a fotossíntese bacteriana (seção 15.7). Antes, porém, da análise do próprio processo fotossintético, será apresentada uma breve descrição das estruturas celulares e dos compostos diretamente relacionados com este processo.

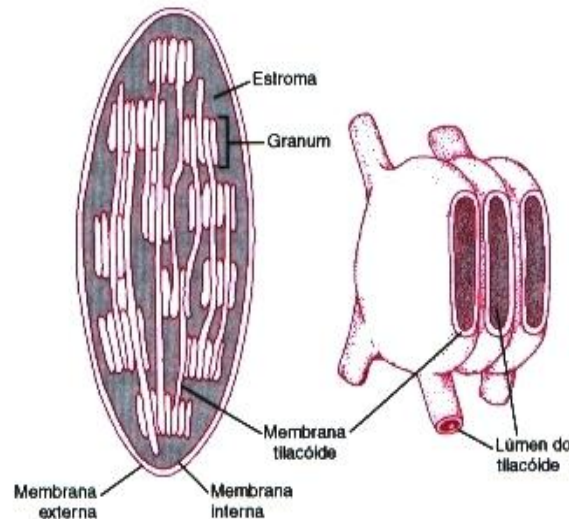


Fig. 15.3 Estrutura simplificada de um cloroplasto. A membrana tilacóide apresenta segmentos lineares e segmentos dobrados; os dobramentos empilham-se, assemelhando-se a vesículas achatadas, formando os grana. A figura mostra, à direita, um grana seccionado para evidenciar o lúmen do tilacóide, o compartimento delimitado pela membrana tilacóide. (Reproduzida com modificações de Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. & Watson, J., *Molecular Biology of the Cell* (page 511). Garland Publishing, Inc., 1983.)

15.2 ABSORÇÃO DE LUZ: FOTOSISTEMAS

A fotossíntese ocorre em organelas especiais

Nas plantas verdes, a fotossíntese processa-se em organelas especializadas: os *cloroplastos* (Fig. 15.3), presentes nas células em número que varia de 1 a 100. Estas organelas são compostas de duas membranas: uma externa, bastante permeável, e uma interna, com permeabilidade seletiva. O conteúdo do cloroplasto, análogo à matriz mitocondrial, é chamado *estroma* e consiste em uma solução concentrada de enzimas, além de DNA, RNA, ribossomos etc. Imersa no estroma encontra-se a *membrana tilacóide*, que delimita um compartimento denominado *tilacóide*, cujo lúmen fica, portanto, isolado do estroma. A membrana tilacóide apresenta múltiplos dobramentos, que se empilham formando os *grana*, e também segmentos não dobrados. Um cloroplasto pode ter de 10 a 100 grana. A membrana tilacóide contém os pigmentos fotossintéticos e as enzimas necessárias para a utilização da luz e produção de ATP e NADPH; no estroma encontram-se as enzimas utilizadas para a redução de CO_2 a carboidrato. Para a energia luminosa ser utilizável pelos organismos fotossintéticos, ela deve inicialmente ser absorvida por pigmentos específicos, que são de três tipos: clorofilas, carotenóides e ficobilinas.

As *clorofilas* (Fig. 15.4) são as moléculas fotorreceptoras mais importantes. São compostos semelhantes às protoporfirinas, apresentando também quatro anéis pirrólicos substituídos, como no grupo heme; nas clorofilas, entretanto, os átomos de nitrogênio dos anéis estão ligados a um íon Mg^{2+} , que ocupa a mesma posição central que o íon Fe^{2+} no heme; um dos anéis (IV) é reduzido e aparece um anel adicional (V), não pirrólico. Uma longa cadeia hidrofóbica do álcool fitol está esterificada à carboxila do substituinte do anel IV. Nos cloroplastos das células vegetais superiores, há dois tipos de clorofila, *a* e *b*, que diferem pelo substituinte do anel II: metil na *clorofila a* e formil na *clorofila b*.

Além das clorofilas, plantas e bactérias contêm carotenóides (pigmentos amarelados), para a absorção de energia luminosa; entre estes, estão os *carotenos*, dos quais o mais importante é o β -caroteno, precursor da vitamina A (Fig. 15.5), e as *xantofilas*, que são carotenos oxigenados. As algas apresentam ainda pigmentos chamados *ficobilinas*, que são cadeias tetrapirrólicas lineares. Os diferentes tipos de pigmentos encontram-se associados a proteínas embebidas na membrana tilacóide.

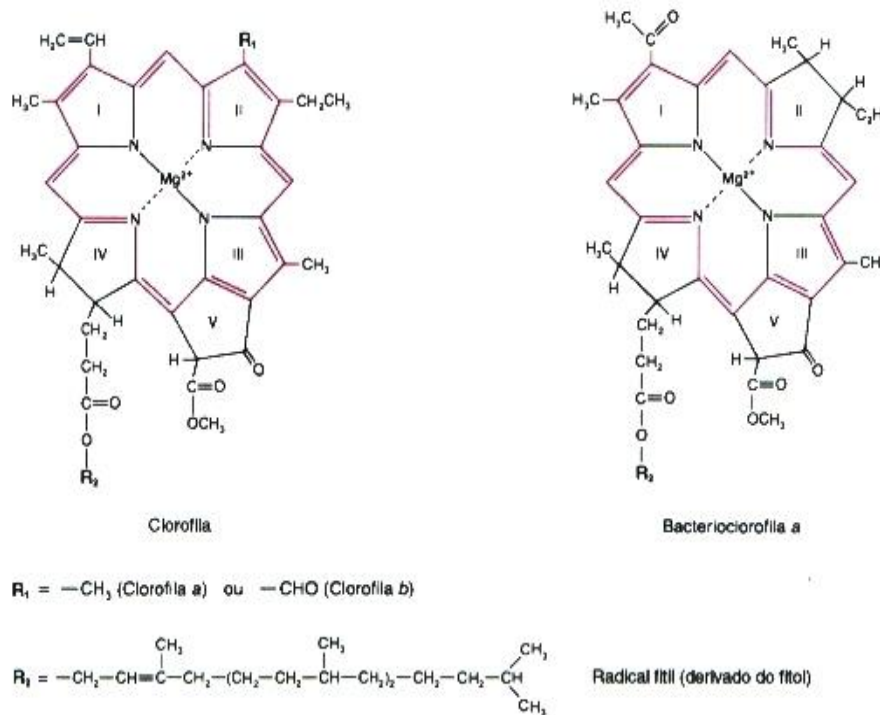


Fig. 15.4 Estruturas da clorofila a e b e da bacterioclorofila a. Os sistemas de ligações conjugadas (ligações simples e duplas alternadas), responsáveis pela absorção de luz, estão assinalados em vermelho.

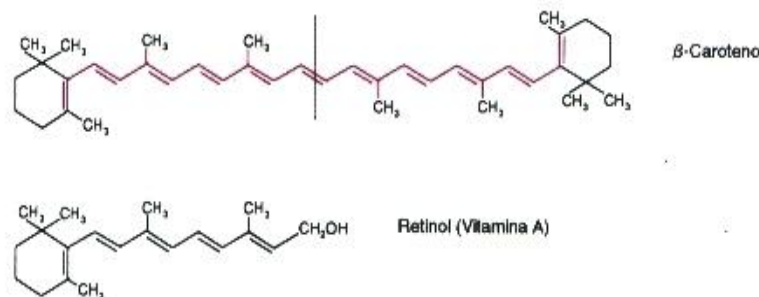


Fig. 15.5 Estrutura do β -caroteno que, como as clorofilas e outros pigmentos fotossintéticos, apresenta alternância de ligações simples e duplas (mostradas em vermelho). Nos mamíferos, é precursor da vitamina A.

A absorção de luz pode resultar em emissão de elétrons

A radiação luminosa tem dois componentes: uma onda eletromagnética e um fluxo de partículas de luz, os *fótons*. A quantidade de energia de cada fóton, o *quantum*, depende do comprimento de onda da radiação luminosa e é expressa pela lei de Planck:

$$E = h \cdot c/\lambda$$

onde h é a constante de Planck ($6,62 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$), c é a velocidade da luz e λ , o comprimento de onda. A razão c/λ é a frequência da radiação (ν). A equação mostra que quanto menor o comprimento de onda, maior a quantidade de energia presente nos fótons. Assim, radiações ultravioleta, com pequeno comprimento de onda ($\lambda < 400 \text{ nm}$) e alta frequência, têm energia suficiente para quebrar ligações covalentes. A maior parte desta fração da energia luminosa é impedida de atingir a superfície terrestre por ser bloqueada pela camada de ozônio. Radiações infravermelhas, com grande comprimento de onda ($\lambda > 750 \text{ nm}$) e baixa frequência, têm

energia apenas para estimular as vibrações moleculares, ou seja, produzir calor. A radiação utilizada pela fotossíntese situa-se no espectro da luz visível, com comprimentos de onda entre 400 e 700 nm.

A propriedade de absorver luz depende do arranjo dos elétrons de uma molécula. As moléculas com um sistema de ligações conjugadas (ligações simples e duplas alternadas, ver Figs. 15.4 e 15.5), como as clorofilas, os carotenóides e as ficobilinas, são capazes de absorver luz visível. Quando ocorre absorção de um fóton, uma molécula passa a um estado excitado, que é instável. A volta ao estado fundamental é extremamente rápida, completando-se em tempos da ordem de 10^{-11} a 10^{-8} segundos. Neste retorno ao estado fundamental, a energia absorvida pode ser dissipada de quatro formas diferentes: (1) sendo convertida a energia cinética, isto é, calor; (2) por emissão de luz, ou seja, fluorescência; (3) a energia de excitação pode passar de uma molécula para outra e, finalmente, (4) o próprio elétron de uma molécula excitada pode passar para uma molécula vizinha. Os dois últimos processos são fundamentais para a fotossíntese.

Os pigmentos receptores de luz estão organizados em fotossistemas

Os pigmentos que absorvem luz fazem parte de complexos proteicos que atravessam a membrana tilacóide, chamados *fotossistemas*, que são as unidades funcionais das reações da fotossíntese que dependem de luz. Cada fotossistema pode conter centenas de moléculas de clorofila (*a* e *b*), carotenóides e ficobilinas, todas capazes de absorver energia luminosa, sendo, por isto, chamadas de *moléculas-antena*. Os carotenóides e as ficobilinas apresentam absorção em regiões do espectro luminoso em que as clorofilas absorvem pouco, fazendo, portanto, expandir a faixa do espectro luminoso efetivamente utilizado para a fotossíntese. Os pigmentos fotorreceptores ficam “dependurados” em subunidades proteicas embebidas na membrana tilacóide, assumindo uma disposição espacial que torna muito eficiente a propagação de energia absorvida. A energia luminosa coletada pelos pigmentos-antena é transmitida, de molécula a molécula, até atingir o *centro de reação* (Fig. 15.6), uma das formas descritas de dissipar a energia absorvida (a de número 3). As transferências são muito rápidas, completando-se o trajeto em tempos da ordem de 10^{-10} s. O centro de reação é constituído por duas moléculas de clorofila *a* chamadas *par especial*, ligadas a uma proteína transmembranar. O que torna estas moléculas especiais é o fato de dissiparem a energia recebida e absorvida emitindo elétrons (outra das formas descritas de dissipação de energia, a de número 4), que são trans-

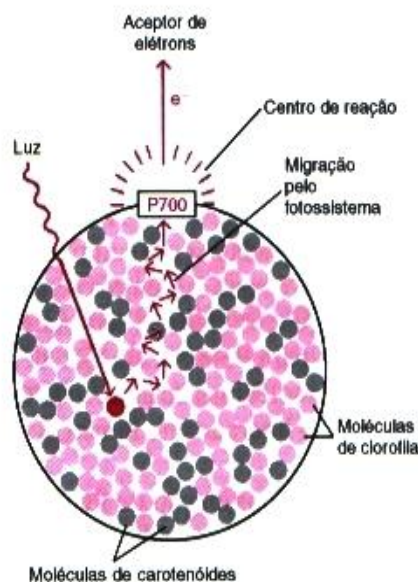


Fig. 15.6 Disposição dos pigmentos fotorreceptores no fotossistema I (os demais componentes do fotossistema foram omitidos). As centenas de moléculas-antena (clorofilas e carotenóides), transferem a energia que absorvem quando iluminadas para o centro de reação, onde se situam as moléculas de clorofila capazes de sofrerem fotoxidação. Processo semelhante ocorre no fotossistema II. (De Albert L. Lehninger, *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York, 1982. Reproduzida com permissão.)

feridos para compostos transportadores de elétrons. A molécula de clorofila *a* capaz de emitir elétrons é quimicamente idêntica às outras, mas adquire esta propriedade especial talvez pelo meio em que se situa ou pelo tipo de proteína à qual está associada.

Estão presentes na membrana tilacóide dois tipos de fotossistemas (*PS* de *photosystem*): fotossistema I (*PSI*) e fotossistema II (*PSII*). Cada um deles, como já assinalado, é um complexo proteico transmembranar contendo o centro de reação, as moléculas-antena e transportadores de elétrons. O centro de reação do fotossistema é designado segundo o comprimento de onda de absorção máxima da clorofila que o constitui: o de *PSI* é designado P700 — P de Pigmento e 700 porque sua absorbância máxima dá-se a comprimento de onda igual a 700 nm — e o de *PSII* é denominado P680 por absorver mais em comprimento de onda igual a 680 nm.

15.3 FOTOSSÍNTESE EM VEGETAIS: FASE CLARA

A fase clara da fotossíntese produz O₂, NADPH e ATP

É costume dividir a fotossíntese vegetal em duas fases: a *fase clara*, em que a luz solar é utilizada para síntese de ATP e NADPH na membrana tilacóide, e a *fase escura*, em que ATP e NADPH produzidos na fase clara são utilizados para a fixação de CO₂, e que ocorre no estroma do cloroplasto. Esta denominação para as etapas da fotossíntese é inadequada, porque mecanismos reguladores determinam que a chamada “fase escura” também seja dependente de luz (ver seção 15.5).

A fase clara inicia-se com a absorção de fótons pelas moléculas-antena e transferência da excitação para moléculas adjacentes, até atingir um centro de reação. O centro de reação, excitado, emite elétrons que são, então, transportados até o NADP⁺. Os elétrons são repostos por H₂O, que se oxida, liberando O₂. As transferências de elétrons são sempre acompanhadas de diminuição de energia livre: parte da energia é conservada como um gradiente de prótons e utilizada para sintetizar ATP, como acontece na mitocôndria.

O transporte de elétrons da água ao NADP⁺ é efetuado por compostos organizados em três complexos proteicos embebidos na membrana tilacóide — *PSI*, *PSII* e *citocromo b₆f* — e por dois transportadores móveis: *plastoquinona*, semelhante à coenzima Q, e *plastocianina*, uma proteína solúvel associada à face interna da membrana tilacóide. Os transportadores solúveis fazem a conexão entre os complexos, exercendo a mesma função da coenzima Q e do citocromo *c* mitocondriais. A organização dos transportadores nos cloroplastos segue, portanto, os mesmos princípios básicos observados na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. A identidade dos transportadores que atuam nos cloroplastos ainda não é totalmente conhecida.

O complexo *PSII* absorve luz através de P680, que passa para uma forma excitada (P680*), com potencial de óxido-redução muito menor, e perde elétrons (Fig. 15.7). A redução de P680 é obtida através de elétrons provenientes da água. A oxidação da água é catalisada por um complexo denominado *OEC* (de *oxygen-evolving complex*), que faz parte de *PSII*. Este complexo consta de centros de íons de manganês ligados a proteína, que são os primeiros aceptores dos elétrons da água; os elétrons são transferidos para um resíduo de tirosina da proteína *D1* associada a P680 e, em seguida, para P680. A atuação de *OEC* é promover a cisão da molécula da água; a retirada de quatro elétrons de duas moléculas de água resulta na redução de P680 e na formação de oxigênio molecular; os prótons resultantes são liberados no lúmen do espaço tilacóide. Por produzir O₂, este tipo de fotossíntese é chamada *oxigênica*.

O resultado líquido da iluminação de *PSII* é a oxidação de P680 e a redução de P700: os elétrons emitidos por P680 são recebidos por uma cadeia de transportadores de elétrons cujoceptor final é justamente P700. O primeiro componente desta cadeia é a feofitina *a*. As *feofitinas* são compostos análogos às clorofilas, mas que têm dois átomos de hidrogênio substituindo o magnésio. Os outros transportadores são as *plastoquinonas A* e *B* (Fig. 15.8). A *plastoquinona B* reduz um conjunto de moléculas de *plastoquinonas* solúveis na bicamada lipídica, denominado *Q_{pool}*. A redução de uma molécula de *plastoquinona*, à semelhança da coenzima Q, requer 2 (H⁺ + e⁻) e envolve, portanto, a retirada de prótons do estroma (ver Fig. 15.9).

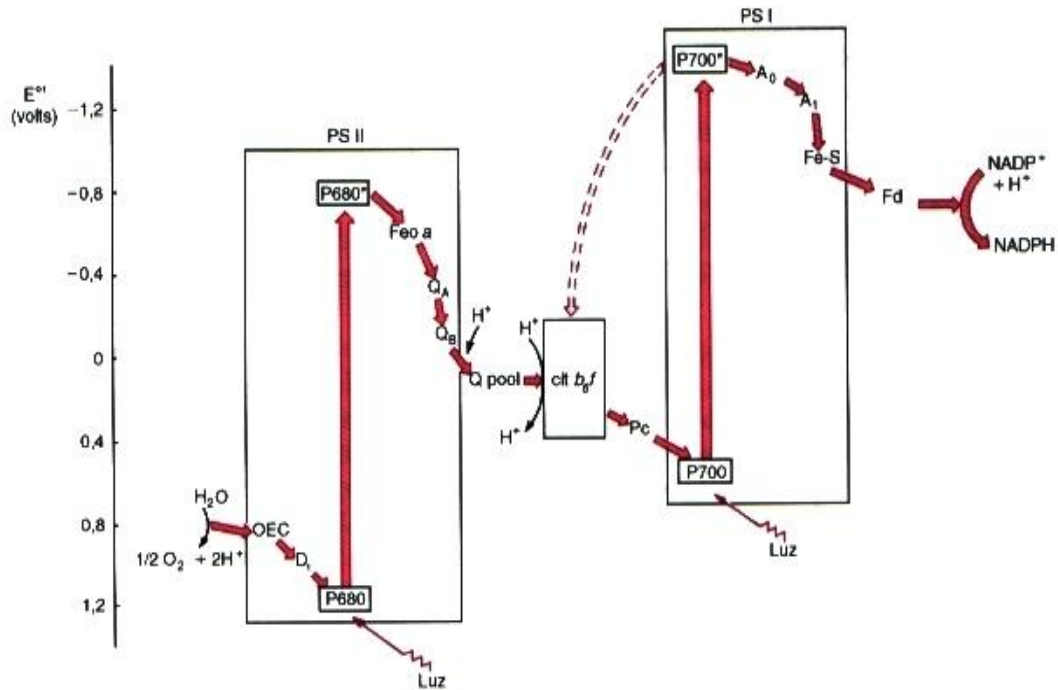


Fig. 15.7 Transferências de elétrons que se processam no sistema fotossintético de plantas. Quando iluminados, os centros de reação de PSII e PSI passam para um estado excitado (indicado por asterisco), com potencial de oxidação-redução padrão muito menor e que se oxida, emitindo elétrons. A reposição de elétrons em PSII é feita por elétrons provenientes da água e, em PSI, por elétrons emitidos por PSII. Na fotofosforilação não-cíclica, oxigênica, os elétrons originários da água reduzem o NADP^+ . Na fotofosforilação cíclica (seta tracejada), os elétrons emitidos por P700^* são transferidos ao complexo citocromo b_6f , retornando, finalmente, a P700 . Notar que as transferências de elétrons são sempre espontâneas (ver escala à esquerda da figura). $\text{Feo } a$ = feofitina a ; Pc = plastocianina; Fd = ferredoxina.

Os elétrons são transferidos do Q_{pool} para o complexo citocromo b_6f , e os prótons são translocados para o interior do espaço tilacóide. O complexo citocromo b_6f contém citocromo b_6 , centro Fe-S e citocromo f , assemelhando-se ao complexo III da mitocôndria; como este, interage com o Q_{pool} através do ciclo Q, bombeando prótons para o lúmen do tilacóide. Esta etapa é a principal responsável pela formação do gradiente de prótons associado ao transporte de elétrons.

Os elétrons do complexo b_6f são doados para o complexo PSI, através da *plastocianina*, uma proteína periférica que contém cobre e que fica adsorvida à face da membrana tilacóide voltada para o lúmen do espaço tilacóide.

Para receber elétrons da plastocianina, o complexo PSI, também sob iluminação, encontra-se oxidado, devido à emissão de elétrons através de P700 . O resultado líquido da excitação luminosa dos dois fotossistemas é, portanto, a oxidação de P700 , cujo débito de elétrons é repostado (via plastocianina), à custa de P680 , que, ao perder elétrons, se transforma em forte oxidante.

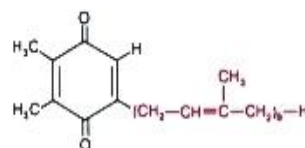
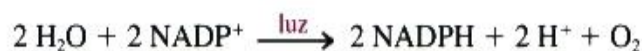


Fig. 15.8 Estrutura da plastoquinona A, a plastoquinona mais abundante nos cloroplastos. As outras plastoquinonas diferem desta pelo número de unidades isoprênicas da cadeia lateral (em vermelho). A plastoquinona é semelhante à ubiquinona (coenzima Q), encontrada na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria.

Os elétrons emitidos por P700 são captados por uma cadeia de transporte de elétrons, associada a PSI. O primeiro elemento desta cadeia é uma clorofila do tipo *a* (A_0); desta os elétrons são transferidos para uma *filoquinona* (A_1), e para três proteínas ferro-enxofre. De PSI, os elétrons chegam à *ferredoxina*, uma proteína Fe-S solúvel presente no estroma, e, através da *ferredoxina-NADP⁺ oxido-redutase*, que contém FAD, são transferidos para o NADP^+ , o aceptor final de elétrons, que reage com prótons do estroma, originando NADPH.

Resumindo, a resposta de PSI ao estímulo luminoso é a geração de um potente redutor, capaz de levar à formação de NADPH, e a resposta de PSII ao mesmo estímulo é gerar um potente oxidante capaz de clivar a água. Considerando o funcionamento acoplado dos dois fotossistemas, podemos escrever a equação geral de oxido-redução da fotossíntese:



Deve-se notar que esta reação é exatamente oposta à que se processa na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, apenas com a substituição da coenzima NAD^+ por NADP^+ . A oxidação da coenzima na mitocôndria libera energia, que é aproveitada para a síntese de ATP. A redução da coenzima na fotossíntese consome energia, provida pela luz; a energia é armazenada sob a forma de NADPH e também de ATP, como será visto a seguir.

O transporte de elétrons gera um gradiente de prótons, utilizado para a síntese de ATP

O transporte de elétrons e a síntese de ATP em cloroplastos apresentam grande semelhança com os mesmos processos ocorrendo em mitocôndrias, e o seu acoplamento é também explicado pela teoria quimiosmótica.

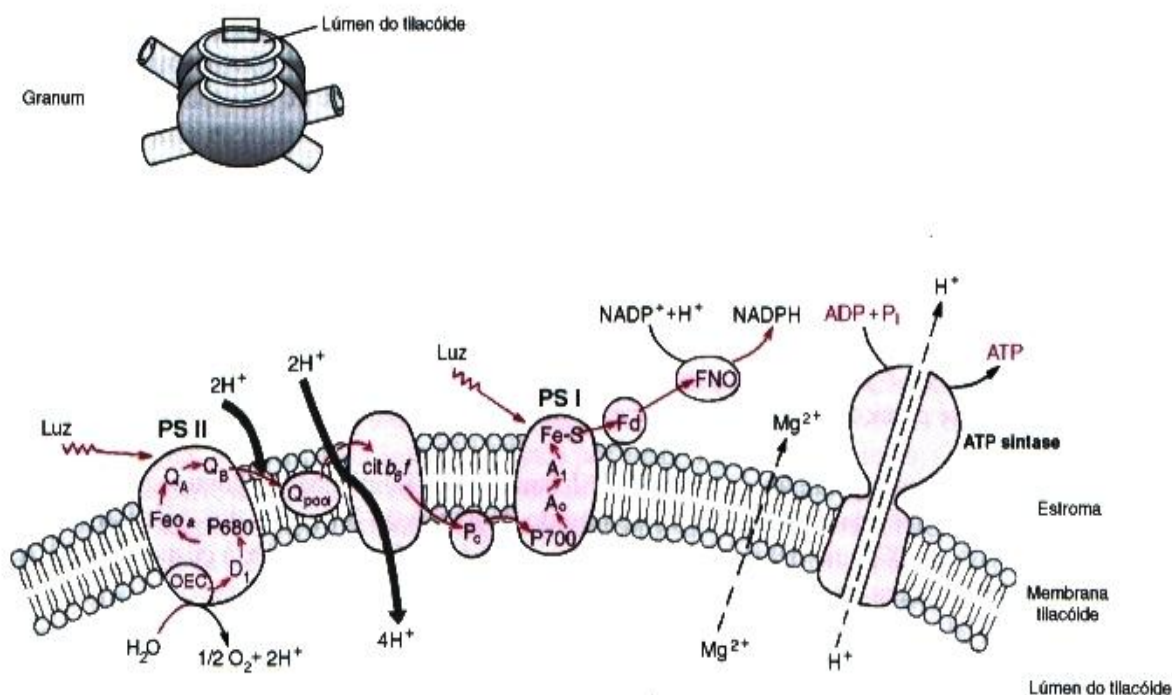


Fig. 15.9 Esquema de um segmento da membrana tilacóide (delimitado pelo retângulo no granum à esquerda da figura), mostrando a disposição dos componentes que participam do transporte de elétrons desde a água até NADP^+ , acoplado à fotofosforilação. Os complexos proteicos — PSII, PSI e citocromo b_6/f — são interligados por transportadores solúveis: plastocianina e ferredoxina. Ao longo do transporte de elétrons (setas vermelhas), prótons são translocados do estroma para o interior da vesícula tilacóide (setas cinzas). Os prótons retornam para o estroma através da ATP sintase. Paralelamente à movimentação de prótons para o tilacóide, há a difusão de íons Mg^{2+} para o estroma. FNO = ferredoxina- NADP^+ oxido-redutase. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J., *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

A conexão entre a água e o NADP^+ , incluindo os dois fotossistemas, é feita por uma seqüência de transportadores de elétrons com potenciais de óxido-redução crescentes (Fig. 15.7). Estes transportadores estão mergulhados na membrana tilacóide, formando complexos orientados de forma assimétrica com relação ao exterior/interior do tilacóide (Fig. 15.9). O transporte de elétrons, como na mitocôndria, acontece em uma membrana impermeável a prótons, que delimita uma vesícula, estrutura essencial para que se estabeleça o gradiente de prótons. O sentido do transporte dos prótons, entretanto, é oposto ao da mitocôndria: nos cloroplastos, os prótons são bombeados do estroma para o interior da vesícula tilacóide. Quando os elétrons são transferidos de um composto para outro, a energia de óxido-redução é utilizada para gerar um gradiente de pH através da membrana tilacóide.

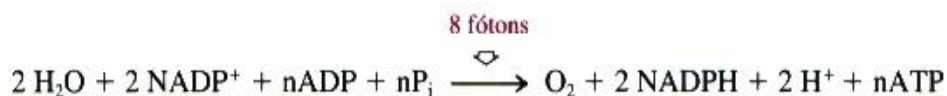
As etapas que contribuem para gerar o gradiente de prótons, como já salientado, são: a cisão da molécula de água, que libera prótons no lúmen do tilacóide; a redução do Q_{pool} , que retira H^+ do estroma; o bombeamento de prótons do estroma para o interior do tilacóide pelo citocromo b_6f através do ciclo Q (quantitativamente, a etapa mais importante) e a redução de NADP^+ pela ferredoxina- NADP^+ óxido-redutase, que consome H^+ do estroma (Fig. 15.9). A translocação de prótons para o interior do tilacóide é acompanhada pela saída de íons Mg^{2+} , aos quais a membrana tilacóide é permeável, o que resulta em um equilíbrio de cargas dos dois lados da membrana e a ausência de um potencial elétrico. Assim, nos cloroplastos, forma-se apenas um gradiente de prótons, mas que equivale a uma força próton-motriz suficiente para sintetizar ATP.

O mecanismo de síntese de ATP em cloroplastos é igual ao da mitocôndria: os prótons devem fluir do interior do tilacóide para o estroma e isto só é possível pela ATP sintase (Fig. 15.9), uma isoenzima daquela existente na mitocôndria. O processo de síntese de ATP no estroma é chamado *fotofosforilação*. Também nos cloroplastos, agentes que transferem prótons através de membranas, como o 2,4 dinitrofenol, desacoplam o transporte de elétrons da síntese de ATP. O que ainda não se conhece é o número de moléculas de ATP sintetizadas por fóton absorvido e por elétron transportado da água ao NADP^+ .

Em resumo, no processo de fotoativação dos dois fotossistemas, há produção de oxigênio, indispensável para a sobrevivência dos organismos aeróbios, e parte da energia luminosa é transformada em energia química, armazenada sob a forma de ATP e de NADPH:



Para a redução de NADP^+ são necessários dois elétrons e, portanto, quatro fótons, já que, para cada elétron que chega à coenzima, são necessárias uma emissão de elétron por PSI e uma por PSII. Como a equação anterior mostra a produção de 2 NADPH, ela pode ser transformada em



A síntese de ATP pode resultar da fotoexcitação apenas de PSI

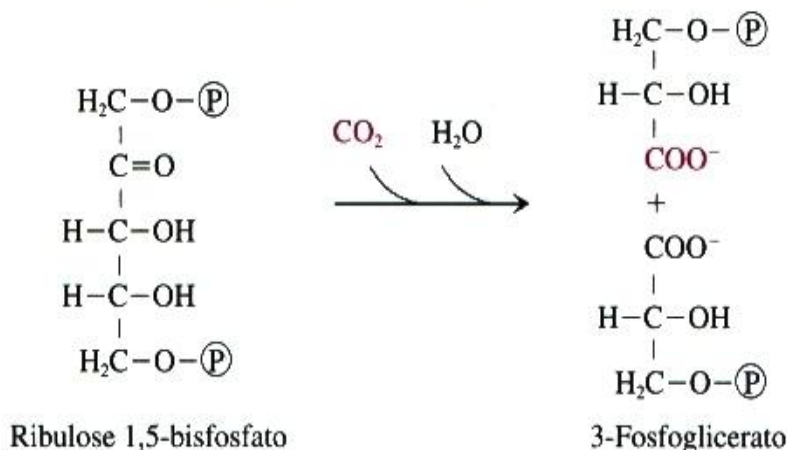
Os elétrons da água só são utilizados para a redução de NADP^+ quando os dois fotossistemas funcionam acoplados. O fotossistema I pode, entretanto, funcionar de modo independente, de tal maneira que os elétrons por ele emitidos a ele retornam, em um processo cíclico (Fig. 15.7). Quando a concentração de NADP^+ se torna limitante e escasseia, portanto, o aceptor final de elétrons de PSI, ocorre um desvio no transporte de elétrons. Os elétrons de P700^* , em vez de reduzirem ferredoxina, são transferidos para o complexo citocromo b_6f e, através da plastocianina, são devolvidos a PSI, completando o ciclo. Neste tipo de transferência de elétrons, evidentemente, não há produção de NADPH ou liberação de O_2 , mas, sim, síntese de ATP, sustentada pelo bombeamento de prótons através do citocromo b_6f . O processo é chamado *fotofosforilação cíclica*, constituindo um tipo de fotossíntese *não-oxigênica*. A fotofosforilação cíclica talvez possa ocorrer com pequena intensidade, mesmo quando o NADP^+ não é limitante. Os mecanismos de regulação que determinam a preponderância de um dos dois tipos de fotofosforilação não são conhecidos.

15.4 SÍNTESE DE GLICOSE A PARTIR DE CO₂ (A FASE “ESCURA” DA FOTOSSÍNTESE)

A fixação de CO₂ é feita por carboxilação de ribulose 1,5-bisfosfato

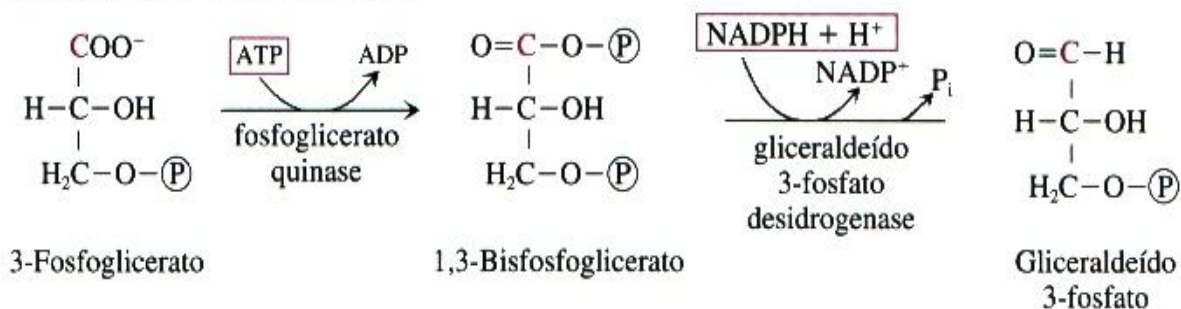
Na fase escura da fotossíntese, como já foi assinalado, ATP e NADPH sintetizados na fase clara são utilizados para a redução de CO₂ a glicose. O conjunto de reações enzimáticas responsáveis por esta síntese é chamado *ciclo de Calvin*.

A fixação de CO₂ é feita por sua reação com ribulose 1,5-bisfosfato (formada por fosforilação de ribulose 5-fosfato à custa de ATP) e produz duas moléculas de 3-fosfoglicerato:



Esta reação é catalisada pela *ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase*, também chamada *rubisco*, ausente de tecidos animais e, certamente, a enzima mais abundante da biosfera. O nome da enzima indica duas atividades: a de carboxilase, explicitada pela reação acima, e a de oxigenase, cujo significado será descrito mais adiante. A etapa fundamental de incorporação de CO₂ em uma molécula orgânica está, portanto, cumprida por esta reação.

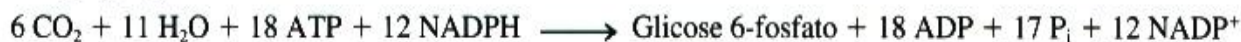
O 3-fosfoglicerato é fosforilado por ATP, produzindo 1,3-bisfosfoglicerato. Este composto é reduzido a gliceraldeído 3-fosfato através de uma *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* específica para NADPH. Uma seqüência de reações semelhante a esta é encontrada na via glicolítica, porém ocorrendo em sentido inverso e utilizando NAD⁺ como coenzima.



Deste modo, a partir de ribulose 1,5-bisfosfato, são produzidas duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, uma das quais contém o átomo de carbono presente no CO₂ incorporado pela fotossíntese.

Através de uma seqüência de reações da qual participam enzimas da glicólise, da gliconeogênese, da via das pentoses-fosfato e enzimas características de cloroplastos (sedoepulose 1,7-bisfosfato e ribulose 5-fosfato quinase), a ribulose 1,5-bisfosfato pode ser regenerada. Iniciando o ciclo com 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato, é possível verificar a produção líquida de uma molécula de glicose 6-fosfato e a regeneração das 6 moléculas iniciais de ribulose 1,5-bisfosfato (Fig. 15.10). Neste ciclo há consumo de 18 ATP e 12 NADPH, que corresponde ao dispêndio energético para a síntese de uma molécula de glicose.

A equação geral do ciclo de Calvin é:



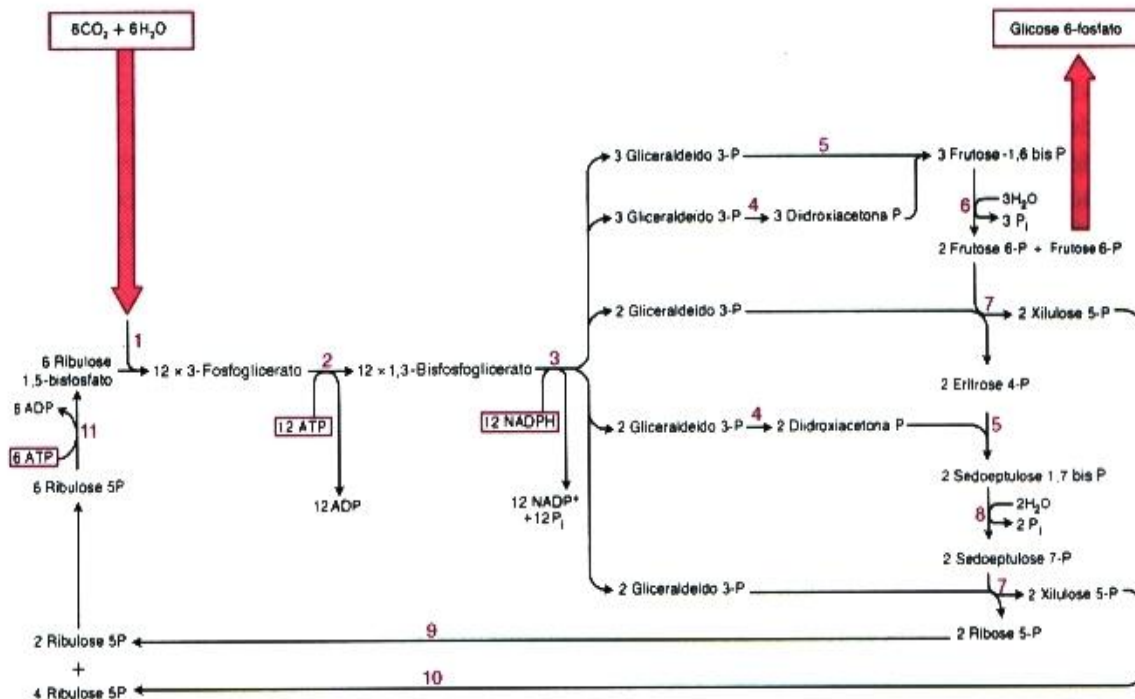


Fig. 15.10 Ciclo de Calvin. O esquema mostra a síntese de uma molécula de glicose 6-fosfato a partir de 6 moléculas de CO_2 e 6 moléculas de H_2O . O esquema inicia-se com 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato que são regeneradas no fim do ciclo. Os números nas setas referem-se às enzimas: rubisco (1), fosfoglicerato quinase (2), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (3), triose fosfato isomerase (4), aldolase (5), frutose 1,6-bisfosfatase (6), transcetolase (7), sedoheptulose 1,7-bisfosfatase (8), ribose fosfato isomerase (9), fosfopento epimerase (10) e ribulose 5-fosfato quinase (11).

Deve-se notar uma vez mais que, como a produção de ATP e NADPH é feita pela utilização da energia luminosa, é esta a fonte energética primária para a síntese de glicose. Quando, à noite, esta fonte primária não está disponível, os organismos que fazem fotossíntese têm que recorrer aos processos de obtenção de ATP usados pelos seres heterotróficos, isto é, a oxidação de compostos orgânicos pelas vias conhecidas de degradação: glicólise, ciclo de Krebs etc. e fosforilação oxidativa.

Para a síntese dos polímeros de glicose característicos de vegetais — sacarose, amido e celulose —, a glicose 6-fosfato sintetizada na fotossíntese deve ser previamente isomerizada a glicose 1-fosfato e convertida a ADP-glicose (p. 169). O processo assemelha-se, neste aspecto, à síntese de glicogênio dos animais, que utiliza UDP-glicose como precursor (p. 166).

15.5 REGULAÇÃO DO CICLO DE CALVIN

Apesar das duas etapas da fotossíntese serem chamadas de fase clara e escura, o ciclo de Calvin só ocorre em presença de luz. Esta dependência é consequência da regulação de enzimas, cuja ativação só é acionada quando ocorre o transporte de elétrons induzido por absorção de energia luminosa.

A atividade da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase depende de maneira muito sensível do pH e da concentração de Mg^{2+} , aumentando à medida que estas variáveis aumentam. A ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase está presente no estroma, e é deste compartimento que os prótons são bombeados para o interior da vesícula tilacóide, como resultado do transporte de elétrons; concomitantemente, como foi mencionado, há transferência de íons Mg^{2+} para o estroma. Esta elevação do pH e da concentração de Mg^{2+} ativa a enzima, resultando em eficiente fixação de CO_2 . A regulação da rubisco, que é ainda muito mais complexa, será retomada na próxima seção.

Um outro mecanismo, que também opera somente na vigência de luz, estimula o ciclo de Calvin. Três enzimas deste ciclo — frutose 1,6-bisfosfatase, sedoheptulose 1,7-bisfosfatase e ribulose 5-fosfato quinase — são

funcionais apenas quando têm grupos SH preservados, inativando-se quando estes grupos, oxidados, fazem ligações dissulfeto (R-S-S-R). A redução das pontes dissulfeto é obtida a partir de elétrons emitidos por PSI, através de reações intermediárias. Quando há luz abundante, aumenta a concentração de ferredoxina reduzida, por transferência de elétrons provenientes de PSI. A ferredoxina reduzida, por sua vez, reduz as pontes dissulfeto de uma proteína denominada *tiorredoxina*, através de reação catalisada pela *ferredoxina-tiorredoxina redutase* (Fig. 15.11). O encadeamento das reações de redução de pontes dissulfeto mantém os grupos SH das enzimas citadas nesta forma reduzida, ativando o ciclo de Calvin, que, portanto, é inadequadamente chamado de fase “escura”.

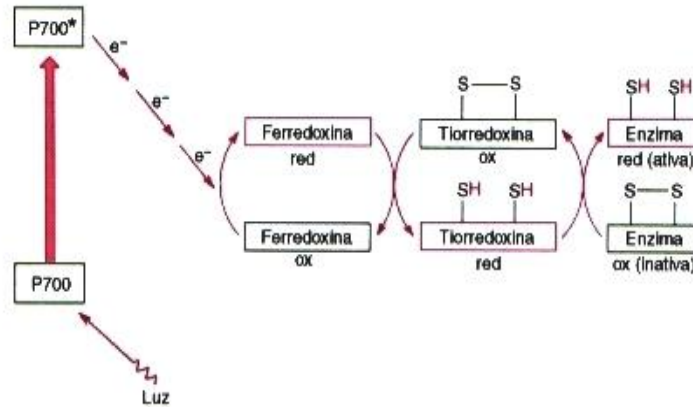
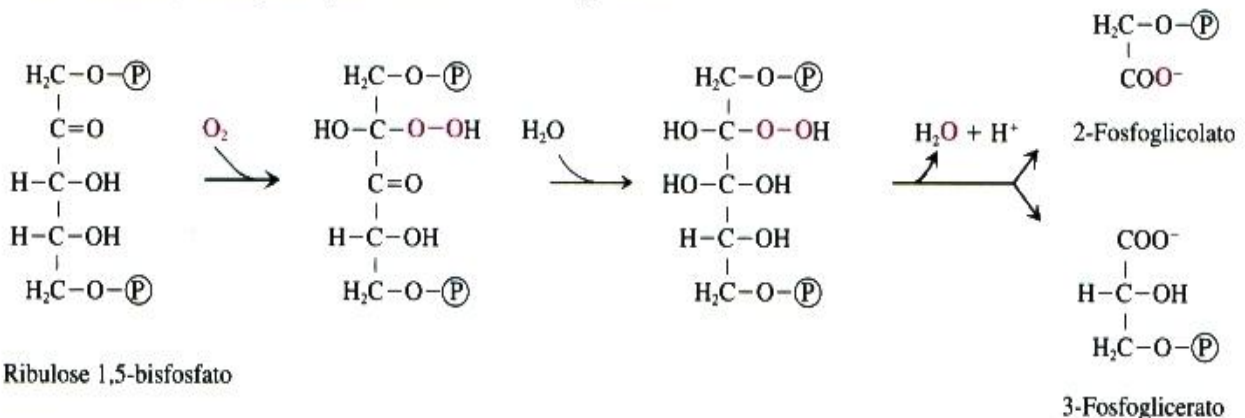


Fig. 15.11 Reações que levam à redução de pontes dissulfeto de enzimas do ciclo de Calvin, à custa de elétrons originados de PSI sob iluminação.

15.6 FOTORRESPIRAÇÃO E PLANTAS C₄

A fotorrespiração contrapõe-se à fotossíntese

A ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, como o seu nome indica, tem, além da atividade de carboxilase, atividade de oxigenase. O predomínio de uma destas atividades, em um dado momento, dependerá das concentrações relativas entre CO₂ e O₂ vigentes, já que estas moléculas competem como segundos substratos pela enzima (o primeiro substrato é, naturalmente, a ribulose 1,5-bisfosfato). Quando o O₂ é usado como substrato, as reações que ocorrem são as seguintes:



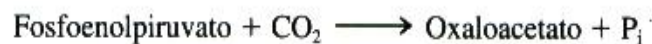
Por estas reações, portanto, a ribulose 1,5-bisfosfato é *oxidada* a 3-fosfoglicerato e 2-fosfoglicolato no cloroplasto. O 3-fosfoglicolato passa por uma complexa série de reações, processadas no cloroplasto, no peroxissomo e na mitocôndria, que envolvem consumo adicional de O₂ e produção de CO₂, razão pela qual a via é denominada *fotorrespiração*. Todavia, o que é importante ressaltar desta via, além do fato de um de seus carbonos ser oxidado a CO₂ por O₂, é haver gasto de ATP e NADPH. O resultado da fotorrespiração é, portanto, o gasto de ATP e NADPH produzidos pela fotossíntese.

O significado biológico da fotorrespiração é muito pouco claro. Para a maioria dos vegetais, nas concentrações habituais de CO_2 atmosférico, a fotossíntese predomina sobre a fotorrespiração. Entretanto, quando a luminosidade é alta e a temperatura, elevada, a intensa fotossíntese faz diminuir a concentração de CO_2 nos cloroplastos e aumentar a de O_2 , que passa a ser utilizado preferencialmente como substrato pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxidase. Ainda mais, a atividade de oxigenase desta enzima aumenta mais com a temperatura do que a atividade de carboxilase, fazendo com que a intensidade da fotorrespiração aproxime-se da atividade da fotossíntese. Este resultado é um fator limitante para o crescimento de muitas plantas. Atualmente estão em curso numerosas tentativas de resolver este problema de agricultura, através da modificação da atividade de oxigenase da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase por engenharia genética. Plantas de regiões tropicais desenvolveram mecanismos engenhosos, descritos a seguir, que possibilitam um crescimento adequado mesmo com concentrações baixas de CO_2 em suas folhas.

As plantas tropicais concentram CO_2 formando oxaloacetato

Os vegetais que fixam CO_2 através da reação catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase são chamados C_3 , porque o primeiro produto da incorporação é o 3-fosfoglicerato, um composto de três carbonos. Algumas plantas tropicais, como cana-de-açúcar e milho, apresentam uma modificação do esquema de fixação, incorporando o CO_2 em um composto de quatro carbonos, o oxaloacetato; são, por isto, chamadas *plantas C_4* . Esta incorporação é uma forma de armazenar e de fornecer, posteriormente, CO_2 em altas concentrações para todo o processo descrito para as *plantas C_3* . A própria anatomia das folhas das plantas C_4 contribui para que a incorporação de CO_2 em compostos de 4 carbonos constitua uma etapa precedente ao ciclo de Calvin. As *células do mesófilo* localizam-se próximas à superfície da folha, ficando, portanto, em contato com o ar atmosférico e são desprovidas de rubisco; envolvem completamente as *células da bainha*, que se situam no interior da folha, circundando estruturas vasculares, e que contêm rubisco e todas as enzimas do ciclo de Calvin, além de numerosos cloroplastos. Há, então, uma especialização de funções: as células do mesófilo retêm o CO_2 (como oxaloacetato), que é fornecido para as células da bainha, as únicas capazes de incorporá-lo em glicose. Desta forma, pelas altas concentrações de CO_2 que conseguem manter nos cloroplastos, estas plantas podem evitar a fotorrespiração.

Nas células do *mesófilo*, o CO_2 é incorporado através da ação da *fosfoenolpiruvato carboxilase*, uma enzima ausente de tecidos animais:



O oxaloacetato é reduzido a malato por uma malato desidrogenase dependente de NADPH, e o malato é transferido para as células da bainha (Fig. 15.12). Nestas células, o malato é descarboxilado pela enzima málica, produzindo CO_2 , NADPH e piruvato. O CO_2 liberado é, então, utilizado para a reação de fixação catalisada

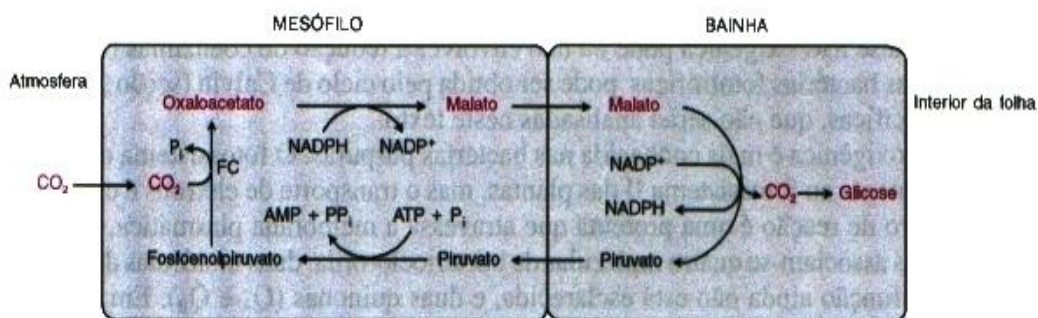


Fig. 15.12 Etapas que precedem a fixação de CO_2 pelas plantas C_4 . A incorporação de CO_2 em oxaloacetato (C_4) é catalisada pela fosfoenolpiruvato carboxilase (FC), que ocorre nas células do mesófilo. A síntese do intermediário de 4 carbonos é facilitada pela localização superficial das células do mesófilo, permitindo o pronto acesso ao gás atmosférico, pelo fato de serem desprovidas de rubisco e pela alta afinidade da fosfoenolpiruvato carboxilase por CO_2 . Nas células da bainha, o CO_2 é substrato da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase e origina glicose, como nas plantas C_3 .

pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase. O piruvato retorna às células do mesófilo, onde regenera fosfoenolpiruvato, através de uma reação especial, catalisada pela *piruvato-fosfato diquinase*:



Para as plantas tropicais, este esquema de fixação contorna uma dificuldade: o fechamento dos *estômatos* para reduzir a perda de água diminui também o fornecimento de CO_2 para o ciclo de Calvin. Como a fosfoenolpiruvato carboxilase tem uma afinidade por CO_2 muito maior do que a ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase, sua ação providencia uma concentração de CO_2 adequada nas células da bainha. Este conjunto de adaptações metabólicas e anatômicas propicia intensa fixação de CO_2 em glicose nestas células, cujos cloroplastos são muito ricos em grãos de amido.

15.7 FOTOSÍNTESE EM BACTÉRIAS

A fotossíntese bacteriana produz ATP e pode ou não produzir coenzimas reduzidas e O_2

O mecanismo da fotossíntese nas bactérias varia de acordo com a espécie estudada. As características a serem descritas referem-se a alguns grupos importantes destes organismos e pretendem assinalar as discrepâncias e similaridades fundamentais entre o processo bacteriano e o das plantas superiores.

Nas bactérias, o aparelho fotossintetizador pode estar imerso na própria membrana plasmática ou em estruturas membranosas de diferentes morfologias, sendo muito frequentes vesículas, chamadas *cromatóforos*, resultantes de invaginações da membrana plasmática.

A fotossíntese de qualquer bactéria fototrófica envolve *sempre* a fotofosforilação, ou seja, a síntese de ATP à custa de energia luminosa: elétrons de alta energia emitidos por pigmentos sob iluminação são transportados por uma cadeia de compostos organizados em uma membrana, em ordem crescente de potencial de óxido-redução; parte da energia liberada gera um gradiente de prótons, que é utilizado para sintetizar ATP. Outros aspectos do processo podem diferir bastante, como será exemplificado pela comparação entre três grupos de bactérias: cianobactérias, bactérias verdes e bactérias púrpuras.

Nas cianobactérias (*Oscillatoria*, *Anabaena* etc.), a fotossíntese é do tipo oxigênico, empregando dois fotossistemas, cujos centros de reação são constituídos por clorofila *a*. A redução de NADP^+ a NADPH é um evento associado à fotossíntese; os elétrons são obtidos por fotólise da água, resultando na produção de O_2 . Em resumo, a fotossíntese das cianobactérias assemelha-se à das algas e plantas superiores em múltiplos aspectos.

Nas bactérias verdes (*Chlorobium*, *Chloroflexus* etc.) e nas bactérias púrpuras (*Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* etc.), a fotossíntese é não-oxigênica, utilizando como doadores de elétrons H_2S , H_2 ou compostos orgânicos presentes no meio. Há somente um fotossistema e o pigmento fotorreceptor é uma bacterioclorofila. As *bacterioclorofilas* (Fig. 15.4) exibem diferenças estruturais discretas em relação às clorofilas, mas que resultam em deslocamento da absorção máxima para comprimentos de onda mais longos (até 1.040 nm). A fotossíntese não-oxigênica pode ou não envolver a redução de coenzimas (ver adiante).

A fixação de CO_2 nas bactérias fototróficas pode ser obtida pelo ciclo de Calvin (seção 15.4) ou através de vias metabólicas específicas, que não serão analisadas neste texto.

A fotossíntese não-oxigênica é mais conhecida nas bactérias púrpuras. O fotossistema destas bactérias assemelha-se estruturalmente ao fotossistema II das plantas, mas o transporte de elétrons é cíclico, como acontece com PSI. O centro de reação é uma proteína que atravessa a membrana plasmática, composta por três polipeptídios, aos quais associam-se quatro moléculas de bacterioclorofila, duas moléculas de bacteriofeofitina, um íon de ferro, cuja função ainda não está esclarecida, e duas quinonas (Q_A e Q_B). Em algumas espécies, encontra-se um citocromo do tipo *c* com quatro grupos heme associado ao fotossistema. Duas das quatro moléculas de bacterioclorofila formam o "par especial", responsável pela dissipação da energia luminosa absorvida através da emissão de elétrons. Em alguns casos, a absorção máxima dá-se a 870 nm e, por isto, o centro de reação é referido como P870. Os elétrons são transferidos para as feofitinas, passando destas para Q_A e, depois, para Q_B (Fig. 15.13). Os elétrons deixam P870, sendo transferidos para um Q_{pool} e, em seguida,

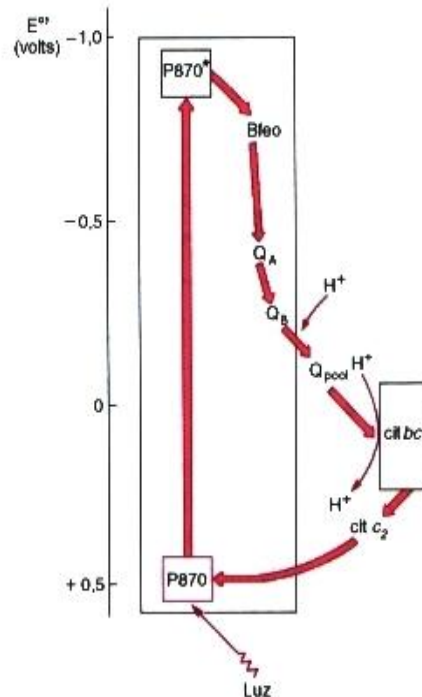


Fig. 15.13 Fluxo cíclico de elétrons durante a fotossíntese não-oxigênica de bactérias púrpuras. Bfeo = bacteriofeofitina.

para o complexo bc_1 , semelhante ao complexo citocromo b_6f dos cloroplastos e ao Complexo III mitocondrial. A passagem de elétrons das quinonas para o complexo bc_1 é acompanhada de movimentação de prótons do citoplasma para o espaço periplasmático. O complexo bc_1 entrega elétrons ao citocromo c_2 , uma proteína periférica semelhante ao citocromo c mitocondrial. Do citocromo c_2 , os elétrons retornam ao P870, que pode, assim, recomeçar o transporte cíclico de elétrons.

Ao longo da trajetória dos elétrons, forma-se um gradiente de prótons, pela extrusão de prótons do interior da célula para o espaço periplasmático. Na volta destes prótons para o citossol, pela ATP sintase, produz-se ATP. O processo é, portanto, uma fotofosforilação cíclica e, como na fotofosforilação cíclica dos vegetais, não há fotólise da água, nem produção de coenzimas reduzidas.

As bactérias verdes (p. 180), têm um único fotossistema que absorve luz, passa para uma forma excitada e perde elétrons. Os elétrons são transferidos para ferredoxina e, em seguida, para uma redutase, que converte $NADP^+$ a NADPH. Os elétrons são repostos por redutores do meio (H_2S , H_2 , NO_2^- , álcoois, ácidos), tornando a bactéria dependente da disponibilidade daqueles compostos para sua sobrevivência.

16

METABOLISMO DE LIPÍDIOS

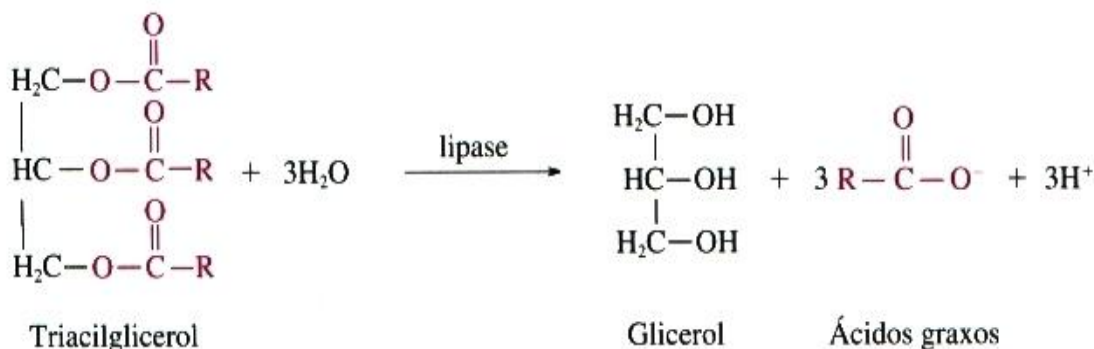
Os lipídios da dieta, absorvidos no intestino, e aqueles sintetizados endogenamente são distribuídos aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas, para utilização ou armazenamento. Os triacilgliceróis são os lipídios mais abundantes da dieta e constituem a forma de armazenamento de todo o excesso de nutrientes, quer este excesso seja ingerido sob a forma de carboidratos, proteínas ou dos próprios lipídios. Representam a maior reserva energética do organismo, perfazendo, em média, 20% do peso corpóreo, o que equivale a uma massa 100 vezes maior do que a do glicogênio hepático; como são compostos mais reduzidos que os carboidratos, sua oxidação apresenta rendimento maior. Os triacilgliceróis são armazenados nas células adiposas, sob forma anidra, e podem ocupar a maior parte do volume celular.

A vantagem de armazenar lipídios, em vez de carboidratos, fica evidente quando se comparam as massas dos dois compostos, que seriam capazes de fornecer a mesma quantidade de energia. Em um homem adulto, pesando 70 kg, a reserva de triacilgliceróis compreende cerca de 15 kg. Como a oxidação de carboidratos produz, aproximadamente, 2,5 vezes menos energia que a oxidação de lipídios e 1 g de glicogênio adsorve 3 g de água, uma reserva constituída por glicogênio, com a mesma quantidade de energia contida em 15 kg de triacilgliceróis, pesaria em torno de 150 kg. Ou seja, para dispor da mesma quantidade de energia, o indivíduo teria um peso extra de 135 kg!

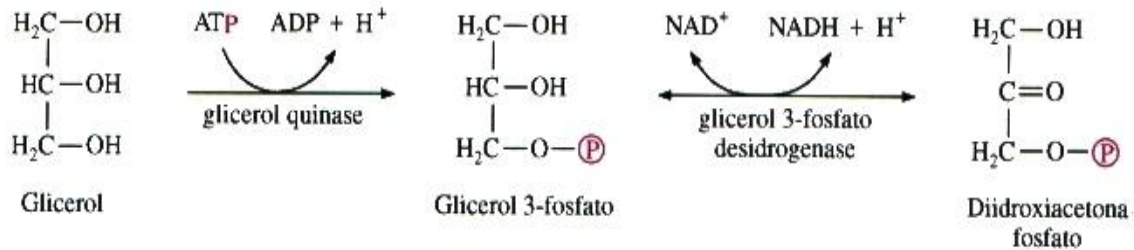
A utilização do depósito de triacilgliceróis pelo organismo e a sua reconstrução processam-se através de vias metabólicas diferentes, localizadas em compartimentos celulares diferentes e, obviamente, submetidas a regulações antagônicas (Capítulo 20).

16.1 DEGRADAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS

A mobilização do depósito de triacilgliceróis é obtida por ação da *lipase* dos adipócitos, uma enzima sujeita a regulação hormonal (p. 288), que hidrolisa os triacilgliceróis a ácidos graxos e glicerol. Estes produtos são oxidados por vias diferentes.



O *glicerol* não pode ser reaproveitado pelos adipócitos, que não têm *glicerol quinase*, sendo então liberado na circulação. No fígado e outros tecidos, por ação desta quinase, é convertido a *glicerol 3-fosfato* e transformado em diidroxiacetona fosfato, um intermediário da glicólise ou da gliconeogênese.



Os *ácidos graxos* liberados dos adipócitos são transportados pelo sangue ligados à albumina e utilizados pelos tecidos, incluindo fígado e músculos, como fonte de energia; o tecido nervoso e as hemácias são exceções, porque obtêm energia exclusivamente a partir da oxidação de glicose.

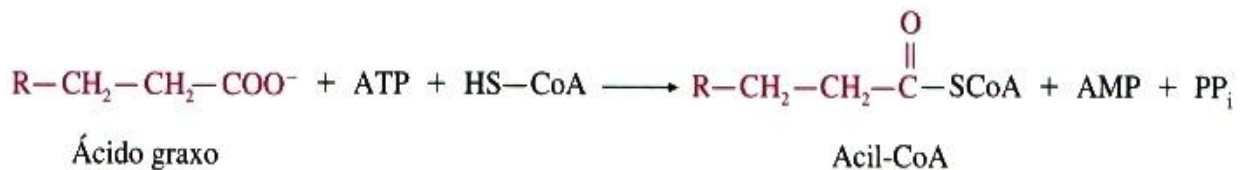
Os triacilgliceróis da dieta, transportados pelos quilomícrons, são hidrolisados pela *lipase lipoproteica*, uma enzima extracelular, que fica ancorada no endotélio dos capilares dos tecidos extra-hepáticos. Os produtos finais da hidrólise, como no caso da lipase dos adipócitos, são glicerol e ácidos graxos, que se tornam, assim, disponíveis para as células. Os remanescentes dos quilomícrons, depletados de triacilgliceróis e proporcionalmente enriquecidos de colesterol, são retirados da circulação pelo fígado, por endocitose. O metabolismo do colesterol será analisado na seção 16.8.

Os ácidos graxos, mobilizados do tecido adiposo ou provenientes da dieta, são degradados, como se verá a seguir, através de uma via especial que se processa no interior das mitocôndrias.

16.2 DEGRADAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS: ATIVAÇÃO, TRANSPORTE E OXIDAÇÃO

Para sua oxidação, os ácidos graxos são ativados e transportados para a matriz mitocondrial

Para serem oxidados, os ácidos graxos, como acontece com a glicose, são primeiramente convertidos em uma forma ativada, neste caso, uma acil-CoA. Esta etapa prévia é catalisada por *acil-CoA sintetases*, associadas à membrana externa da mitocôndria:



Nesta reação, forma-se uma ligação tioéster entre o grupo carboxila do ácido graxo e o grupo SH da coenzima A, produzindo uma acil-CoA. As acil-CoA, como a acetil-CoA, são compostos ricos em energia. Sua ligação tioéster é formada à custa da energia derivada da quebra de uma ligação anidrido fosfórico — clivagem do ATP em adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato inorgânico (PP_i). O pirofosfato é hidrolisado a 2 P_i, numa reação irreversível, o que torna o processo de ativação do ácido graxo a acil-CoA também irreversível.

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a acil-CoA, e somente os radicais acila são introduzidos na mitocôndria, ligados à *carnitina*. Este composto, sintetizado a partir de aminoácidos, é amplamente distribuído nos tecidos animais e vegetais, sendo especialmente abundante em músculos. O sistema utilizado para o transporte de radicais acila consta das seguintes etapas (numeradas de 1 a 4 na Fig. 16.1); na face externa da membrana interna, a *carnitina-acil transferase I* transfere o radical acila da coenzima A para a carnitina (1); a acil-carnitina resultante é transportada através da membrana interna por uma translocase específica (2); na face interna, a *carnitina-acil transferase II* doa o grupo acila da acil-carnitina para uma coenzima A da

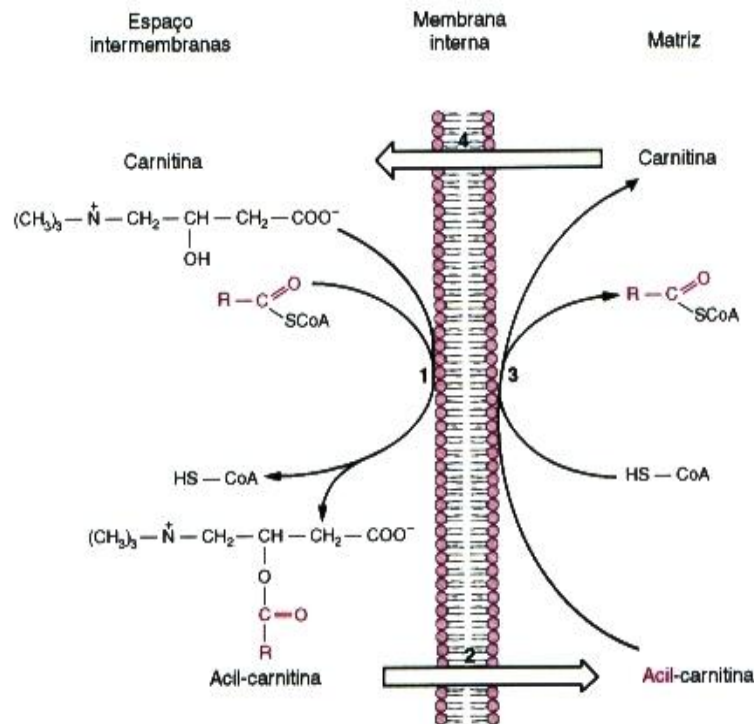


Fig. 16.1 Transporte de radicais acila para a mitocôndria. Os números referem-se às etapas descritas no texto.

matriz mitocondrial, liberando a carnitina (3), que retorna ao citossol pela mesma translocase (4). Deste modo, o radical acila dos ácidos graxos atinge o interior da mitocôndria, onde ocorre a sua oxidação.

Na β -oxidação, a acil-CoA é oxidada a acetil-CoA, produzindo NADH e FADH₂

A acil-CoA presente na matriz mitocondrial é oxidada por uma via denominada β -oxidação ou ciclo de Lynen (Fig. 16.2). Esta via consta de uma série cíclica de quatro reações, ao final das quais a acil-CoA é encurtada de dois carbonos, liberados sob a forma de acetil-CoA. As quatro reações são:

1. oxidação da acil-CoA a uma enoil-CoA (acil-CoA β -insaturada) de configuração *trans*, à custa da conversão de FAD a FADH₂ (esta é a única reação irreversível da via);
2. hidratação da dupla ligação, formando uma 3-hidroxiacil-CoA (isômero L);
3. oxidação do grupo hidroxila a carbonila, resultando uma β -cetoacil-CoA e NADH;
4. cisão da β -cetoacil-CoA por reação com uma molécula de CoA, com formação de acetil-CoA e uma acil-CoA com dois carbonos a menos; esta acil-CoA refaz o ciclo várias vezes, até ser totalmente convertida a acetil-CoA.

A atividade da β -oxidação em diferentes condições fisiológicas será discutida no Capítulo 20.

A oxidação de ácidos graxos não é restrita à mitocôndria

A degradação de ácidos graxos ocorre em outras organelas citoplasmáticas — *glioxissomos* e *peroxissomos* — através de vias metabólicas que guardam semelhanças e diferenças com a β -oxidação mitocondrial, catalisadas, naturalmente, por enzimas específicas.

Nos vegetais, a β -oxidação é feita apenas nos glioxissomos. A acetil-CoA produzida pode ser convertida em glicose, graças à presença, nestas organelas, das enzimas do ciclo do glioxilato (p. 134). Estas enzimas são ausentes de células animais, que, por isto, são incapazes de utilizar acetil-CoA como um composto gliconeogênico.

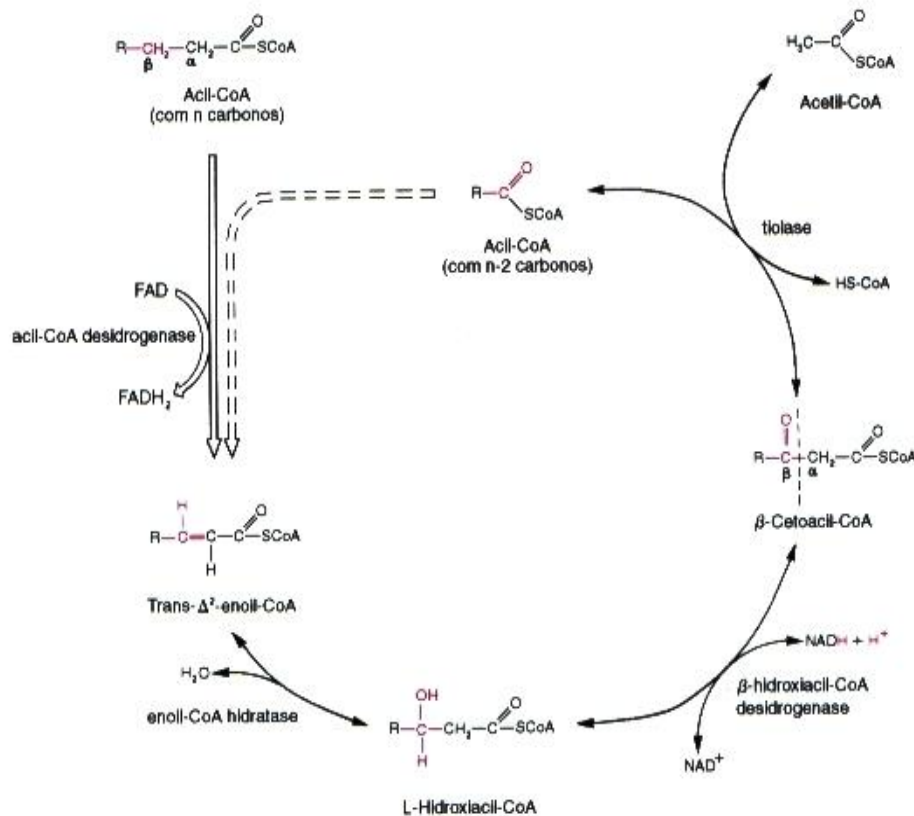


Fig. 16.2 Ciclo de Lynen — a acil-CoA formada no final de cada volta tem dois carbonos a menos e reinicia o ciclo (seta pontilhada). A única reação irreversível é aquela catalisada pela acil-CoA desidrogenase.

Nos animais, a via de oxidação peroxissômica promove o encurtamento de ácidos graxos muito longos (com mais de 20 carbonos). Os ácidos graxos de cadeia longa penetram nos peroxissomos sem auxílio da carnitina e são convertidos nas respectivas acil-CoA. A oxidação das acil-CoA longas é catalisada por uma acil-CoA oxidase, que reduz oxigênio a água oxigenada; esta é decomposta em H_2O e O_2 por ação da catalase presente nessas organelas. A acil-CoA insaturada resultante é oxidada pelas mesmas etapas da β -oxidação mitocondrial, presentes, todavia, em uma enzima bifuncional, que exibe as atividades de enoil-CoA hidratase e β -hidroxi-acil-CoA desidrogenase. Adicionalmente, a tiolase de peroxissomos só aceita, como substrato, acil-CoA com número de carbonos maior do que oito; as moléculas resultantes podem ser transportadas para as mitocôndrias, onde sua degradação total pode ser levada a cabo. Patologias graves, caracterizadas por acúmulo plasmático de ácidos graxos de cadeia longa e redução da camada de mielina dos nervos, são causadas por defeitos genéticos relacionados com a oxidação peroxissômica de ácidos graxos.

A oxidação do ácido palmítico produz 129 ATP

A oxidação completa de um ácido graxo exige a cooperação entre o ciclo de Lynen, que converte o ácido graxo a acetil-CoA, e o ciclo de Krebs, que oxida o radical acetil a CO_2 .

Em cada volta do ciclo de Lynen, há produção de 1 FADH_2 , 1 NADH , 1 acetil-CoA e 1 acil-CoA com dois átomos de carbono a menos que o ácido graxo original. Sempre que o número de átomos de carbono do ácido graxo for par, a última volta do ciclo de oxidação inicia-se com uma acil-CoA de quatro carbonos, a butiril-CoA, e, neste caso, são produzidas 2 acetil-CoA (além de FADH_2 e NADH).

O número de voltas percorridas por um ácido graxo até sua conversão total a acetil-CoA dependerá, naturalmente, do seu número de átomos de carbono. Assim sendo, para a oxidação completa de uma molécula de ácido palmítico, que tem 16 átomos de carbono, são necessárias sete voltas no ciclo (já que na última volta

Quadro 16.1 Rendimento energético da oxidação de ácido palmítico

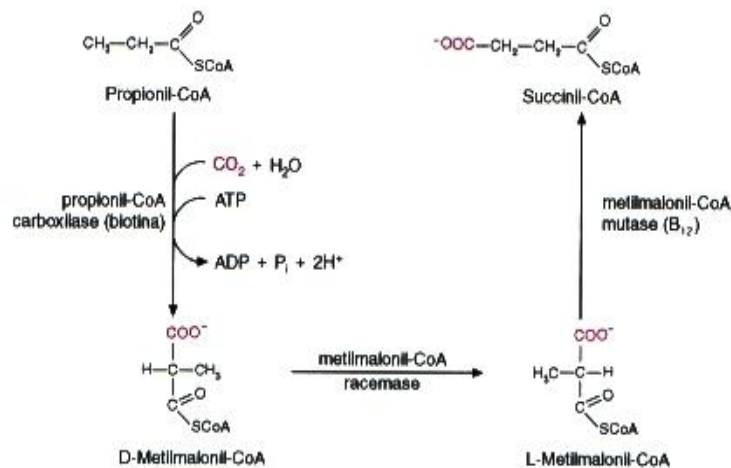
Produtos da β -oxidação	Produtos da oxidação de 8 acetil-CoA no ciclo de Krebs	Total (β -oxidação + ciclo de Krebs)	ATP formados
8 acetil-CoA			
7 NADH	24 NADH	31 NADH	93
7 FADH ₂	8 FADH ₂	15 FADH ₂	30
	8 GTP	8 GTP	8
Total			131

são produzidas *duas* moléculas de acetil-CoA), com a produção de 8 acetil-CoA. A oxidação de cada acetil-CoA no ciclo de Krebs origina 3 NADH, 1 FADH₂ e 1 GTP. Pela fosforilação oxidativa, NADH e FADH₂ formam, respectivamente, 3 e 2 ATP. A produção de ATP resultante da oxidação completa do ácido palmítico está discriminada no Quadro 16.1. Do total de ATP formado (131) deve ser descontado o gasto inicial na reação de ativação do ácido graxo, onde há conversão de ATP a AMP + 2P_i e, portanto, consumo de duas ligações ricas em energia, o que equivaleria a um gasto de 2 ATP. O rendimento final da oxidação do ácido palmítico será, então, 129 ATP.

A β -oxidação dos ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono produz propionil-CoA, que é convertida a succinil-CoA

Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono constituem uma fração minoritária dos ácidos graxos da dieta e são também oxidados pela via da β -oxidação. Neste caso, entretanto, a última volta do ciclo de Lynen inicia-se com uma acil-CoA de cinco carbonos e produz uma molécula de acetil-CoA e uma de *propionil-CoA*, ao invés de duas de acetil-CoA. Para sua oxidação, a propionil-CoA é convertida a *succinil-CoA*, um intermediário do ciclo de Krebs. A conversão (Fig. 16.3) inicia-se com carboxilação a D-metilmalonil-CoA, em uma reação que requer *biotina*, a coenzima que transfere CO₂, como acontece em outras carboxilações: conversão de piruvato a oxaloacetato (p. 174) e de acetil-CoA a malonil-CoA (Seção 16.5). Em seguida, D-metilmalonil-CoA origina succinil-CoA em duas etapas: transformação do isômero D em L e isomerização deste último composto, utilizando como coenzima a *5'-desoxiadenosil-cobalamina*, um derivado da cobalamina (vitamina B₁₂).

A propionil-CoA origina-se também da degradação de alguns aminoácidos. Nos ruminantes, constitui uma fonte de energia importante, obtida a partir de propionato, um produto da fermentação microbiana no rúmen.

**Fig. 16.3** Conversão de propionil-CoA a succinil-CoA.

A oxidação de ácidos insaturados também requer enzimas adicionais

Os ácidos graxos insaturados são muito comuns em tecidos animais e vegetais, e suas duplas ligações apresentam quase sempre a configuração *cis* (Capítulo 6).

Após a remoção de algumas unidades de dois carbonos (acetil-CoA) pelo ciclo de Lynen, o ácido graxo insaturado pode originar dois tipos de enoil-CoA (Fig. 16.4), conforme a posição original da dupla ligação em sua molécula: se a dupla ligação for de número ímpar (como a Δ^9 do ácido oleico), forma-se uma *cis*- Δ^3 -enoil-CoA; se for de número par (como a Δ^{12} do ácido linoleico), resulta uma *cis*- Δ^4 -enoil-CoA (consultar o Quadro 6.1 sobre a representação das duplas ligações de ácidos graxos). Para a oxidação dessas acil-CoA insaturadas, são necessárias, além das enzimas da β -oxidação, outras enzimas que as convertam em *trans*- Δ^2 -enoil-CoA, o intermediário insaturado da β -oxidação.

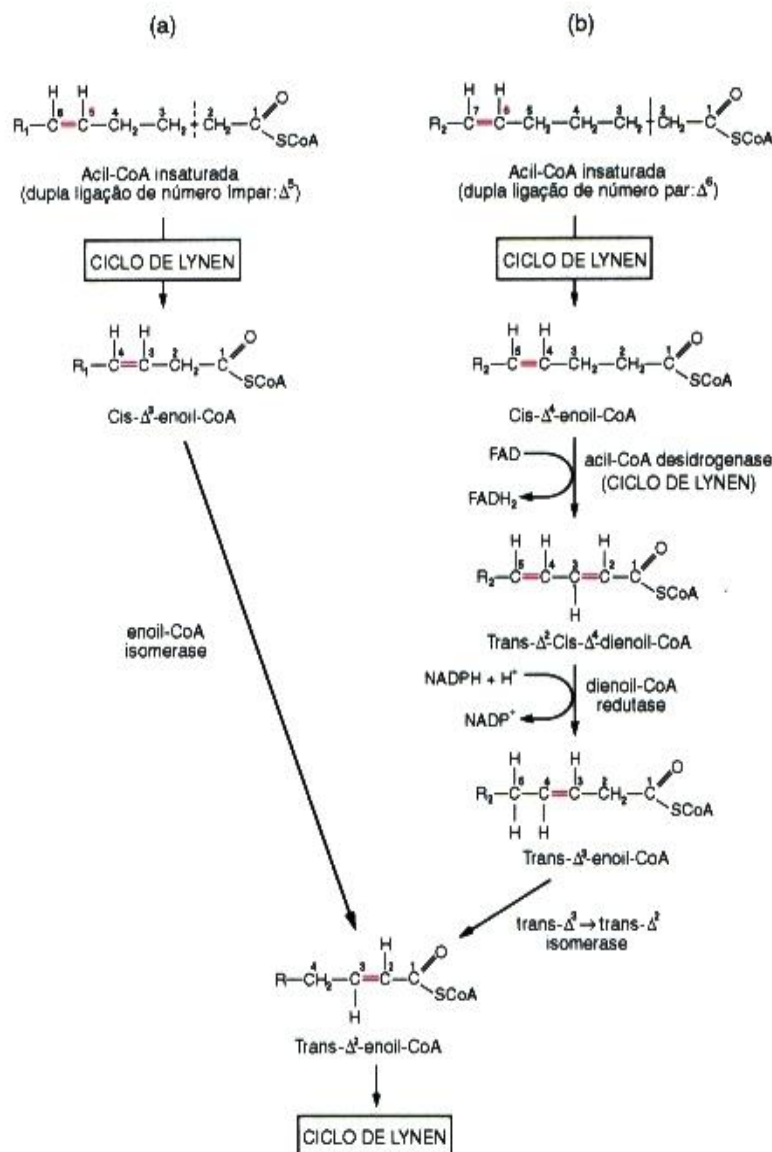


Fig. 16.4 Reações adicionais às do ciclo de Lynen para a oxidação de ácidos graxos insaturados. a) Quando o ácido graxo tem uma dupla ligação de número ímpar — Δ^5 no exemplo considerado — após algumas voltas do ciclo de Lynen, forma-se uma *cis*- Δ^3 -enoil-CoA; b) Quando tem uma dupla ligação de número par — Δ^6 no exemplo —, forma-se uma *cis*- Δ^4 -enoil-CoA.

No caso em que se forma *cis*- Δ^3 -enoil-CoA (Fig. 16.4 a), uma *enoil-CoA isomerase* possibilita a sua transformação em *trans*- Δ^2 -enoil-CoA, o substrato da enoil-CoA hidratase, que pode obedecer à seqüência de reações da β -oxidação.

O segundo tipo de enoil-CoA que pode ser formada, a *cis*- Δ^4 -enoil-CoA, é reconhecida pela acil-CoA desidrogenase do ciclo de Lynen, que a converte, porém, em uma *trans*- Δ^2 -*cis*- Δ^4 -dienoil-CoA, que não é aceita pela enoil-CoA hidratase (Fig. 16.4 b). Para o prosseguimento de sua oxidação, é necessária a participação de uma *dienoil-CoA redutase*, que reduz a ligação *cis*- Δ^4 à custa de NADPH, originando *trans*- Δ^3 -enoil-CoA; uma *trans*- $\Delta^3 \rightarrow$ *trans*- Δ^2 -isomerase converte a dupla ligação *trans*- Δ^3 em *trans*- Δ^2 , chegando-se, portanto, ao intermediário insaturado da β -oxidação. Estas etapas ocorrem em células de mamíferos; em bactérias, a dienoil-CoA redutase produz, diretamente, *trans*- Δ^2 -enoil-CoA.

Ácidos graxos ramificados ou hidroxilados são oxidados por alfa e beta-oxidação

Ácidos graxos contendo ramificações ou hidroxilações são comuns nos lipídios das bactérias, mas muito pouco freqüentes nos animais superiores. Nestes organismos, os ácidos graxos ramificados ocorrem apenas como componentes da cera produzida pelas glândulas sebáceas, e os hidroxilados (uma hidroxila no carbono α), como componentes de esfingolipídios do tecido nervoso. Os ácidos graxos ramificados são, todavia, constituintes quantitativamente importantes da alimentação (gramíneas) de animais ruminantes; como conseqüência, ocorrem também em componentes da dieta dos seres humanos, como gorduras de origem animal, leite e seus derivados. Um exemplo é o *ácido fitânico* (Fig. 16.5 a), obtido por oxidação do *fitol*, um dos substituintes do anel pirrólico da clorofila.

O ácido fitânico, assim como a maioria dos ácidos graxos ramificados dos animais, possui um grupo metil no carbono β (e em outros carbonos de número ímpar), que não é reconhecido pela acil-CoA desidrogenase, que ca-

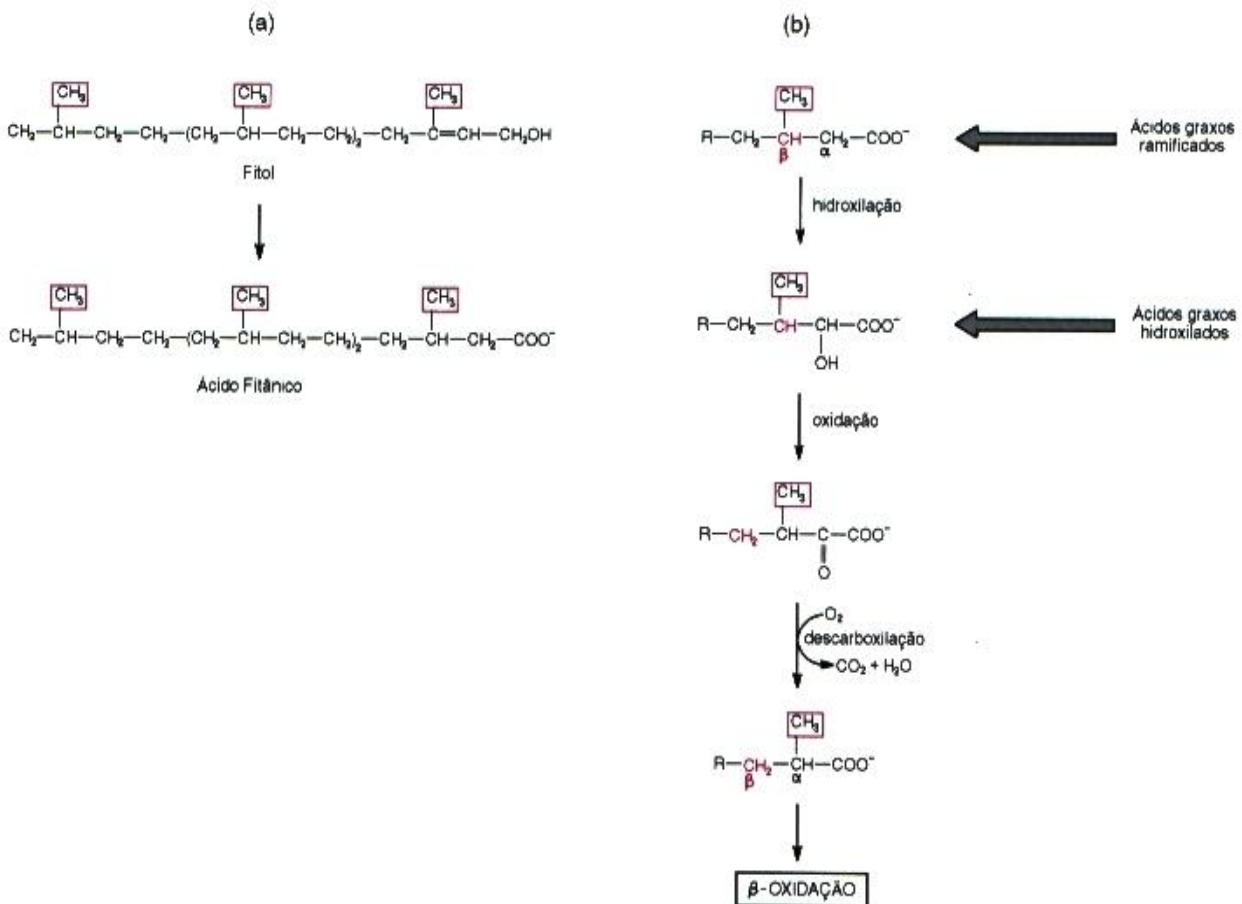


Fig. 16.5 a) Estrutura do fitol e do ácido fitânico. b) α -Oxidação de ácidos graxos ramificados e hidroxilados: por hidroxilação do carbono α , os ácidos graxos ramificados originam ácidos graxos hidroxilados, que, após oxidação e descarboxilação, são convertidos em substratos da β -oxidação.

talisa a primeira reação da β -oxidação. Esta situação é contornada pela α -oxidação (Fig. 16.5 b), que ocorre nos peroxissomos e se inicia com a hidroxilação do carbono α . Neste ponto, a degradação dos ácidos graxos metilados confunde-se com aquela dos ácidos graxos hidroxilados, que, na maioria dos casos, apresentam uma hidroxila no carbono α . Segue-se uma oxidação e uma descarboxilação, resultando um composto que tem o radical metil agora no carbono α e apresenta o carbono β não-substituído, podendo ser ativado e oxidado pelo ciclo de Lynen.

A deficiência hereditária da enzima que catalisa a hidroxilação do carbono α resulta em acúmulo de ácido fitânico no sangue e nos tecidos, com ocorrência de lesões neurológicas (*moléstia de Refsum*).

16.3 CORPOS CETÔNICOS

No fígado, a acetil-CoA pode ser convertida a corpos cetônicos, oxidados por tecidos extra-hepáticos

No fígado dos mamíferos, uma pequena quantidade de acetil-CoA é normalmente transformada em *acetoacetato* e β -hidroxibutirato. O acetoacetato sofre descarboxilação espontânea, originando *acetona*. Os três compostos são chamados, em conjunto, de *corpos cetônicos*¹, e sua síntese, de *cetogênese*. Esta ocorre na matriz mitocondrial, através da condensação de três moléculas de acetil-CoA em duas etapas (Fig. 16.6). Na primeira, catalisada pela tiolase, duas moléculas de acetil-CoA originam acetoacetil-CoA. Esta reação, quando transcorre no sentido oposto, constitui a última reação da última volta do ciclo de Lynen. A reação de acetoacetil-CoA com uma terceira molécula de acetil-CoA forma *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)*. Sua clivagem origina acetoacetato e acetil-CoA. O acetoacetato produz β -hidroxibutirato e acetona.

Os corpos cetônicos são liberados na corrente sanguínea, e o acetoacetato e o β -hidroxibutirato são aproveitados como fonte de energia pelos tecidos extra-hepáticos, principalmente coração e músculos esqueléticos. Estes órgãos são capazes de utilizar os dois compostos por possuírem uma enzima, ausente do fígado, a β -*cetoacil-CoA transferase*. Esta enzima catalisa a transferência de CoA de succinil-CoA para acetoacetato, formando acetoacetil-CoA. A acetoacetil-CoA é um intermediário do ciclo de Lynen e, por ação da tiolase, é clivada em duas moléculas de acetil-CoA, que podem ser oxidadas pelo ciclo de Krebs. O aproveitamento de β -hidroxibutirato é feito por sua prévia conversão em acetoacetato, através da ação da β -hidroxibutirato desidrogenase. A acetona, por sua vez, não é oxidada, sendo volatilizada nos pulmões.

Os corpos cetônicos constituem-se, portanto, em um veículo para a transferência de carbonos oxidáveis (originários de acetil-CoA) do fígado para outros órgãos. Normalmente, apenas uma pequena quantidade de acetil-CoA é convertida em corpos cetônicos no fígado, já que os seus destinos metabólicos principais são a oxidação (pelo ciclo de Krebs e cadeia de transporte de elétrons) ou o consumo pela síntese de lipídios. A decisão entre os dois caminhos dependerá da situação fisiológica vigente. A produção de corpos cetônicos é anormalmente elevada quando a degradação de triacilgliceróis não é acompanhada pela degradação de carboidratos. Realmente, para a oxidação eficiente da acetil-CoA pelo ciclo de Krebs, há necessidade de níveis compatíveis de oxaloacetato, para a reação de condensação que inicia o ciclo. Na ausência de carboidratos, diminui a concentração de piruvato e, conseqüentemente, sua conversão a oxaloacetato. Ainda mais, quando não há oferta de glicose, o organismo lança mão da gliconeogênese que consome oxaloacetato obtido de aminoácidos, principalmente. A oxidação da acetil-CoA pelo ciclo de Krebs fica, então, impedida: a acetil-CoA acumulada condensa-se, formando os corpos cetônicos. É o que ocorre quando há redução drástica da ingestão de carboidratos (jejum ou dieta) ou distúrbios de seu metabolismo (diabetes). Quando a produção ultrapassa o aproveitamento pelos tecidos extra-hepáticos, estabelece-se uma condição denominada *cetose*, caracterizada por uma concentração elevada de corpos cetônicos no plasma (*cetonemia*) e na urina (*cetonúria*). Um outro sintoma peculiar de indivíduos com cetose é o odor de acetona de seu hálito. Como os outros dois corpos cetônicos são ácidos, a cetonemia resulta em *acidose*, isto é, uma diminuição do pH sanguíneo. Em casos de cetose acentuada, o cérebro obtém uma parte considerável da energia de que necessita por oxidação dos corpos cetônicos (Capítulo 21).

¹A denominação "cetônicos" é inadequada, mas comumente utilizada.

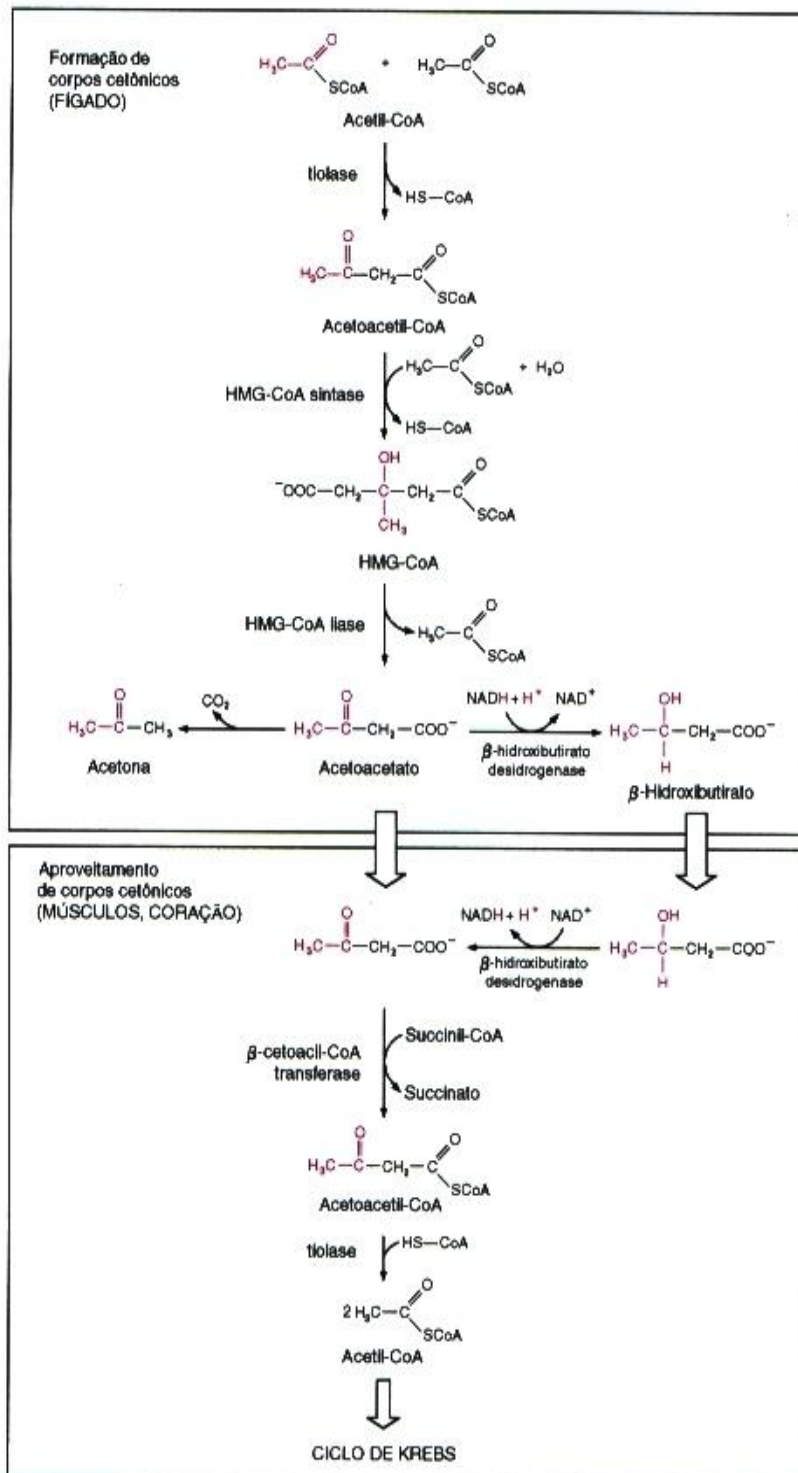
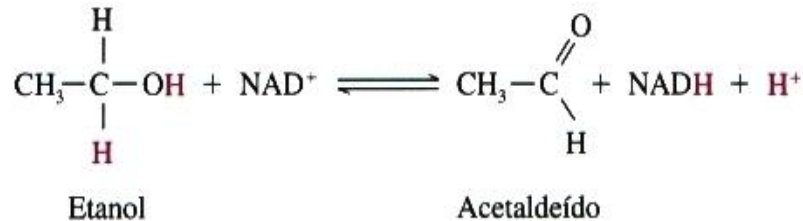


Fig. 16.6 Os corpos cetônicos são formados no fígado e oxidados principalmente pelos músculos e coração. No jejum prolongado, passam a ser utilizados também pelo cérebro.

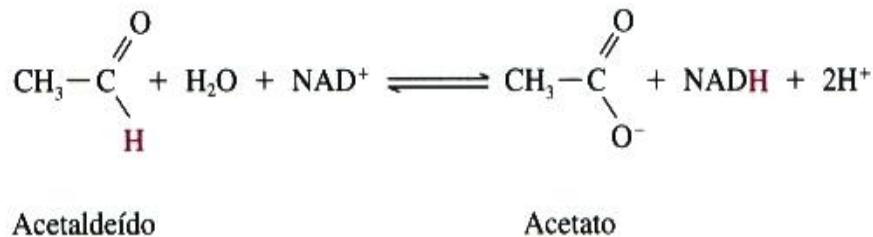
16.4 METABOLISMO DO ETANOL

O etanol é oxidado a acetil-CoA

O etanol ingerido pelos seres humanos é prontamente absorvido e, no fígado, é oxidado a acetaldeído por uma *álcool desidrogenase* citossólica, em uma reação idêntica à última etapa da fermentação alcoólica por leveduras, ocorrendo, neste caso, em sentido inverso:



O equilíbrio da reação favorece a formação de etanol, mas sua oxidação prossegue graças à conversão de acetaldeído em *acetato*, catalisada pela *acetaldeído desidrogenase* mitocondrial:



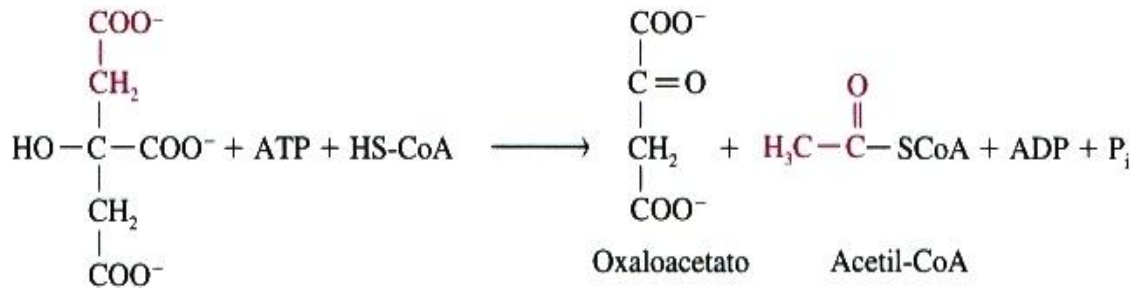
O acetato, à semelhança dos ácidos graxos, origina acetil-CoA por ação de uma acil-CoA sintetase. Neste ponto, o metabolismo do etanol confunde-se com o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, que também originam acetil-CoA. Sendo assim, o consumo de quantidades discretas de etanol significa consumo adicional de calorias, que devem ser somadas àquelas derivadas da ingestão de nutrientes no cômputo das calorias totais da dieta (Capítulo 18). Todavia, quando há ingestão constante de etanol, nem sequer o seu conteúdo calórico é aproveitado pelo organismo. Uma via minoritária, catalisada por um sistema enzimático localizado na membrana do retículo endoplasmático, oxida etanol, utilizando oxigênio, mas sem o concurso da cadeia de transporte de elétrons e, portanto, sem a produção de ATP. A ingestão de etanol a longo prazo determina a indução das enzimas do retículo, de modo que a sua oxidação processa-se sem rendimento energético. A ingestão de grandes quantidades de etanol e, principalmente, o alcoolismo crônico têm inúmeras consequências danosas para o organismo.

Os efeitos metabólicos do álcool ilustram a importância da concentração relativa das formas oxidada e reduzida de coenzimas, como um fator regulador do metabolismo. A oxidação do etanol nas células hepáticas produz níveis altos de NADH no citossol, onde normalmente a concentração de NAD⁺ é muito maior do que a de NADH. A alta concentração de NADH desloca a reação catalisada pela lactato desidrogenase no sentido da formação de lactato, cuja concentração pode aumentar de até cinco vezes, levando, portanto, a uma acidose. A constante conversão de piruvato a lactato impossibilita a gliconeogênese, já que todos os aminoácidos glicogênicos devem ser primeiramente convertidos a piruvato; ou seja, nesta situação, em vez de originarem glicose, são transformados em lactato. Como, muitas vezes, a tomada de álcool não é acompanhada da ingestão de nutrientes, diminuída a reserva de glicogênio, pode ocorrer hipoglicemia e, finalmente, coma. A alta produção de acetil-CoA associada à baixa disponibilidade de glicose ocasiona cetose. Ainda mais, as concentrações altas de acetaldeído são tóxicas: trata-se de uma substância extremamente reativa, que se liga covalentemente a proteínas, modificando a sua estrutura; é grandemente responsável pelos efeitos tardios da embriaguez, a ressaca. Estes são alguns dos efeitos agudos da ingestão de etanol; o alcoolismo crônico causa cirrose, caracterizada por redução de tecido hepático funcional, que, obviamente, acarreta complicações múltiplas. Os efeitos metabólicos do etanol a longo prazo ainda são mal compreendidos, especialmente aqueles que induzem a dependência.

16.5 SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS

A primeira etapa da síntese de ácidos graxos é o transporte de acetil-CoA para o citossol

Nos mamíferos, os ácidos graxos são sintetizados a partir de carboidratos, principalmente, e do excedente de proteínas da dieta. Na via que leva à sua produção, o substrato imediato é a acetil-CoA e o produto final é o ácido palmítico. A síntese ocorre no citossol, para onde deve ser transportada a acetil-CoA formada na mitocôndria, fundamentalmente a partir de piruvato. Como a membrana interna da mitocôndria é impermeável a acetil-CoA, os seus carbonos são transportados sob a forma de citrato (Fig. 16.7). Algumas considerações preliminares sobre a regulação de vias metabólicas — assunto da Parte 4 — tornam-se necessárias. A síntese de ácidos graxos é sujeita a diversos mecanismos de controle (p. 289), mas ocorre, invariavelmente, quando a carga energética celular é alta (relação ATP/ADP alta). Os carboidratos e proteínas — os precursores dos ácidos graxos — são degradados a acetil-CoA e oxaloacetato, que sofrem condensação, formando citrato, por ação da primeira enzima do ciclo de Krebs, a citrato sintase. Na condição considerada, o citrato não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs em virtude da inibição da isocitrato desidrogenase (ver Regulação do Ciclo de Krebs, p. 286) e é transportado para o citossol pela tricarboxilato translocase, onde é cindido em oxaloacetato e acetil-CoA, à custa de ATP, numa reação catalisada pela *citrato liase*:



Citrato

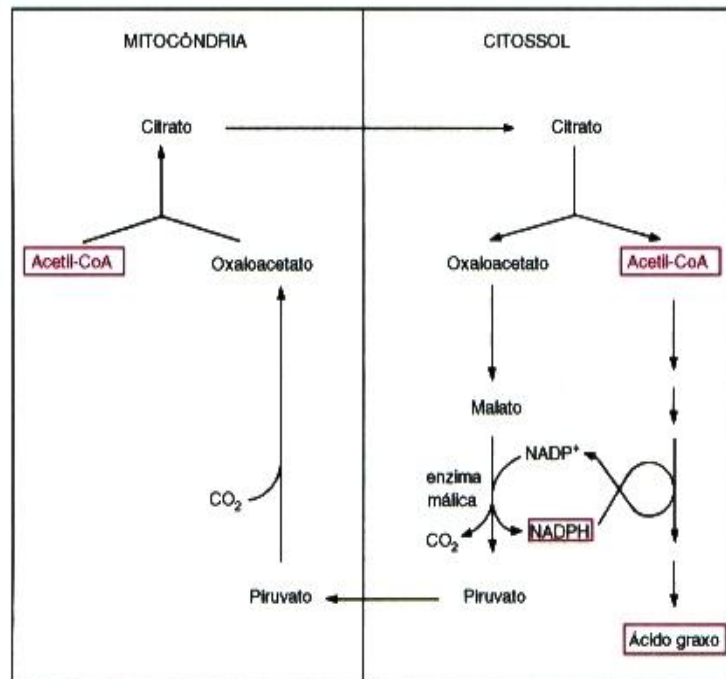
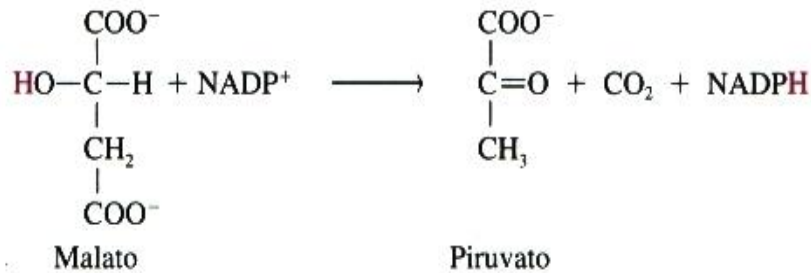


Fig. 16.7 Transporte de acetil-CoA, sob a forma de citrato, da mitocôndria para o citossol.

O oxaloacetato é reduzido a malato pela *malato desidrogenase* do citossol. O malato é substrato da *enzima málica*: nesta reação são produzidos piruvato, que retorna à mitocôndria, e NADPH.



O resultado final desta seqüência de reações é, portanto, o transporte dos carbonos da acetil-CoA (sob a forma de citrato), com gasto de ATP, da mitocôndria para o citossol e, ainda, a produção de NADPH. Acetil-CoA e NADPH, ambos no citossol, podem, então, ser utilizados para formar ácidos graxos. O NADPH, que também é fornecido pela via das pentoses fosfato, constitui o agente redutor desse processo.

A síntese de ácidos graxos tem acetil-CoA e malonil-CoA como doadores de carbonos e NADPH como agente redutor

A síntese de ácidos graxos consiste na união seqüencial de unidades de dois carbonos: a primeira unidade é proveniente de acetil-CoA, e todas as subseqüentes, de malonil-CoA, formada por carboxilação de acetil-CoA. Esta reação é catalisada pela *acetil-CoA carboxilase*, que tem como grupo prostético a *biotina*. O mecanismo de ação da enzima é semelhante ao de outras carboxilases biotina-dependentes, como a propionil-CoA carboxilase (p. 198) e piruvato carboxilase (p. 173). Em aves e mamíferos, a forma cataliticamente ativa da acetil-CoA carboxilase é uma molécula filamentososa, resultante da associação de protômeros inativos. A polimerização e, portanto, a ativação da enzima constitui um ponto importante de regulação da síntese de ácidos graxos (Capítulo 20).

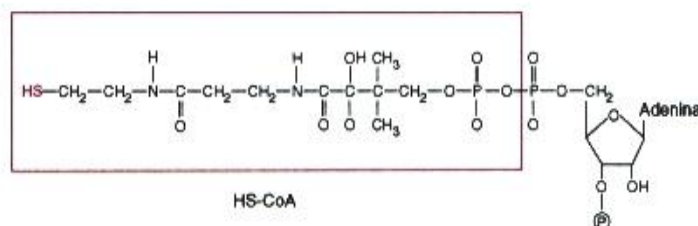
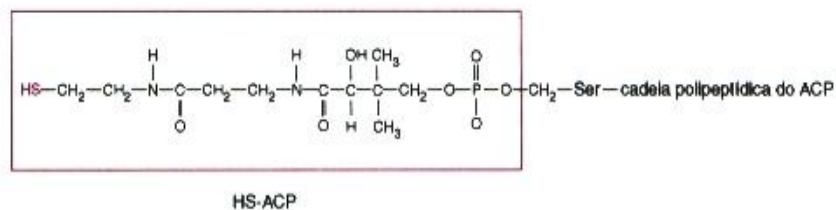
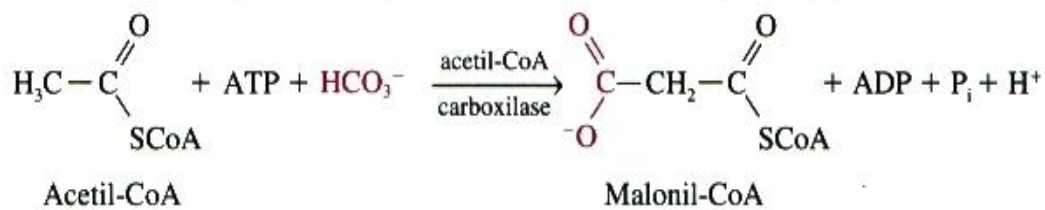


Fig. 16.8 O ACP, como a coenzima A, une-se a radicais acila através de ligação tioéster com a sulfidril terminal (assinalada em vermelho) do grupo fosfopanteteína (delimitado pelo retângulo). No ACP, o grupo fosfopanteteína está ligado a um resíduo de serina e na coenzima A, ao AMP.

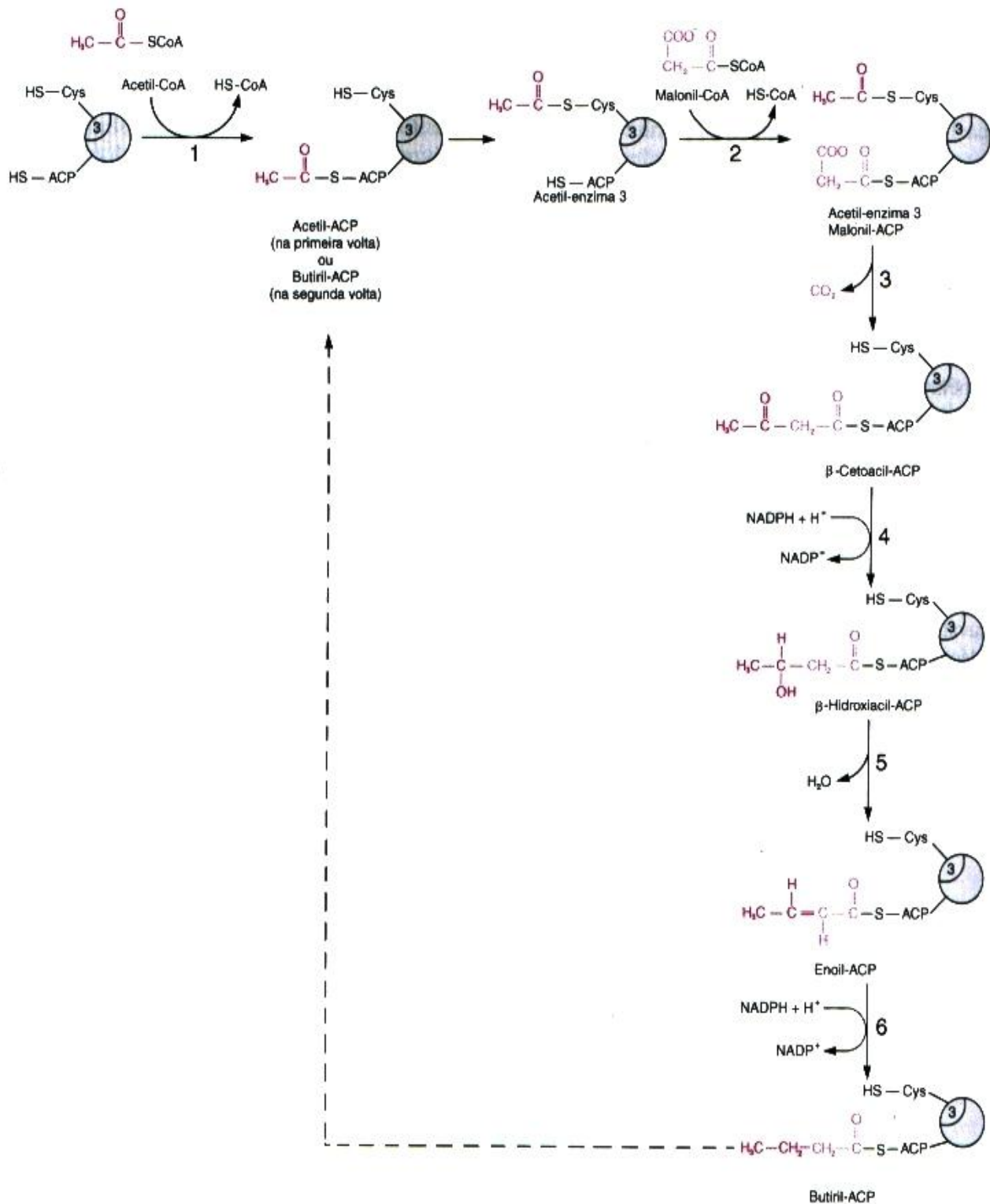


Fig. 16.9 Esquema da síntese de ácidos graxos. As enzimas constituintes da sintase são: acetil-CoA-ACP-transacilase (1), malonil-CoA-ACP-transacilase (2), β -cetoacil-ACP sintase (3), β -cetoacil-ACP redutase (4), β -hidroxiacil-ACP desidratase (5) e enoil-ACP redutase (6). A sintase de ácidos graxos está representada por uma esfera, na qual estão destacados o ACP, com sua sulfidril terminal, e a β -cetoacil-ACP sintase (enzima 3), com o grupo SH de um de seus resíduos de cisteína. A figura mostra o primeiro ciclo de síntese, que leva à formação de butiril-ACP. Para o alongamento da cadeia carbônica (seta pontilhada), o butiril-ACP sintetizado no final da primeira volta sofre a mesma seqüência de reações (enzimas 2 a 6), que o acetil-ACP: o radical butiril, é transferido para o grupo SH da enzima 3, como ocorreu com o radical acetil no início da primeira volta, prosseguindo as reações como no primeiro ciclo de síntese.

A síntese de ácidos graxos é catalisada por um sistema enzimático denominado *sintase de ácidos graxos*. Nos diferentes organismos, a estrutura da sintase é variável, mas as reações catalisadas são as mesmas. Também faz parte destas sintases uma pequena proteína não-enzimática, designada *proteína carregadora de acila*, ou *ACP* (de *acyl-carrier protein*), à qual está sempre ligada a cadeia do ácido graxo em crescimento. O ACP tem como grupo prostético um derivado do ácido pantotênico: a *fosfopanteteína*, também componente da coenzima A (Fig. 16.8). A longa cadeia de fosfopanteteína do ACP transporta o substrato entre os diferentes centros ativos componentes da sintase, à semelhança da atuação do ácido lipóico no complexo piruvato desidrogenase (p. 129).

A síntese (Fig. 16.9, onde as enzimas constituintes da sintase estão numeradas de 1 a 6), inicia-se com a transferência do radical acetil da acetil-CoA para o ACP, catalisada pela *acetil-CoA-ACP-transacilase* (enzima 1); este radical é, em seguida, transferido para o grupo SH de um resíduo de cisteína de outra enzima da sintase, a β -cetoacil-ACP sintase (enzima 3). O ACP, agora livre, pode receber o radical malonil da malonil-CoA, formando malonil-ACP, por ação da *malonil-CoA-ACP transacilase* (enzima 2). Segue-se uma condensação dos grupos acetil e malonil, catalisada pela β -cetoacil-ACP sintase ou *enzima de condensação* (enzima 3), com liberação de CO_2 . Este CO_2 é exatamente aquele utilizado na carboxilação de acetil-CoA a malonil-CoA. Por isso, apesar de CO_2 ser imprescindível à síntese de ácidos graxos, seu átomo de carbono não aparece no produto. O fato de a condensação processar-se com uma descarboxilação faz com que esta reação seja acompanhada de uma grande queda de energia livre, dirigindo-a no sentido da síntese. Justifica-se assim o gasto inicial de ATP para produzir malonil-CoA a partir de acetil-CoA: a utilização do precursor de três carbonos contorna a inviabilidade termodinâmica da condensação de duas moléculas de dois carbonos.

A β -cetoacil-ACP de quatro carbonos formada sofre redução, desidratação e nova redução, catalisadas, respectivamente, por β -cetoacil-ACP redutase (enzima 4), β -hidroxiacil-ACP desidratase (enzima 5) e *enoiil-ACP redutase* (enzima 6). As duas redutases usam NADPH como doador de elétrons. Neste ponto, termina o primeiro ciclo de síntese, com a formação de *butiril-ACP*.

Para prosseguir o alongamento da cadeia — por adição de unidades de dois carbonos fornecidos por malonil-CoA —, o radical butiril é transferido para o grupo SH da β -cetoacil-ACP sintase (à semelhança do que ocorreu com o radical acetil), liberando o ACP que pode, então, receber outro radical malonil. A repetição do ciclo por mais cinco voltas (perfazendo um total de sete voltas), leva à formação de *palmitoil-ACP*, o produto final da sintase de ácidos graxos. Este produto pode ser hidrolisado por uma *tioesterase*, liberando o ácido palmítico, ou, mais comumente, ser transferido para a CoA, formando palmitoil-CoA, um dos substratos da síntese de triacilgliceróis e fosfolipídios.

A estrutura das sintases de ácidos graxos varia conforme o organismo em questão. Nas bactérias e plantas, as enzimas responsáveis pela síntese são entidades independentes, mas agrupadas em um complexo multienzimático. Nos animais, a sintase é composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas associadas em um dímero, que sintetiza duas moléculas de ácido graxo simultaneamente, uma em cada monômero. O que torna notável esta sintase é o fato de ela ser uma *enzima multifuncional*. Tal termo é aplicado para designar enzimas que apresentam várias atividades catalíticas, cada uma das quais associada a um domínio específico da proteína. Este é exatamente o caso da sintase dos animais, que apresenta, em cada uma das duas cadeias polipeptídicas, as mesmas atividades encontradas no complexo multienzimático bacteriano, além do ACP. Todavia, a enzima dos animais deixa de ser funcional após dissociação dos monômeros, porque uma das atividades — a de condensação — depende de interações entre as duas subunidades. O sítio catalítico para a condensação, e, portanto, para o início do alongamento, só se organiza na proteína dimérica. A presença de enzimas multifuncionais traz, naturalmente, grande eficiência ao processo de síntese; a associação em um dímero permite, ainda, a síntese concomitante de duas moléculas de palmitato.

Deve-se notar que a seqüência das reações de síntese (condensação, redução, desidratação e redução) é inversa à seqüência das reações de oxidação de um ácido graxo pelo ciclo de Lynen (oxidação, hidratação, oxidação, quebra da cadeia carbônica) (Fig. 16.10). Os processos diferem, entretanto, quanto às enzimas e coenzimas utilizadas, o compartimento celular onde se processam e o suporte da cadeia carbônica (CoA ou ACP).

A síntese de ácidos graxos nos animais ocorre em muitos tecidos, verificando-se uma variação entre as diferentes espécies, quanto ao tecido onde ela é mais relevante. Nos seres humanos, a maior parte dos ácidos graxos são produzidos pelo fígado a partir de carboidratos da dieta e exportados para os outros tecidos através das lipoproteínas plasmáticas.

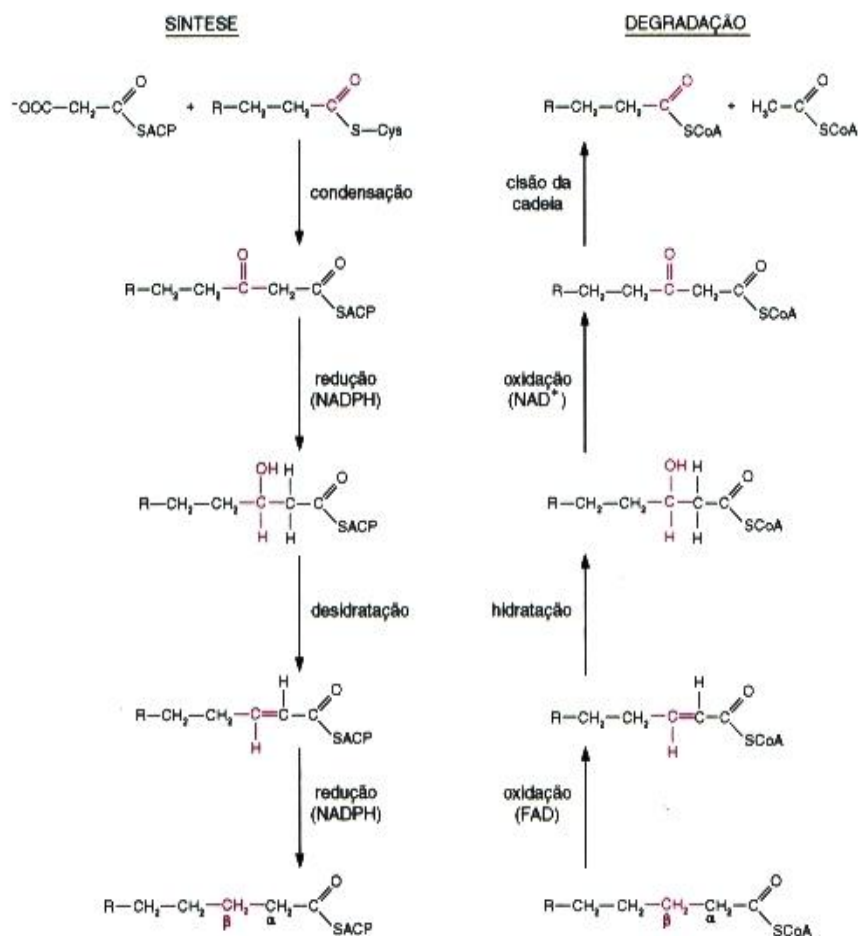


Fig. 16.10 Comparação entre a síntese e a degradação de um ácido graxo — os dois processos compreendem os mesmos tipos de reações, ocorrendo, todavia, em sentido e seqüência opostos.

A síntese de *ácido palmítico* (16 C), no total, requer: 1 acetil-CoA, 7 malonil-CoA, 14 NADPH e 7 ATP consumidos na formação de 7 malonil-CoA a partir de 7 acetil-CoA.

O NADPH tem duas origens: provém da reação catalisada pela enzima málica e das reações da via das pentoses-fosfato catalisadas por desidrogenases, que sofrem uma regulação paralela à regulação da síntese de ácidos graxos (p. 160). A importância relativa entre as duas fontes de poder redutor depende do tecido considerado.

Nos vegetais fotossintéticos, a síntese de ácidos graxos ocorre nos cloroplastos, onde também é produzido NADPH, através das reações da fase clara da fotossíntese.

A regulação da síntese de ácidos graxos será analisada no Capítulo 20.

16.6 ÁCIDOS GRAXOS ESSENCIAIS

O palmitato pode sofrer alongamento e insaturações. Alguns ácidos graxos insaturados são essenciais para os mamíferos

O ácido palmítico é o precursor utilizado para a formação de ácidos graxos saturados mais longos ou insaturados.

Os sistemas enzimáticos incumbidos do alongamento situam-se no retículo endoplasmático e na mitocôndria. Ambos os sistemas promovem adições sucessivas de unidades de dois carbonos, através de uma reação de condensação, seguida por redução, desidratação e nova redução, ou seja, a mesma seqüência de etapas que le-

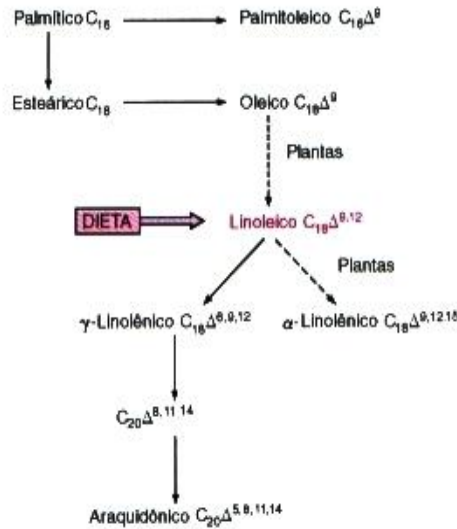


Fig. 16.11 Alongamento e insaturação do ácido palmítico — o ácido linoleico é essencial para o homem, devendo ser fornecido pela dieta. As conversões que ocorrem apenas nos vegetais estão indicadas por setas tracejadas.

vam à síntese de palmitato. Na via que ocorre no retículo endoplasmático, o substrato doador de carbonos é malonil-CoA, e o agente redutor, NADPH; na mitocôndria, o alongamento utiliza acetil-CoA, NADH e NADPH.

As células animais têm uma capacidade de sintetizar ácidos graxos insaturados muito menor do que as células vegetais. A maioria dos mamíferos, incluindo os seres humanos, dispõem de *dessaturases* que produzem insaturações *apenas* nas posições Δ^4 , Δ^5 , Δ^6 e Δ^9 , não havendo possibilidade de introdução de duplas ligações entre carbonos mais distantes da carboxila do que o C_9 ; todavia, ácidos graxos contendo insaturações Δ^{12} e Δ^{15} são imprescindíveis para esses organismos. Tais ácidos graxos são obtidos de plantas, que têm *dessaturases* capazes de sintetizar as duplas ligações Δ^{12} e Δ^{15} .

As *dessaturases* de mamíferos fazem parte de um sistema enzimático ligado ao retículo endoplasmático, que inclui o *citocromo b₅*, e requer NADH e O_2 . Este sistema produz os ácidos graxos monoinsaturados mais comuns nos tecidos animais: *palmitoleico* e *oleico*, através da introdução de uma dupla ligação na posição Δ^9 do ácido palmítico e esteárico, respectivamente. No homem, os ácidos *linoleico* ($C_{18} \Delta^{9,12}$) e *α-linolênico* ($C_{18} \Delta^{9,12,15}$) devem ser obtidos da dieta, por ingestão de óleos vegetais, sendo, por isso, ditos *essenciais*. A *dessaturação* adicional do ácido linoleico origina o *ácido γ-linolênico* ($C_{18} \Delta^{6,9,12}$) nos animais e o *ácido α-linolênico* ($C_{18} \Delta^{9,12,15}$) nas plantas (Fig. 16.11). O ácido *γ-linolênico* sofre alongamento de dois carbonos que resulta em alteração da posição das insaturações — deslocamento de dois carbonos a partir do C_1 — e formação de um intermediário $C_{20} \Delta^{8,11,14}$. A quarta insaturação introduzida é a Δ^5 , originando o *ácido araquidônico* ($C_{20} \Delta^{5,8,11,14}$). Admite-se que o ácido linoleico seja o único ácido graxo essencial para o homem; as necessidades de ácido *α-linolênico* são, ainda, obscuras. As demandas nutricionais de ácidos graxos essenciais serão analisadas no Capítulo 18.

Os ácidos graxos insaturados contribuem para a fluidez adequada das membranas celulares e para o transporte de colesterol; os ácidos graxos essenciais destacam-se ainda mais, por serem os precursores de compostos fisiologicamente importantes, como será analisado a seguir.

Os eicosanóides são sintetizados a partir do ácido araquidônico

O ácido araquidônico, nos seres humanos, é precursor de compostos estruturalmente relacionados: *prostaglandinas*, *prostaciclina*, *tromboxanas* e *leucotrienos*. As quatro famílias de substâncias são chamadas, conjuntamente, de *eicosanóides*, por terem 20 carbonos (*eikosi*, em grego, significa vinte). O ácido araquidônico é um constituinte de fosfolipídios de membrana e, por isto, a síntese dos eicosanóides inicia-se com a liberação daquele ácido graxo, através de hidrólise, catalisada por fosfolipases específicas. A via de síntese apresenta uma bifurcação: um ramo produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanas, e o outro, os leucotrienos (Fig. 16.12). O tipo de eicosanóide sintetizado dependerá das enzimas presentes no tecido considerado.

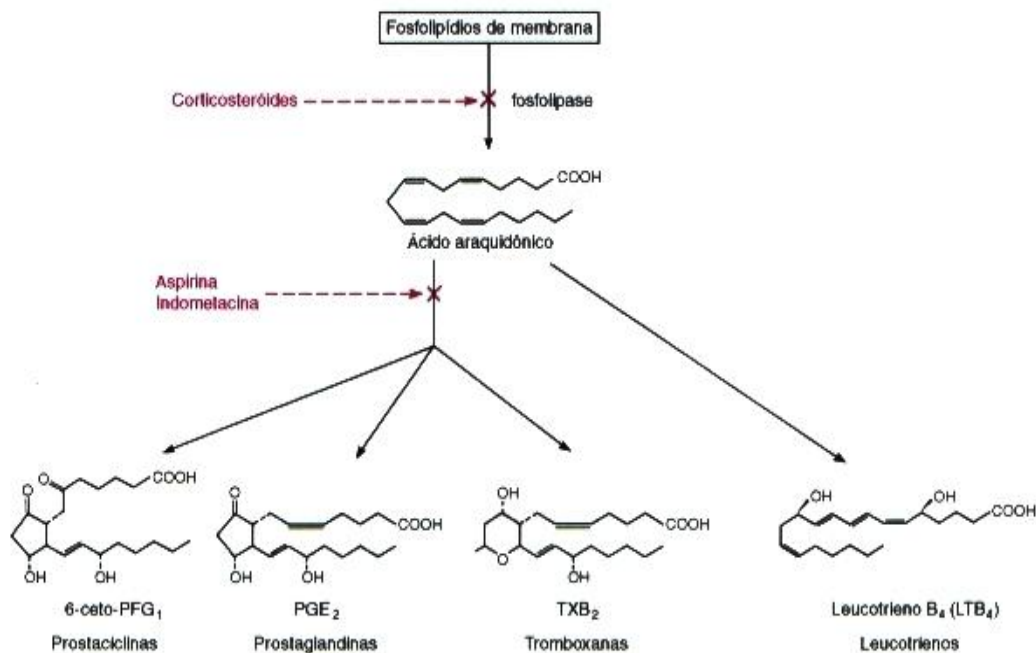


Fig. 16.12 Esquema simplificado da síntese de eicosanóides a partir de ácido araquidônico, que deve ser primeiramente liberado de fosfolípidios de membrana. A figura mostra a estrutura de um membro representativo de cada família de eicosanóides e os pontos de inibição de agentes antiinflamatórios.

Os eicosanóides são produzidos pela maioria das células, exceto hemácias, e atuam em concentrações tão baixas quanto os hormônios; ao contrário destes, não são transportadas pela circulação e exercem seu efeito no local onde são produzidos, sendo, por isso, denominados de “hormônios locais”. Participam da regulação de processos fisiológicos muito diversificados: contração de musculatura lisa e, conseqüentemente, regulação da pressão arterial, dilatação dos brônquios, contração uterina etc.; reação inflamatória; manifestação de dor e febre; coagulação sanguínea e outros. Essas substâncias têm despertado enorme interesse médico, não somente devido ao seu largo espectro de ação, mas também por atuarem em concentrações extremamente baixas e terem meia-vida muito curta; tais características viabilizam a sua utilização para o desenvolvimento de agentes farmacológicos potentes.

Com efeito, diversos antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos interferem no metabolismo de eicosanóides (Fig. 16.12). Os *corticosteróides*, por exemplo, inibem a fosfolipase, reduzindo a disponibilidade de ácido araquidônico, afetando, portanto, a síntese de todos os eicosanóides; os antiinflamatórios não-esteróidicos, como *aspirina* (mecanismo de ação na p. 80), *indometacina*, *fenilbutazona*, *acetoaminofen* etc., inibem apenas a subdivisão da via que origina prostaglandinas, prostacclinas e tromboxanas, não atuando sobre o metabolismo dos leucotrienos. A aspirina, em doses baixas, tem sido utilizada com sucesso na prevenção de enfartes do miocárdio, por prevenir a formação de coágulos; este efeito é devido à inibição seletiva da síntese de tromboxanas, que estimulam a agregação de plaquetas, o passo inicial da coagulação sanguínea.

As prostaglandinas, os primeiros eicosanóides descobertos, por estimularem a contração uterina, têm sido empregadas para a indução do parto normal ou como agentes abortivos. Os leucotrienos são os mediadores de processos alérgicos agudos, como a reação anafilática e a asma, o que justifica a busca intensa de agentes terapêuticos capazes de controlar a sua síntese.

16.7 SÍNTESE DE TRIACILGLICERÓIS

Os precursores dos triacilgliceróis são glicerol 3-fosfato e acil-CoA

Os triacilgliceróis são sintetizados a partir de acil-CoA derivadas de ácidos graxos e glicerol 3-fosfato. No tecido adiposo, o glicerol 3-fosfato é formado por redução de diidroxiacetona fosfato, obtida a partir de glicose,

que, portanto, é imprescindível para a síntese de triacilgliceróis. No fígado, existe uma via alternativa para obtenção de glicerol 3-fosfato: a fosforilação do glicerol, catalisada pela glicerol quinase.

O glicerol 3-fosfato é acilado em duas etapas, formando *fosfatidato* (*diacilglicerol 3-fosfato*), que, por hidrólise do grupo fosfato, origina *diacilglicerol*. Estes dois últimos compostos são intermediários também da síntese de fosfolipídios. O triacilglicerol é obtido por acilação do diacilglicerol (Fig. 16.13). Nos seres humanos, as enzimas que sintetizam triacilgliceróis estão ligadas ao retículo endoplasmático, na superfície voltada para o citossol.

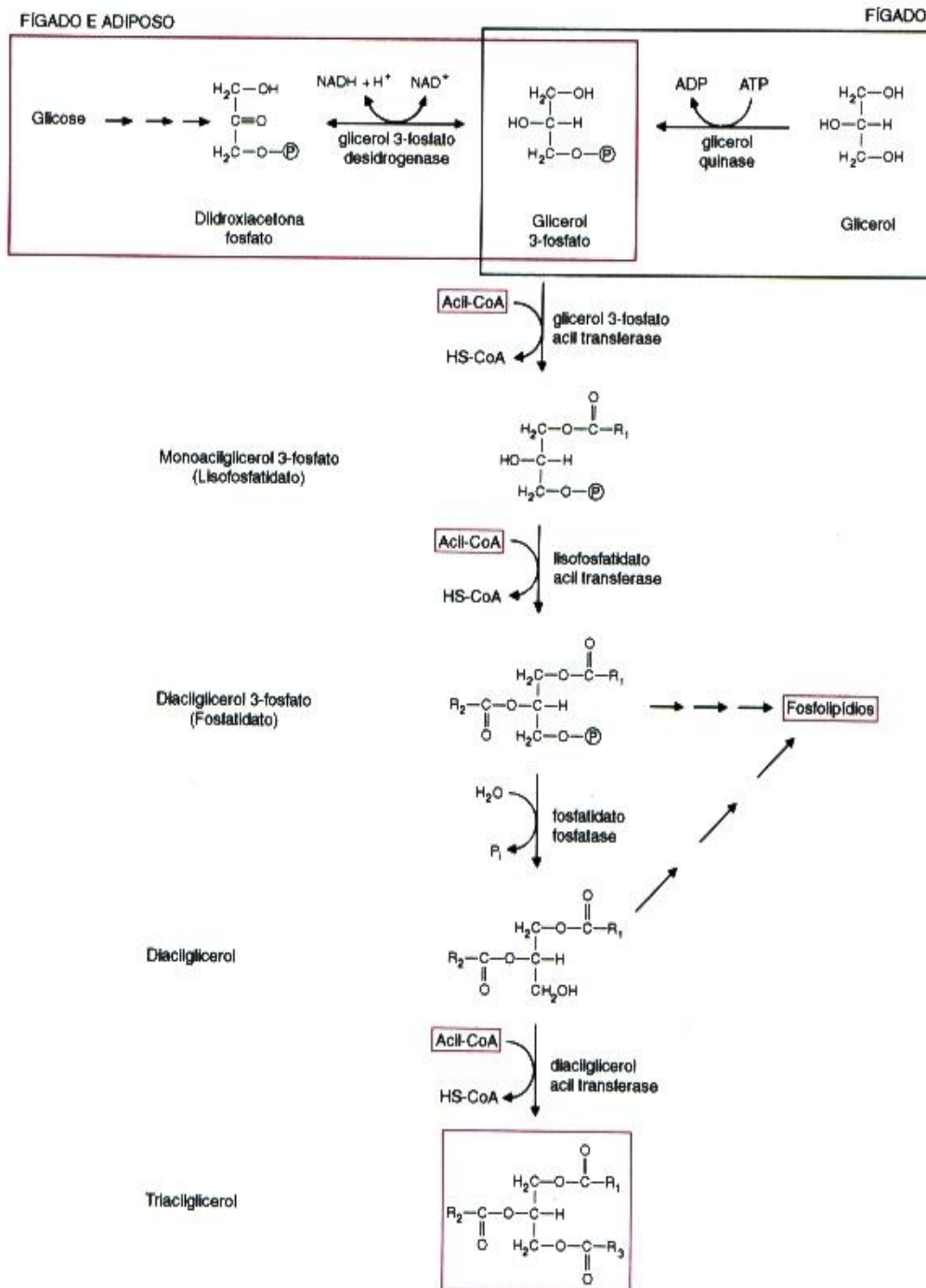


Fig. 16.13 Síntese de triacilgliceróis — o fosfatidato e o diacilglicerol são intermediários comuns à via de síntese de fosfolipídios.

O fígado e o tecido adiposo são “parceiros” no metabolismo de triacilgliceróis

A maioria dos tecidos dos seres humanos são capazes de converter ácidos graxos em triacilgliceróis, mas o fígado e o tecido adiposo são os principais responsáveis por essa conversão. Os triacilgliceróis sintetizados no fígado são, na maior parte, incorporados em lipoproteínas plasmáticas, encarregadas da distribuição de ácidos graxos aos tecidos extra-hepáticos, o adiposo inclusive. O tecido adiposo encarrega-se da síntese e armazenamento de triacilgliceróis — formados a partir de ácidos graxos da dieta, transportados pelos quilomícrons, ou a partir daqueles sintetizados pelo fígado — e, ainda, da sua hidrólise, liberando ácidos graxos para uso interno ou para exportação a outros órgãos. Os processos de armazenamento ou mobilização de triacilgliceróis ocorrem, obviamente, em condições fisiológicas antagônicas e estão sujeitos a mecanismos opostos de regulação. **A regulação completa destas vias encontra-se no Capítulo 20.**

Os fosfolípidios, necessários para a biossíntese de membranas, são sintetizados, praticamente, por todas as células.

16.8 METABOLISMO DO COLESTEROL

O colesterol do organismo humano pode ser obtido através dos alimentos ou por síntese endógena. Um indivíduo adulto saudável excreta cerca de 1 g de derivados de colesterol por dia, metade dos quais são repostos pela dieta e metade por biossíntese. Estas proporções, todavia, variam conforme o teor de colesterol na dieta (p. 294). Os principais órgãos responsáveis pela produção de colesterol são o fígado e o intestino, que produzem em torno de 25% do colesterol endógeno.

A acetil-CoA é precursora de todos os átomos de carbono presentes no colesterol (C_{27}), e o agente redutor é o mesmo da síntese de ácidos graxos, ou seja, NADPH. As enzimas que catalisam a síntese de colesterol localizam-se no citossol e no retículo endoplasmático. A via é composta por dezenas de reações, que não serão descritas na sua totalidade, mas, sim, agrupadas em etapas que evidenciam o esquema básico de “montagem” da molécula de colesterol: a acetil-CoA forma unidades de cinco carbonos, com estrutura semelhante ao isopreno (Fig. 16.14), que se polimerizam em um intermediário linear, que, após ciclização, origina o colesterol.

A síntese (Fig. 16.15a) inicia-se com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, produzindo acetoacetil-CoA; esta condensa-se com outra molécula de acetil-CoA, produzindo 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). As enzimas que catalisam estas reações são, respectivamente, *tiolase* e *hidroximetilglutaril-CoA sintase* (HMG-CoA sintase), ambas citossólicas. Nos hepatócitos, essas duas enzimas são encontradas também nas mitocôndrias, e a HMG-CoA formada é precursora dos *corpos cetônicos* (p. 201). A HMG-CoA é a seguir reduzida a *mevalonato*, à custa de 2 NADPH, numa reação catalisada pela *HMG-CoA redutase*, uma enzima ligada ao retículo endoplasmático. Esta é a reação limitante da síntese de colesterol: a atividade e a síntese da HMG-CoA redutase são controladas por vários fatores (p. 293).

O mevalonato (C_6) sofre duas fosforilações (Fig. 16.15b), que consomem 3 ATP, e uma descarboxilação, originando a unidade isoprenóide, o *isopentenil-pirofosfato* (C_5). Além do colesterol, outros compostos importantes apresentam estrutura formada por múltiplos de unidades isoprenóides, como as vitaminas A, E e K, os carotenóides, a borracha, a clorofila e a coenzima Q.

Um total de 6 moléculas de isopentenil-pirofosfato são consumidas para formar *esqualeno* (C_{30}), o último intermediário linear da via (Fig. 16.15c). A síntese de esqualeno processa-se através de reações de isomerização, condensação, redução por NADPH e eliminação de pirofosfato.

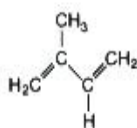


Fig. 16.14 Molécula de isopreno.

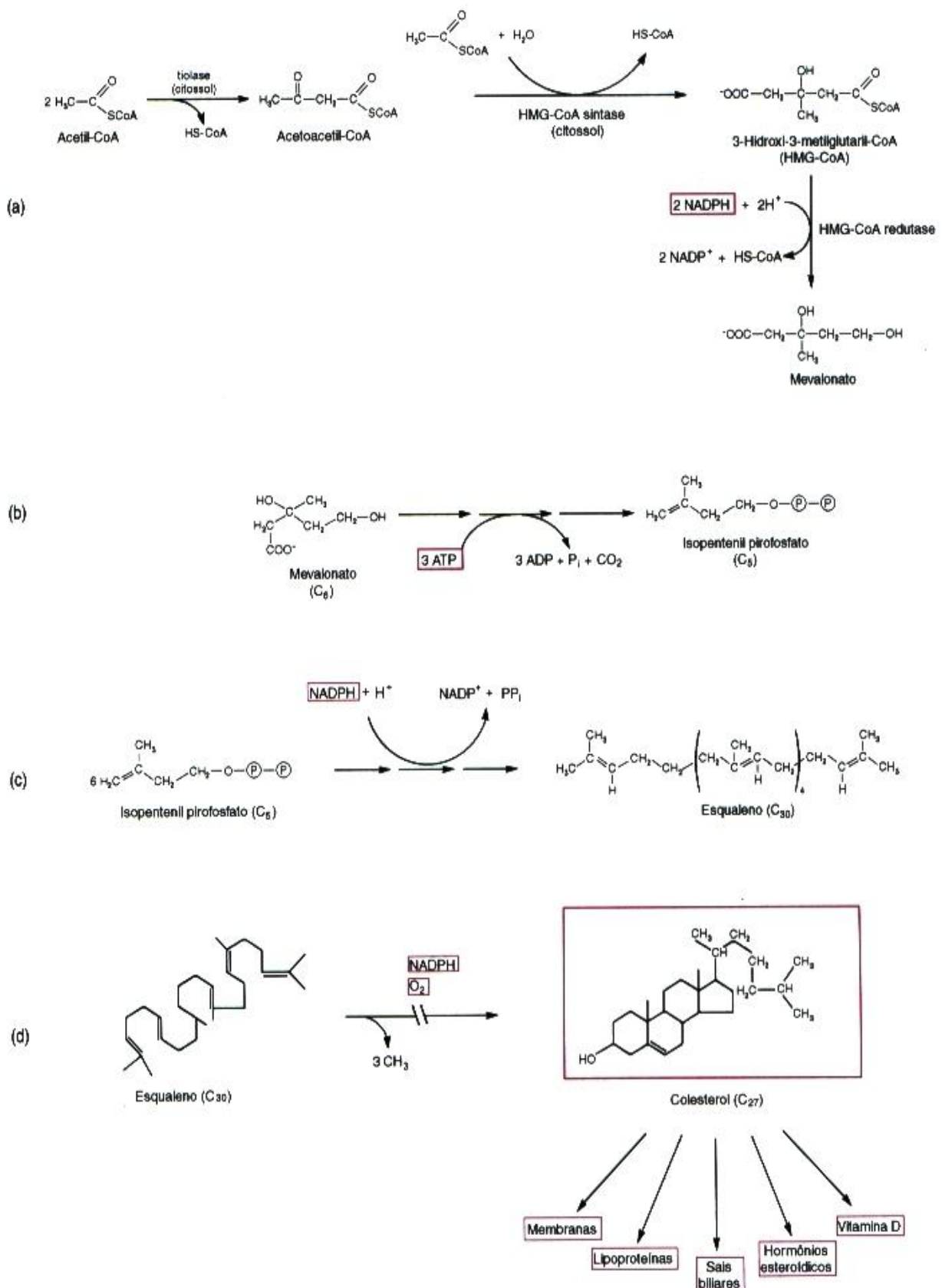


Fig. 16.15 Etapas da síntese de colesterol. a) A condensação de 3 moléculas de acetil-CoA produz HMG-CoA, que é reduzida a mevalonato. b) Mevalonato (C_6) é convertido na unidade isoprenóide, o isopentenil-pirofosfato (C_5), através de fosforilação à custa de ATP e descarboxilação. c) Seis unidades isoprenóides formam o esqualeno, um composto linear de 30 carbonos, à custa de redução por NADPH e produção de PP_i . d) A conversão de esqualeno em colesterol (C_{27}) envolve a ciclização de esqualeno, através de vários passos que incluem a perda de 3 grupos metil e o consumo de NADPH e O_2 .

A etapa final (Fig. 16.15d) consiste na ciclização do esqualeno, através de reações complexas, muitas das quais ainda mal compreendidas. São mais de 20 reações, incluindo consumo de O_2 e NADPH, remoção de grupos metila e migração de duplas ligações, que levam, finalmente, à produção de colesterol.

A síntese de colesterol trata-se, portanto, de uma síntese redutiva, que ocorre com grande consumo de energia: para cada molécula produzida são gastos 18 ATP e dezenas de NADPH.

O colesterol, apesar de ser tão temido, é indispensável ao organismo humano

O colesterol, além de ser um componente estrutural de membranas, é precursor dos ácidos biliares, hormônios esteróides e vitamina D. A despeito de desempenhar funções vitais, o colesterol tem sido considerado um “inimigo” da saúde, devido à correlação existente entre níveis plasmáticos aumentados de colesterol e ocorrência de aterosclerose. *Este assunto será abordado junto à regulação do metabolismo do colesterol (Capítulo 20).*

Os ácidos biliares são esteróides di- ou triidroxilados, sintetizados no fígado a partir de colesterol, através de diversas reações que consomem NADPH, O_2 , acetyl-CoA e ATP. Nos seres humanos, os principais ácidos biliares formados são os ácidos cólico e quenodesoxicólico. Os ácidos biliares são estocados na vesícula biliar e, como o pH da bile é alcalino, ocorrem predominantemente na forma desprotonada, do que resulta a denominação mais apropriada de *sais biliares*. Estes compostos estão presentes, na sua maior parte, associados a glicina e a taurina por ligação amídica (Fig. 16.16). A bile apresenta, ainda, alta concentração de colesterol, que pode levar à formação de cálculos relativamente insolúveis em água, como acontece em determinados distúrbios crônicos do metabolismo de lipídios.

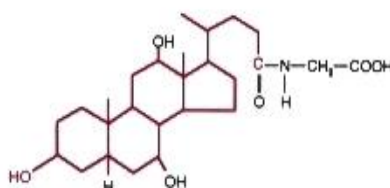


Fig. 16.16 Estrutura do glicocolato, um dos principais sais biliares.

Os sais biliares são secretados no duodeno, onde têm papel fundamental na digestão de lipídios: por suas propriedades anfifílicas, são responsáveis pela emulsificação e solubilização dos lipídios e vitaminas lipossolúveis, facilitando sua digestão e absorção.

A maior parte dos sais biliares é reabsorvida na porção inferior do intestino delgado e retorna ao fígado, para novos ciclos de secreção. A parte restante é excretada nas fezes, depois de parcialmente degradada pelas bactérias intestinais. No organismo humano, o anel esteróide não pode ser degradado a CO_2 e H_2O , de modo que a formação de sais biliares é a via de excreção do colesterol. A inibição da reabsorção dos sais biliares aumenta a conversão de colesterol em sais biliares; este é o princípio de ação de algumas drogas utilizadas clinicamente para reduzir o nível de colesterol plasmático (p. 294).

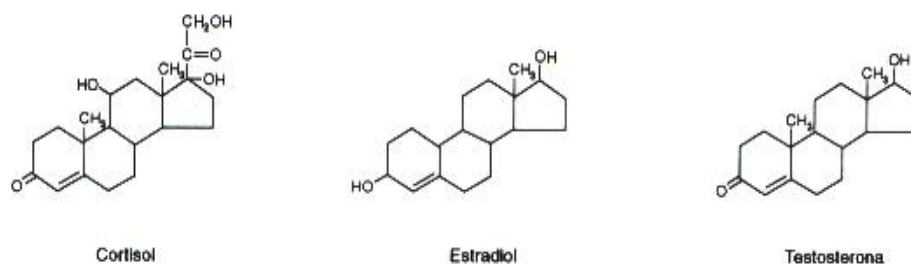


Fig. 16.17 Estrutura de três hormônios esteróides. Notar a semelhança estrutural entre o estradiol (hormônio feminino) e a testosterona (hormônio masculino).

Os principais hormônios esteróidicos (Fig. 16.17) são os *corticosteróides*, produzidos no córtex da supra-renal, e os *hormônios sexuais*, produzidos nas gônadas.

Os corticosteróides regulam o metabolismo de proteínas, carboidratos e eletrólitos. O *cortisol (hidrocortisona)* e seus derivados são largamente utilizados como agentes antiinflamatórios, por inibirem a síntese de eicosanóides.

Os hormônios sexuais incluem a *testosterona*, o hormônio masculino, e os *estrógenos* e as *progestinas*, os hormônios femininos. Os hormônios sexuais controlam a diferenciação dos órgãos sexuais e das características sexuais secundárias. Atualmente, derivados sintéticos desses hormônios têm tido várias aplicações clínicas, que vão desde a contracepção, até a reposição de estrógenos na pós-menopausa. Uma prática comum, mas condenável, é a utilização de derivados de hormônios sexuais masculinos, os chamados *esteróides anabolizantes*, para aprimorar o desempenho físico de atletas. Esses esteróides estimulam processos anabólicos, inclusive a produção de músculos, mas acarretam, adicionalmente, sérios problemas ao organismo, como disfunção hepática e cardíaca, impotência etc.

17

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

As proteínas, como os demais compostos constituintes de um organismo, não são permanentes, estando em contínua degradação e síntese. Estima-se que, em um ser humano adulto com uma dieta adequada, haja uma renovação (*turnover*) de aproximadamente 400 g de proteínas por dia. Em um determinado instante deste período, proteínas diferentes estão sendo degradadas e outras tantas estão sendo sintetizadas, já que a meia-vida das proteínas apresenta uma enorme variação (Quadro 17.1). Pouco se sabe ainda sobre os mecanismos que determinam velocidades diferentes de degradação para cada proteína. De qualquer modo, a manutenção da concentração de uma determinada proteína é obtida pela síntese desta proteína em uma velocidade equivalente à de sua degradação e, embora existam flutuações de concentração em tempos muito curtos, em tempos maiores a concentração proteica geral mantém-se constante no indivíduo adulto e hígido.

Uma consequência importante do *turnover* proteico é restar **sempre** uma certa quantidade de aminoácidos não utilizados, porque o conjunto de aminoácidos originado das proteínas que estão sendo degradadas **nunca** é igual ao conjunto de aminoácidos necessários para compor as proteínas que estão sendo sintetizadas. Tendo em vista que não há meios de armazenar os aminoácidos excedentes, eles são oxidados e seu nitrogênio, excretado. Assim, um indivíduo adulto saudável, com uma dieta adequada, elimina por dia uma quantidade

Quadro 17.1 Meia-vida de proteínas

Proteína	Meia-vida ¹ (dias)
Hemoglobina falciforme	12 minutos
Ornitina descarboxilase	12 minutos
HMG-CoA redutase	3 horas
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	5 horas
Glicoquinase	1,25
Acetil-CoA carboxilase	2
Alanina transaminase	2,5
Arginase	4
Aldolase	5
Citocromo b	5,4
Lactato desidrogenase	6
Citocromo c	6,3
Hemoglobina	120

¹Meia-vida de uma proteína é o tempo após o qual metade das moléculas é degradada. Proteínas defectivas e enzimas reguladoras têm, em geral, meia-vida muito curta.

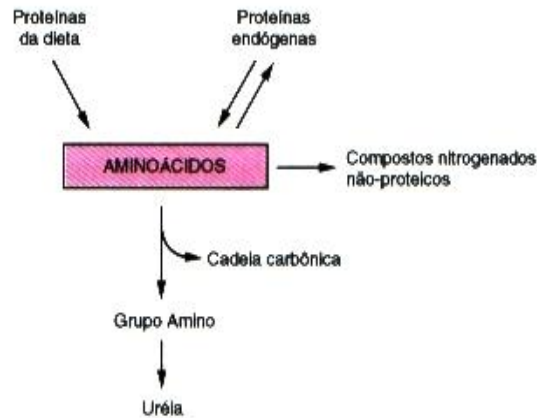


Fig. 17.1 A degradação das proteínas endógenas e da dieta originam o *pool* de aminoácidos, precursores das proteínas endógenas e de todos os outros compostos nitrogenados. Os aminoácidos excedentes são degradados, restando as respectivas cadeias carbônicas e o grupo amina, que é convertido em uréia.

de nitrogênio correspondente a 100 g de proteína aproximadamente. Como 400 g de proteínas devem ser renovados neste período, faltam os 100 g eliminados, que devem ser repostos pela alimentação (Capítulo 18).

Os aminoácidos presentes nas células animais originam-se, então, das proteínas da dieta (exógenas) e das proteínas endógenas e constituem um *pool*, 1/4 do qual é derivado da primeira procedência e os 3/4 restantes, da segunda. O *pool* de aminoácidos é utilizado para a síntese de proteínas endógenas e de outras moléculas que contenham nitrogênio. Com efeito, os aminoácidos são precursores de todos os compostos nitrogenados não-proteicos, que incluem as bases nitrogenadas constituintes dos nucleotídeos (componentes dos ácidos nucleicos e coenzimas) e as aminas e seus derivados, como adrenalina, ácido γ -aminobutírico, histamina etc. (Fig. 17.1).

Os seres vivos não são capazes de armazenar aminoácidos nem proteínas, e, conseqüentemente, satisfeitas as necessidades de síntese, os aminoácidos excedentes são degradados. Em um indivíduo adulto saudável, com uma dieta adequada, a oxidação de aminoácidos responde por 10-15% de suas necessidades energéticas (Capítulo 18).

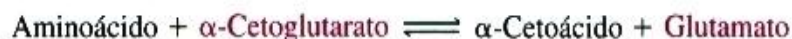
17.1 DEGRADAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

A degradação dos aminoácidos compreende a remoção e a excreção do grupo amina e a oxidação da cadeia carbônica remanescente (α -cetoácido). O grupo amina é convertido a uréia e as 20 cadeias carbônicas resultantes são convertidas a compostos comuns ao metabolismo de carboidratos e lipídios, ou seja, *piruvato*, *acetil-CoA* e *intermediários do ciclo de Krebs*.

17.1.1 REMOÇÃO DO GRUPO AMINO DOS AMINOÁCIDOS

O grupo amina da maioria dos aminoácidos é coletado inicialmente como glutamato

O grupo amina da maioria dos aminoácidos — alanina, arginina, aspartato, asparagina, cisteína, fenilalanina, glutamina, isoleucina, leucina, tirosina, triptofano e valina — é retirado por um processo comum, que consiste na transferência deste grupo para o α -cetoglutarato, formando glutamato; a cadeia carbônica do aminoácido é convertida ao α -cetoácido correspondente:



Estas reações são catalisadas por *aminotransferases*, também chamadas *transaminases*, enzimas presentes no citossol e na mitocôndria e que têm como coenzima *piridoxal-fosfato* (Fig. 17.2). Esta coenzima é derivada da vitamina B₆, que pode ser encontrada na natureza sob três formas: piridoxina, piridoxal e piridoxamina.

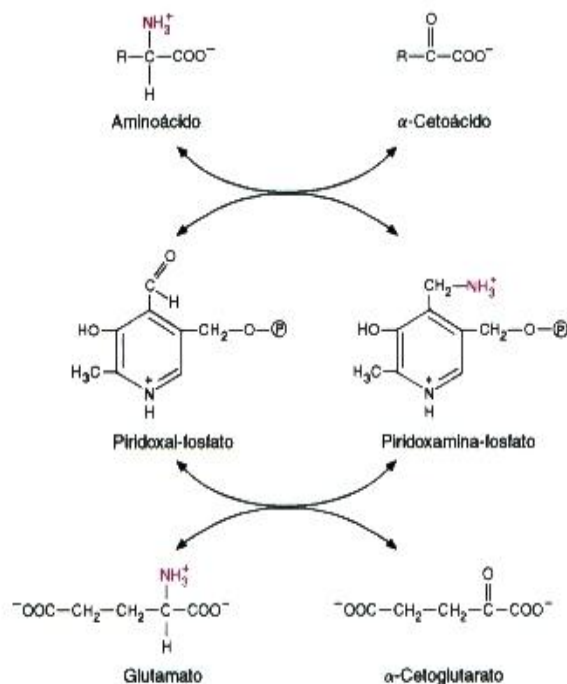
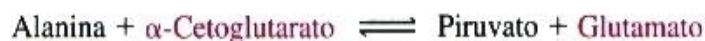


Fig. 17.2 Reação geral de transaminação. Inicialmente, o grupo amino de um aminoácido é transferido ao piridoxal fosfato, que é convertido a piridoxamina fosfato; a seguir é doado ao α -cetoglutarato, produzindo glutamato.

As aminotransferases da maioria dos tecidos de mamíferos sempre utilizam α -cetoglutarato como aceptor do grupo amino, formando glutamato. O nome da aminotransferase deriva do aminoácido doador do grupo amino para o α -cetoglutarato, como, por exemplo, a *alanina aminotransferase* (ou *alanina transaminase*):

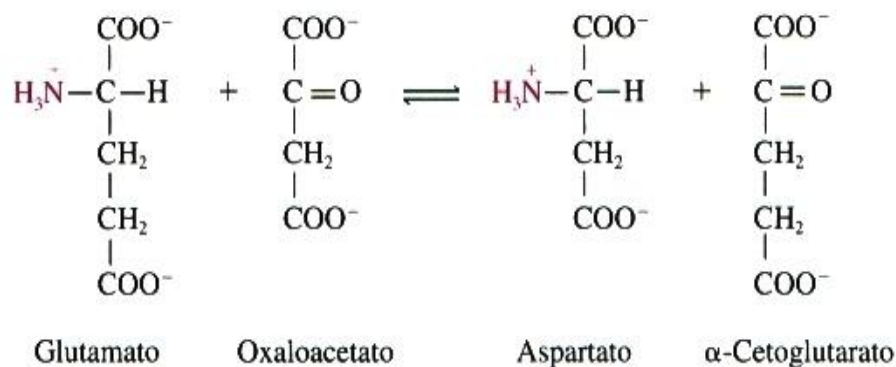


O glutamato é, portanto, um produto comum às reações de transaminação, constituindo um reservatório temporário de grupos amino, provenientes de diferentes aminoácidos.

Em uma segunda etapa, os grupos amino originam aspartato e/ou amônia

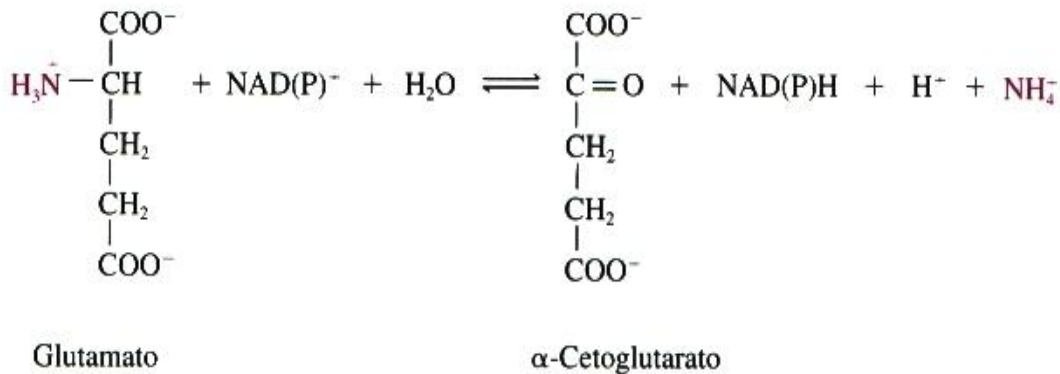
O glutamato formado é consumido em duas reações importantes: uma nova transaminação e uma desaminação.

A remoção do grupo amino do próprio glutamato por transaminação é possível porque as reações catalisadas pelas aminotransferases são facilmente reversíveis, pois têm constante de equilíbrio próxima de 1. Por ação da *aspartato aminotransferase*, o grupo amino do glutamato é transferido para o oxaloacetato, formando aspartato, o segundo depositário do grupo amino dos aminoácidos:



Esta enzima é a aminotransferase mais ativa na maioria dos tecidos de mamíferos, evidenciando a importância da transaminação entre glutamato e aspartato.

O glutamato pode também ser desaminado, ou seja, o grupo amino (originário de diversos aminoácidos) pode ser liberado como amônia — íon NH_4^+ em pH fisiológico. Esta reação é catalisada pela *glutamato desidrogenase*, uma enzima mitocondrial, encontrada principalmente no fígado, que é um exemplo raro de enzima que utiliza NAD^- ou NADP^+ como coenzima:



A glutamato desidrogenase é específica para glutamato, e não se conhecem desidrogenases análogas para qualquer outro aminoácido.

A ação combinada das aminotransferases e da glutamato desidrogenase (Fig. 17.3) resulta na convergência do grupo amino da maioria dos aminoácidos para dois compostos únicos: NH_4^+ e aspartato.

Alguns aminoácidos são desaminados por reações especiais

Há sete aminoácidos — glicina, histidina, lisina, metionina, prolina, serina e treonina — que não participam de reações de transaminação. As vias de degradação destes aminoácidos, ao contrário dos outros doze, não se iniciam, portanto, com transaminação com α -cetoglutarato e seu grupo amino é removido por reações particulares a cada um deles. Entretanto, um aspecto comum e importante do metabolismo destes aminoácidos é a forma de remoção do grupo amino: ao longo das vias de degradação (p. 223), o grupo amino ou é liberado como NH_4^+ por reações de desaminação, ou forma glutamato através de transaminação de um intermediário aminado com α -cetoglutarato. Desta forma, os átomos de nitrogênio deste conjunto de aminoácidos convergem para os

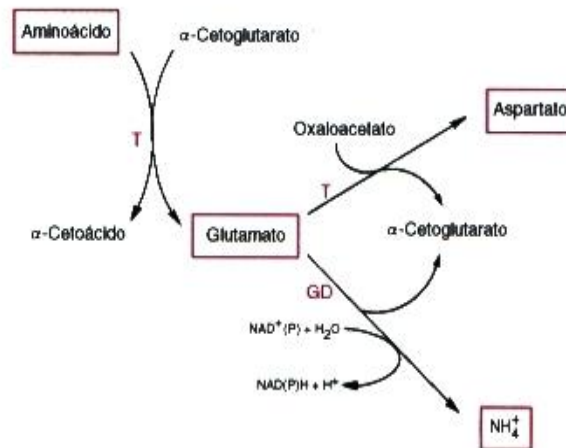


Fig. 17.3 A ação conjunta das transaminases (T) e da glutamato desidrogenase (GD) permite canalizar o nitrogênio da maioria dos aminoácidos para aspartato e NH_4^+ .

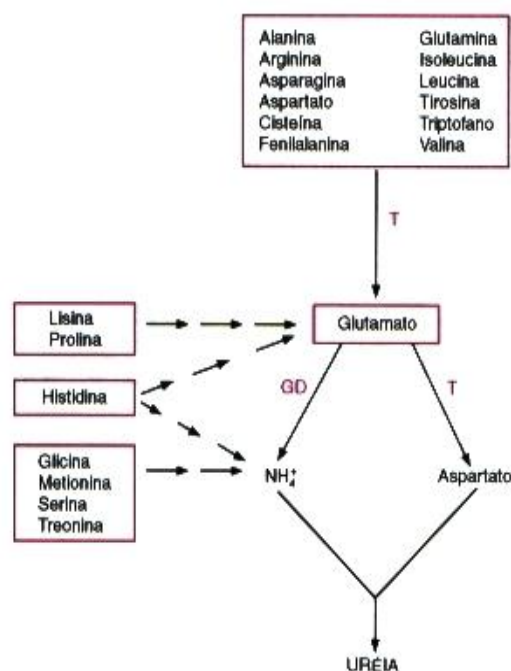


Fig. 17.4 Conversão do grupo amino dos aminoácidos em uréia: o grupo amino de 12 aminoácidos é coletado como glutamato, que origina NH_4^+ e aspartato por uma via comum catalisada por transaminase (T) e glutamato desidrogenase (GD); outros 7 aminoácidos originam NH_4^+ e glutamato por vias especiais. O esquema mostra o papel central do glutamato no caminho do nitrogênio dos aminoácidos até uréia.

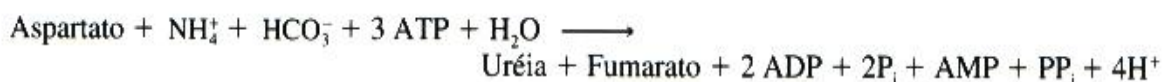
mesmos produtos originados pelo grupo amino dos outros aminoácidos: NH_4^+ e glutamato, que pode originar aspartato.

Concluindo, durante a degradação dos vinte aminoácidos, o grupo amino é convertido finalmente em NH_4^+ e aspartato, os precursores da uréia (Fig. 17.4).

A uréia é sintetizada a partir de NH_4^+ , aspartato e HCO_3^-

Os dois átomos de nitrogênio presentes na uréia são provenientes de NH_4^+ e aspartato, e o átomo de carbono, do bicarbonato. A síntese de uréia é feita no fígado, através do *ciclo da uréia* ou *ciclo de Krebs-Henseleit* (Fig. 17.5). A síntese inicia-se na matriz mitocondrial, com a formação de carbamoil-fosfato a partir de íons bicarbonato e amônio, com gasto de duas moléculas de ATP. O carbamoil-fosfato condensa-se com ornitina, formando citrulina, que é transportada para o citossol, onde reage com aspartato, formando argininossuccinato, que se decompõe em arginina e fumarato. A arginina é hidrolisada, regenerando ornitina e produzindo uréia, que é transportada para o rim e eliminada pela urina.

A soma das reações de formação de carbamoil-fosfato e do ciclo da uréia mostra a equação final da síntese de uréia a partir de NH_4^+ , aspartato e HCO_3^- :



A síntese de uma molécula de uréia consome, portanto, quatro ligações fosfato ricas em energia, uma vez que o pirofosfato é prontamente hidrolisado. Todavia, o aspartato consumido no ciclo da uréia pode ser regenerado pelo fumarato formado nesta via. O fumarato pode ser convertido a oxaloacetato, por reações análogas às do ciclo de Krebs; as enzimas envolvidas são, entretanto, citossólicas. O oxaloacetato, por transaminação, forma aspartato (Fig. 17.6). Considerando-se este acoplamento, há produção, pela malato desidrogenase, de

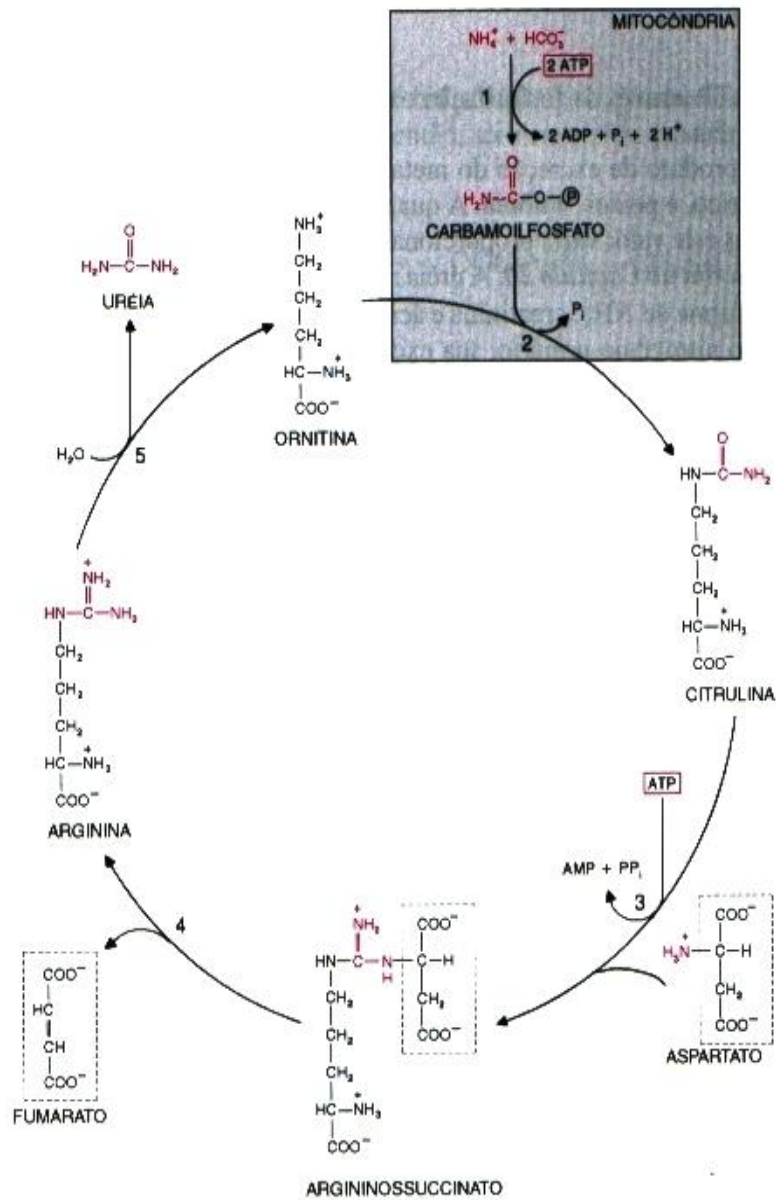


Fig. 17.5 Ciclo da uréia — as enzimas envolvidas são: carbamoilfosfato sintetase (1), ornitina transcarbamoilase (2), argininosuccinato sintetase (3), argininosuccinato liase (4) e arginase (5). As duas primeiras enzimas são mitocondriais, e as restantes, citoplasmáticas.

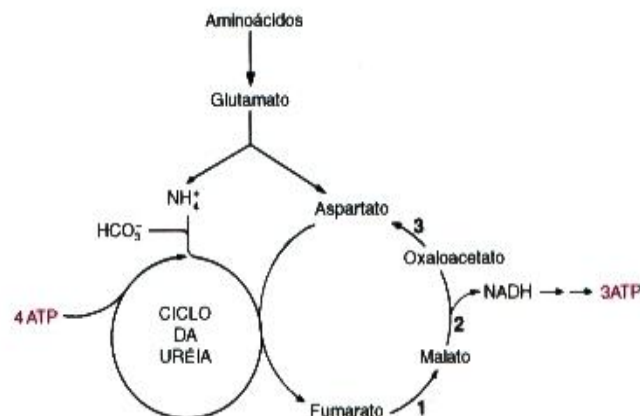


Fig. 17.6 Esquema geral da síntese de uréia, mostrando o balanço energético do processo — a regeneração do aspartato a partir de fumarato formado no ciclo da uréia envolve a participação das seguintes enzimas citossólicas: fumarase (1), malato desidrogenase (2) e transaminase (3); forma-se um NADH que produz 3 ATP através da fosforilação oxidativa, reduzindo a energia consumida na síntese da uréia.

1 NADH, que forma 3 ATP através da fosforilação oxidativa, reduzindo para uma ligação rica em energia o consumo da síntese de uréia.

A uréia é o principal produto de excreção do metabolismo nitrogenado de vertebrados terrestres; aves e répteis excretam ácido úrico, e peixes, amônia. A quantidade de uréia excretada por um ser humano adulto é cerca de 30 g por dia, mas este valor varia proporcionalmente à quantidade de proteína ingerida. **A regulação do ciclo da uréia está descrita no Capítulo 20.** A uréia representa 90% dos compostos nitrogenados excretados; o restante aparece sob a forma de NH_4^+ , creatinina e ácido úrico (Quadro 17.2). Apesar de NH_4^+ constituir uma pequena porcentagem do nitrogênio urinário, sua excreção possibilita a eliminação de H^+ , contribuindo de maneira decisiva para a manutenção do equilíbrio ácido-base: o conteúdo de NH_4^+ da urina aumenta na acidose e diminui na alcalose.

Quadro 17.2 Compostos nitrogenados excretados pelo homem

Composto	Quantidade excretada (g/dia)
Uréia	30
NH_4^+	0,7
Creatinina	1,4
Ácido úrico	0,8

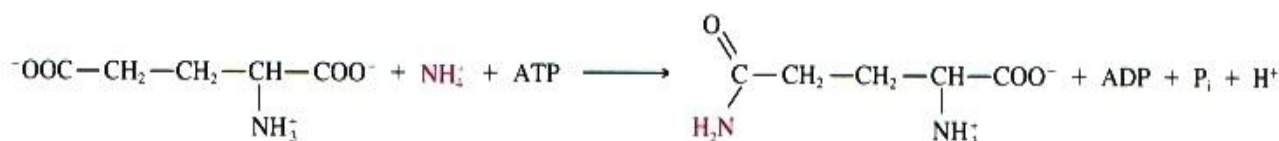
A amônia é tóxica para os tecidos animais, especialmente para o cérebro

A conversão da maior parte do NH_4^+ em uréia é fundamental para manter baixas as concentrações deste íon nos tecidos. Quando há uma restrição na formação de uréia por disfunção hepática grave — hepatite ou cirrose, por exemplo — a concentração de NH_4^+ se eleva, afetando principalmente o cérebro e podendo ocasionar coma. O mecanismo pelo qual o NH_4^+ exerce tal efeito tóxico não está completamente elucidado. Postula-se que altos níveis de NH_4^+ poderiam levar a grande consumo de α -cetoglutarato para a síntese de glutamato, na reação catalisada pela glutamato desidrogenase; haveria uma depleção do ciclo de Krebs com redução da velocidade de oxidação da glicose, a principal fonte de ATP para o cérebro.

Glutamina e alanina são os transportadores de amônia para o fígado

Como a amônia é tóxica e a sua conversão em uréia ocorre no fígado, o NH_4^+ produzido nos outros tecidos, para ser transportado ao fígado, é incorporado em compostos não-tóxicos e que atravessam membranas com facilidade: glutamina, na maioria dos tecidos extra-hepáticos, e alanina, no músculo.

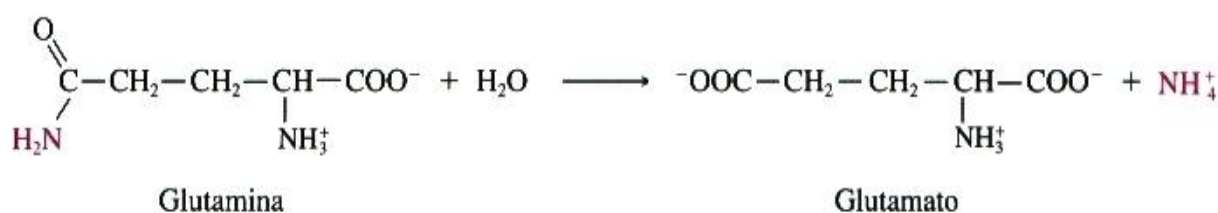
A glutamina é sintetizada a partir de NH_4^+ , glutamato e ATP, numa reação catalisada pela *glutamina sintetase*:



Glutamato

Glutamina

Uma vez no fígado, o grupo amida da glutamina é hidrolisado pela *glutaminase*, liberando NH_4^+ (neste contexto, oriundo dos tecidos periféricos), que pode, então, ser consumido pelo ciclo da uréia.



Adicionalmente, a presença de glutaminase no rim permite a excreção de NH_4^+ .

No músculo, a alanina, em lugar da glutamina, é o principal responsável pela exportação de grupos amino. Estes são transferidos para piruvato, originando alanina, que, após transporte até o fígado, é convertida em glutamato. O glutamato, como já descrito, pode originar os dois átomos de nitrogênio da uréia.

17.1.2 DEGRADAÇÃO DA CADEIA CARBÔNICA DOS AMINOÁCIDOS

A cadeia carbônica dos aminoácidos é degradada a piruvato, intermediários do ciclo de Krebs ou acetil-CoA

Removido o grupo amino do aminoácido, resta sua cadeia carbônica, na forma de α -cetoácido. As vinte cadeias carbônicas diferentes não têm uma via comum de degradação. Seu metabolismo difere, neste aspecto, do metabolismo dos ácidos graxos, todos degradados pelo ciclo de Lynen e dos açúcares, metabolizados pela glicólise.

Embora existam vias próprias para a oxidação da cadeia carbônica de cada aminoácido, estas diferentes vias de degradação convergem para a produção de apenas alguns compostos (Fig. 17.7): *piruvato*, *acetil-CoA* ou *intermediários do ciclo de Krebs* (*oxaloacetato*, *α -cetoglutarato*, *succinil-CoA* e *fumarato*). A partir deste ponto, o metabolismo da cadeia carbônica dos aminoácidos confunde-se com o das cadeias carbônicas de carboidratos ou de ácidos graxos.

O destino final dos α -cetoácidos, que dependerá do tecido e do estado fisiológico considerados, poderá ser: oxidação pelo ciclo de Krebs, fornecendo energia; utilização pela gliconeogênese, para a produção de glicose e conversão a triacilgliceróis e armazenamento.

A maioria dos aminoácidos produz piruvato ou intermediários do ciclo de Krebs, precursores da gliconeogênese, e são, por isso, chamados *glicogênicos*. A leucina origina corpos cetônicos, sendo o único aminoácido exclusivamente *cetogênico*. Alguns outros aminoácidos — isoleucina, fenilalanina, tirosina, treonina e triptofano — são tanto glicogênicos quanto cetogênicos, isto é, são *glicocetogênicos*.

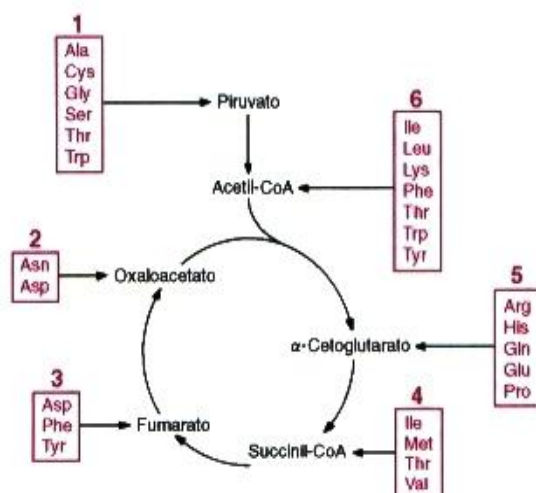


Fig. 17.7 Destino da cadeia carbônica dos aminoácidos, que foram repartidos em seis grupos (1 a 6), de acordo com o composto formado.

Para sistematizar o estudo de sua degradação, os aminoácidos serão agrupados em seis grupos, segundo o produto formado:

- | | |
|-----------------|----------------------------|
| 1. piruvato | 4. succinil-CoA |
| 2. oxaloacetato | 5. α -cetogluturato |
| 3. fumarato | 6. acetil-CoA |

Alguns aminoácidos estão incluídos em mais de um grupo ou porque apresentam vias de degradação alternativas, ou porque seu esqueleto de carbono divide-se, originando compostos diferentes. A descrição de cada grupo é precedida de seu esquema geral, mostrando o destino dos carbonos dos aminoácidos que o compõem, como, por exemplo, a Fig. 17.8, referente ao Grupo 1.

**Grupo 1. Aminoácidos que são convertidos a piruvato (Fig. 17.8):
Ala, Cys, Gly, Ser, Thr, Trp**

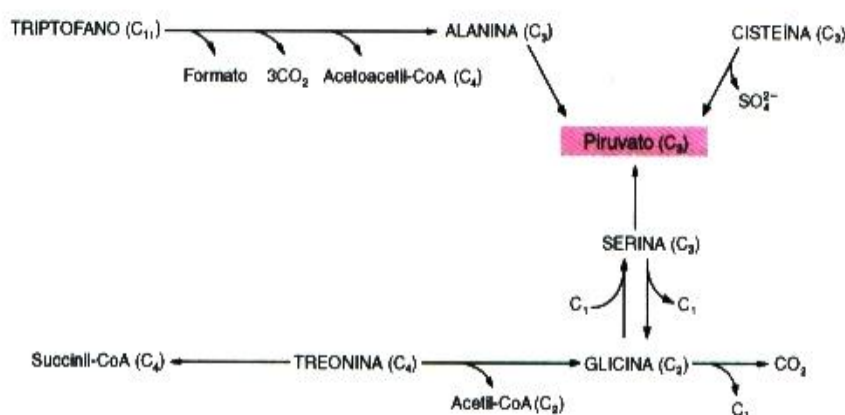


Fig. 17.8 Esquema da degradação do Grupo 1 de aminoácidos, convergindo para a produção de piruvato. C₁ representa a unidade de um carbono incorporado a FH₄.

Alanina. É convertida diretamente a piruvato por transaminação com α -cetogluturato, catalisada pela alanina transaminase.

Cisteína. Há duas vias que a convertem a piruvato (Fig. 17.9). O átomo de enxofre é transformado em sulfito, oxidado a sulfato pela *sulfito oxidase*. Esta enzima, presente entre as duas membranas da mitocôndria,

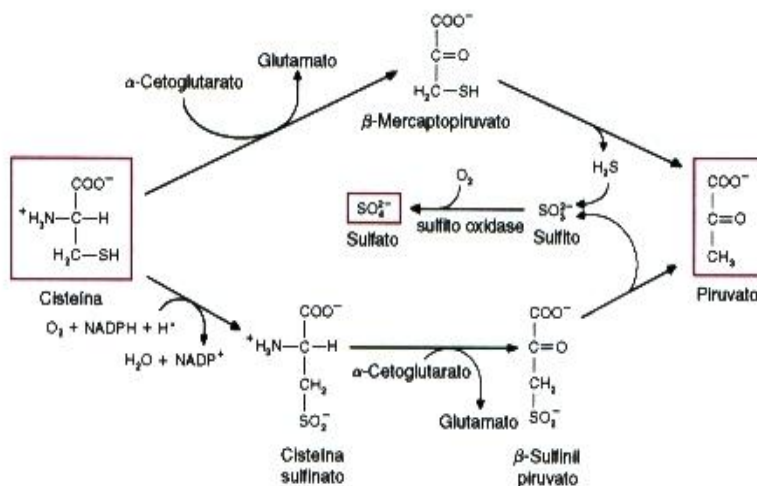


Fig. 17.9 A cisteína é convertida a piruvato por duas vias com produção de sulfito e sulfato.

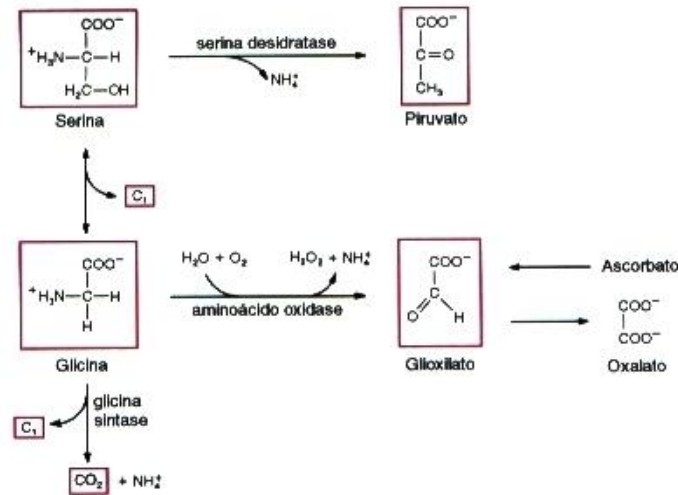


Fig. 17.10 Vias de degradação de serina e glicina. C_1 representa um carbono ligado a FH_4 .

dria, tem citocromo b_5 covalentemente ligado e transfere elétrons do sulfito para o citocromo c . O sulfato é a principal forma de excreção de enxofre nos seres humanos.

Glicina. Além de poder formar serina, pode ser oxidada a CO_2 , NH_4^+ e um grupo monocarbônico (C_1), que é transferido ao *tetraidrofolato* (FH_4); o tetraidrofolato é uma coenzima transportadora de unidades monocarbônicas, que apresenta, na sua estrutura, uma vitamina: o ácido fólico. O FH_4 é uma coenzima característica do metabolismo de aminoácidos e de nucleotídeos. A glicina pode, ainda, ser desaminada oxidativamente, formando glioxilato (Fig. 17.10). Nas *hiperoxalúrias*, doenças hereditárias raras, o glioxilato é oxidado a oxalato, que se acumula nos tecidos sob a forma de oxalato de cálcio. A ingestão de grandes quantidades de *ascorbato* (vitamina C) pode também ocasionar a formação de cálculos de oxalato de cálcio.

Serina. Pode formar piruvato por desaminação catalisada pela *serina desidratase* (Fig. 17.10) ou ser convertida a glicina por transferência do radical hidroximetil (C_1) ao FH_4 (p. 241).

Treonina. Em uma das vias de degradação possíveis, o carbono α é oxidado e a cadeia carbônica é cindida, produzindo glicina e acetaldéido; o acetaldéido é convertido a acetil-CoA (Fig. 17.11). A outra via de degradação origina succinil-CoA (Grupo 4, Fig. 17.18).

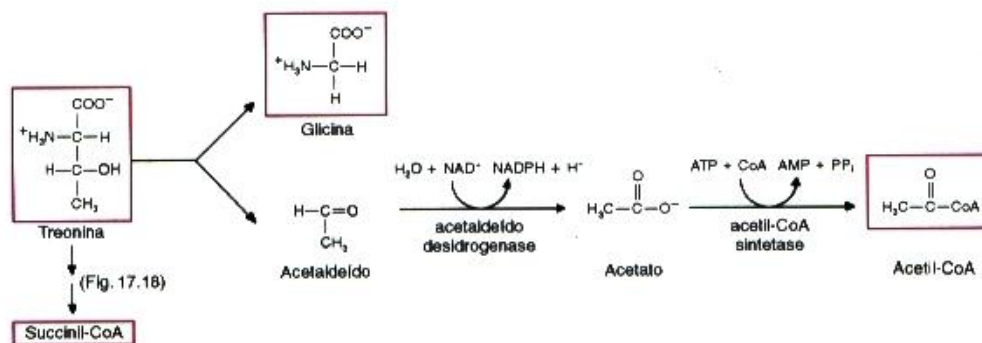


Fig. 17.11 Uma das vias de degradação de treonina, que produz glicina e acetil-CoA; a outra, que produz succinil-CoA, está mostrada na Fig. 17.18.

Triptofano. Na sua degradação, três carbonos são transformados em alanina, um em formato e quatro em acetoacetyl-CoA (Grupo 6).

Grupo 2. Aminoácidos que são convertidos a oxaloacetato (Fig. 17.12):

Asn, Asp

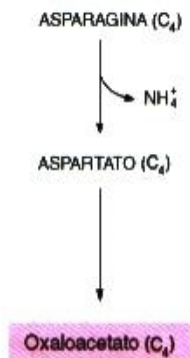


Fig. 17.12 Esquema da conversão do Grupo 2 de aminoácidos a oxaloacetato.

Asparagina. Por hidrólise, forma aspartato e NH_4^+ (Fig. 17.13).

Aspartato. Convertido a oxaloacetato por ação da aspartato transaminase (Fig. 17.13); forma também fumarato (Grupo 3).

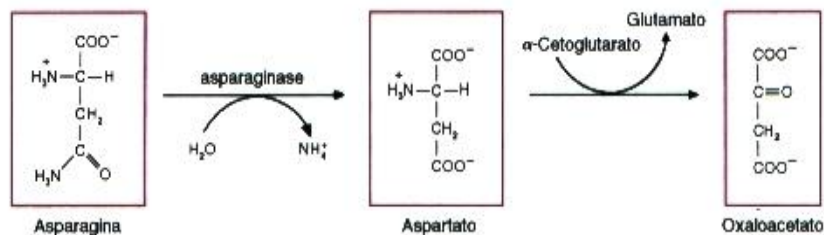


Fig. 17.13 Conversão de asparagina a aspartato, que produz oxaloacetato por transaminação.

Grupo 3. Aminoácidos que são convertidos a fumarato (Fig. 17.14):

Asp, Phe, Tyr

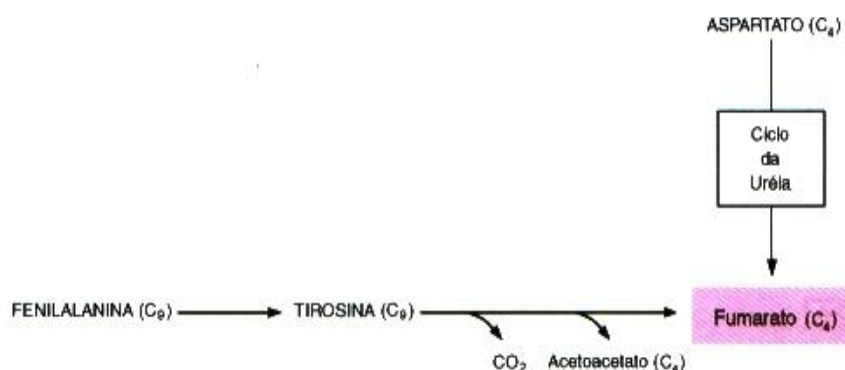


Fig. 17.14 Esquema da conversão do Grupo 3 de aminoácidos a fumarato.

Aspartato. É um dos substratos do ciclo da uréia, onde é convertido a fumarato (Fig. 17.5).

Fenilalanina. Convertida a tirosina por uma oxidação irreversível, catalisada por *fenilalanina hidroxilase* (Fig. 17.15).

Tirosina. Dos nove carbonos da tirosina, quatro são convertidos a fumarato, quatro a acetoacetato e um a CO₂ (Fig. 17.15).

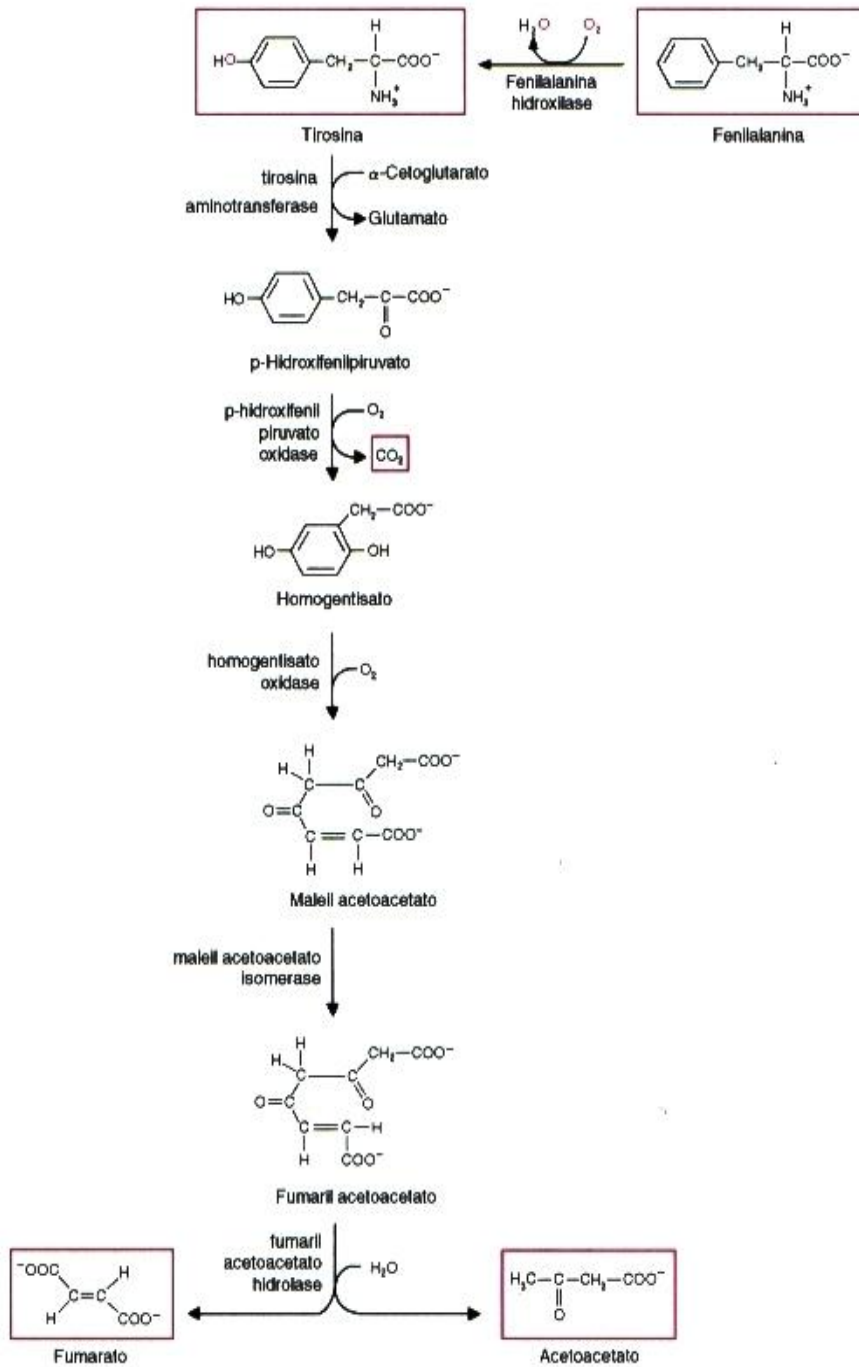


Fig. 17.15 Via de degradação de fenilalanina e tirosina.

**Grupo 4. Aminoácidos que são convertidos a succinil-CoA (Fig. 17.16):
Ile, Val, Met e Thr**

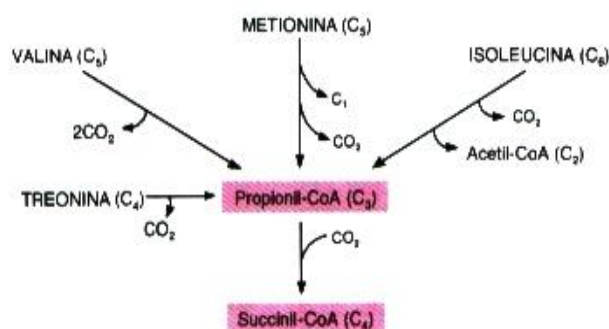


Fig. 17.16 Esquema da conversão do Grupo 4 de aminoácidos a succinil-CoA.

Os aminoácidos que produzem succinil-Coa são inicialmente convertidos a propionil-CoA, que também é produzida na oxidação de ácidos graxos com número ímpar de carbonos (p. 198). Fazem parte deste grupo dois aminoácidos (isoleucina e valina), que, conjuntamente com a leucina, são chamados de *aminoácidos ramificados*, devido à forma de suas cadeias laterais. Enquanto *isoleucina* e *valina* formam succinil-CoA, *leucina* forma acetoacetato e acetil-CoA (ver Grupo 6). Apesar do catabolismo dos três aminoácidos resultar em compostos diferentes, ele inicia-se com uma reação de transaminação catalisada por uma única enzima, formando os respectivos α -cetoácidos ramificados. Estes são descarboxilados oxidativamente por um complexo enzimático semelhante à piruvato desidrogenase, a *desidrogenase de α -cetoácidos ramificados*, que utiliza como coenzimas: tiamina pirofosfato, ácido lipóico, CoA, NAD e FAD. Resultam as respectivas acil-CoA ramificadas com um carbono a menos.

Isoleucina e valina. As acil-CoA derivadas de valina e isoleucina são oxidadas por reações semelhantes às da β -oxidação, que convertem valina a propionil-CoA e isoleucina a propionil-CoA e acetil-CoA (Fig. 17.17).

Metionina. Forma α -cetobutirato, que é oxidado a propionil-CoA, por um sistema semelhante à piruvato desidrogenase; nesta via, forma-se *S-adenosilmetionina*, que atua como doador de radicais *metil* para a síntese de compostos importantes, por exemplo, adrenalina (p. 270). O átomo de enxofre é doado para a serina, formando cisteína, o outro único aminoácido que contém enxofre (Fig. 17.18).

Treonina. Por desaminação catalisada pela treonina desidratase, produz também α -cetobutirato como a metionina (Fig. 17.18).

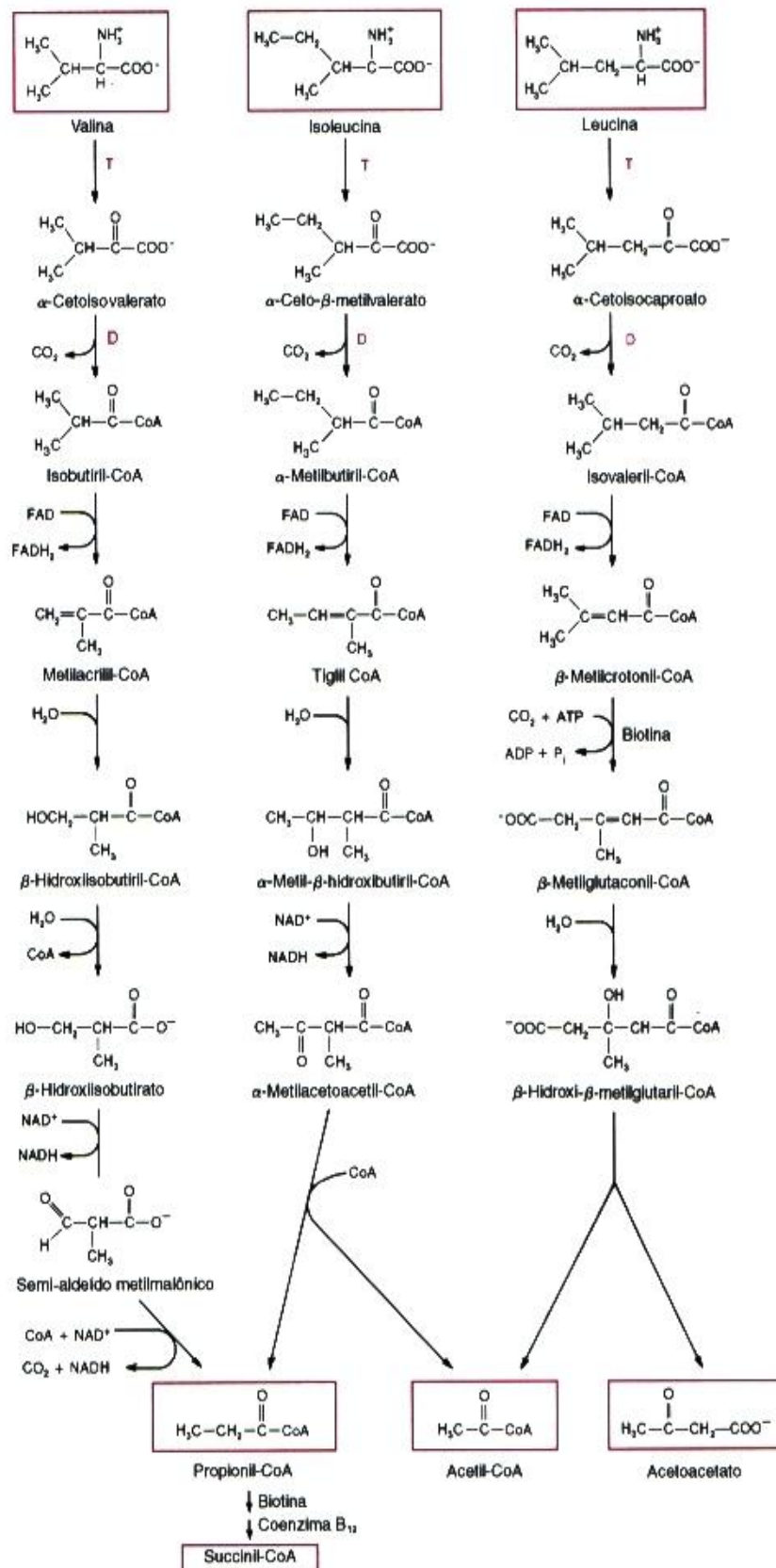


Fig. 17.17 Vias de degradação dos aminoácidos ramificados: valina, isoleucina e leucina. As respectivas acil-CoA ramificadas são produzidas por ação de duas enzimas: a transaminase de aminoácidos ramificados (T) e a desidrogenase de α -cetoácidos ramificados (D).

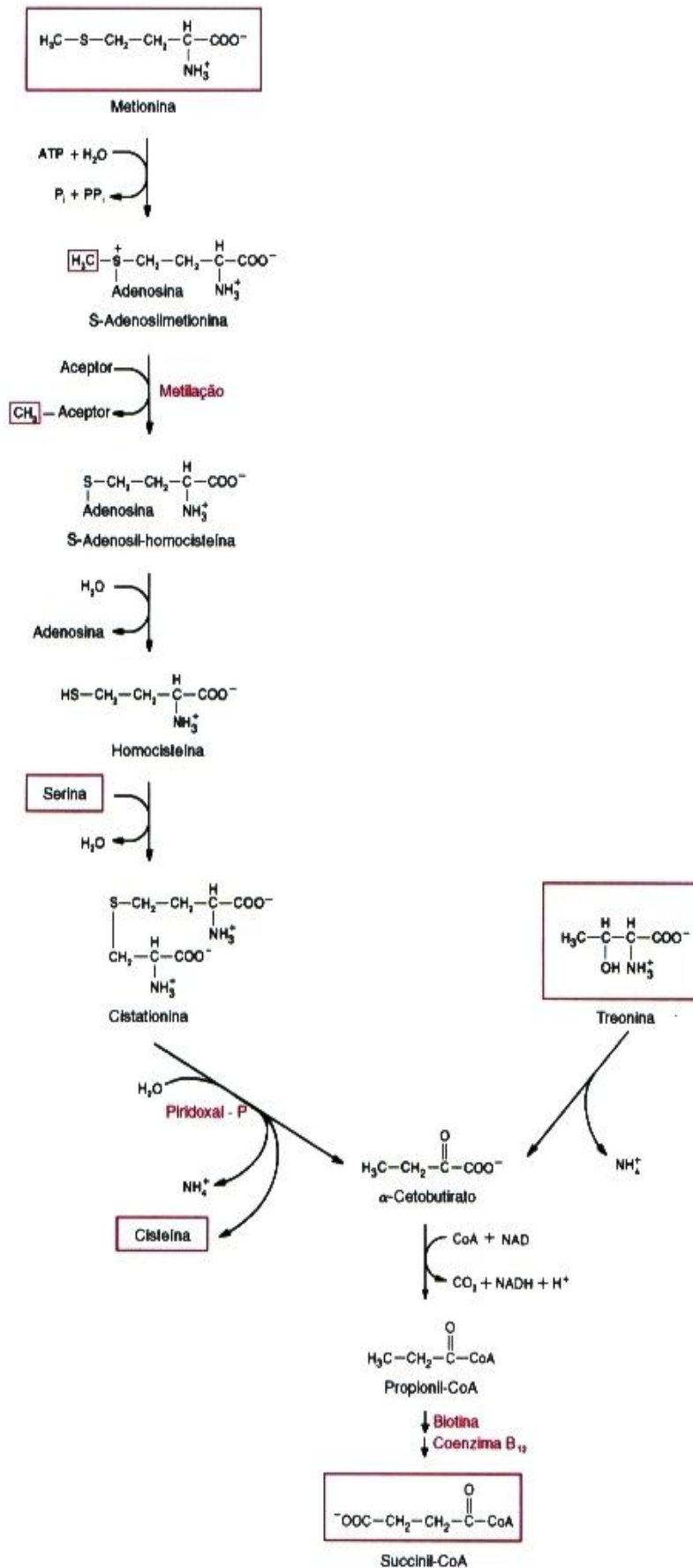


Fig. 17.18 Vias de degradação de metionina e treonina, produzindo succinil-CoA. A outra via de degradação de treonina está mostrada na Fig. 17.11. A degradação de metionina inclui a síntese de S-adenosilmetionina, um importante doador de radicais metil, e de cisteína, o outro aminoácido que contém enxofre.

**Grupo 5. Aminoácidos que são convertidos a α -cetogluturato (Fig. 17.19):
Glu, Gln, Pro, Arg, His**

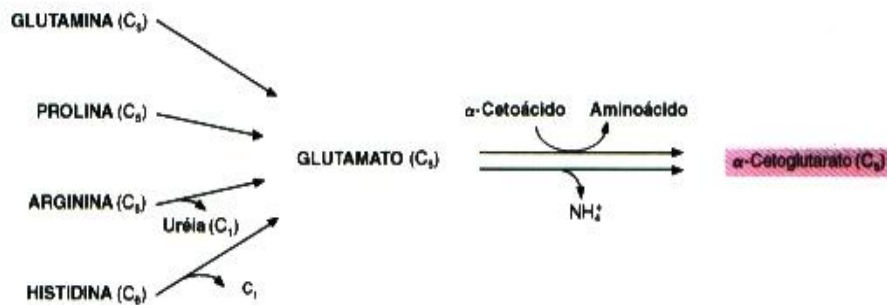


Fig. 17.19 Esquema da conversão do Grupo 5 de aminoácidos a α -cetogluturato, via glutamato. C_1 = unidade monocarbônica transferida a FH_4 .

Os aminoácidos deste grupo originam α -cetogluturato por prévia conversão a glutamato (Fig. 17.20).

Glutamato. Converte-se em α -cetogluturato por transaminação ou por desaminação oxidativa catalisada pela glutamato desidrogenase.

Glutamina. O grupo amino é liberado por ação da glutaminase, formando glutamato.

Prolina. Todos os átomos de carbono da prolina aparecem como glutamato.

Arginina. Ao ser hidrolisada pela arginase (ciclo da uréia), um dos carbonos aparece na uréia e os outros passam a constituir ornitina, que origina glutamato.

Histidina. Cinco carbonos produzem glutamato e um carbono é transferido ao tetraidrofolato.

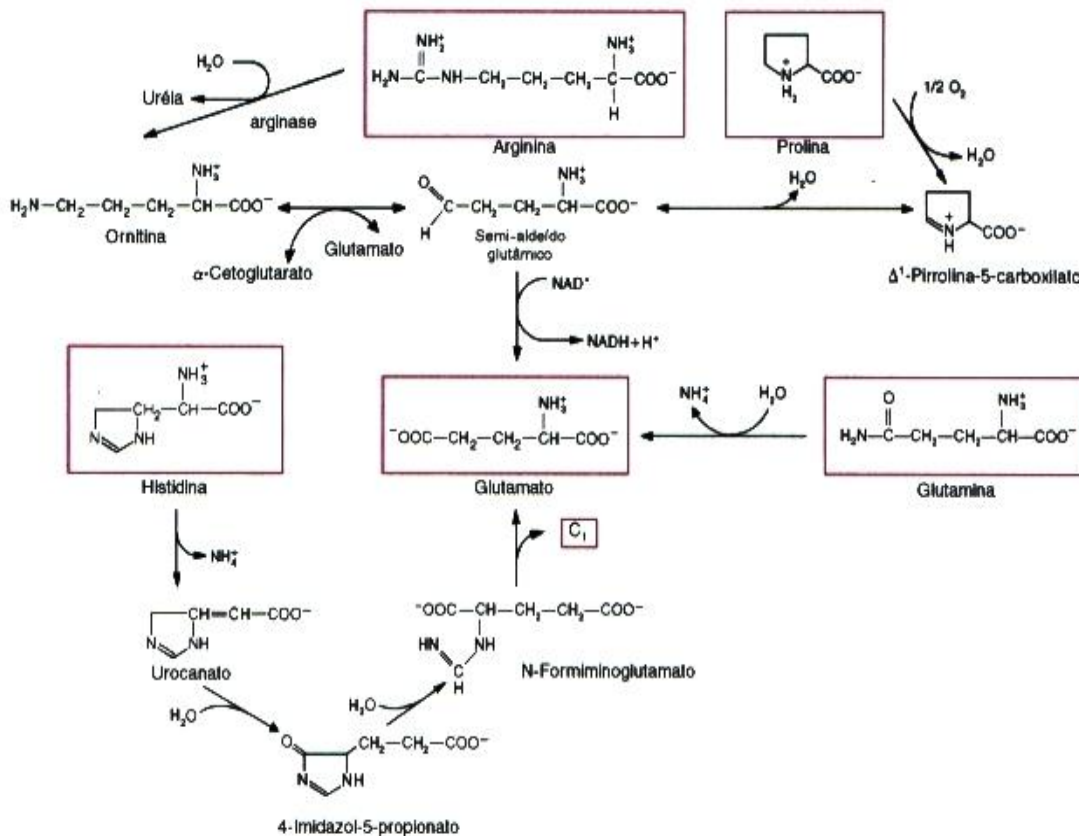


Fig. 17.20 Reações que convertem arginina, prolina, histidina e glutamina a glutamato. C_1 = unidade de um carbono ligada a FH_4 .

**Grupo 6. Aminoácidos que são convertidos a acetil-CoA (Fig. 17.21):
Phe, Tyr, Trp, Lys, Ile, Thr, Leu**

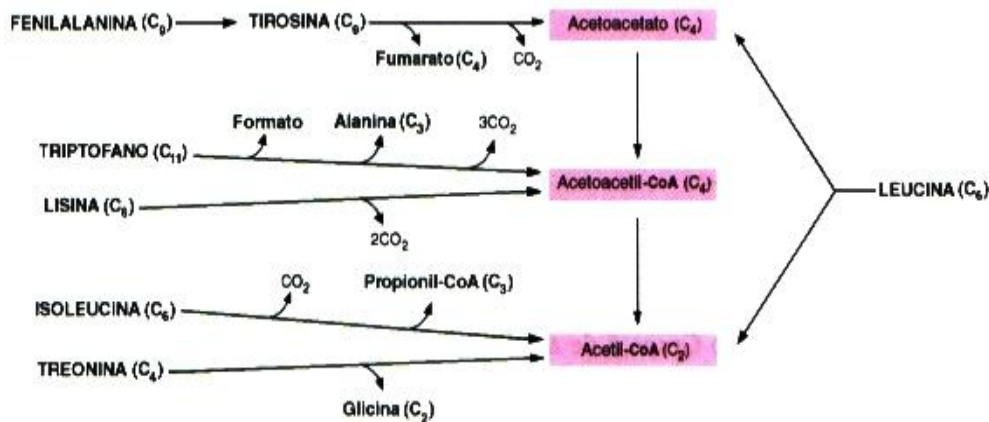


Fig. 17.21 Esquema geral da degradação do Grupo 6 de aminoácidos a acetil-CoA.

A formação de acetil-CoA pode ser direta ou indireta (através de acetoacetato ou acetoacetyl-CoA). Alguns dos aminoácidos que produzem acetil-CoA — fenilalanina, tirosina, triptofano, isoleucina e treonina — produzem também compostos precursores de glicose: são os aminoácidos *glicocetogênicos* (p. 223). Assim, quatro dos carbonos de fenilalanina e tirosina são convertidos a fumarato (Grupo 3), três do triptofano a alanina e três da isoleucina a propionil-CoA (Grupo 4); a treonina, por uma via alternativa, converte-se a succinil-CoA (Grupo 4). Segue-se a descrição da oxidação de leucina, lisina e triptofano.

Leucina. Sua via de degradação tem passos iniciais comuns à dos outros aminoácidos ramificados, valina e isoleucina (ver Grupo 4 e Fig. 17.17), mas os produtos finais são exclusivamente acetoacetato e acetil-CoA. A acil-CoA formada a partir de leucina é transformada, através de reações que incluem uma carboxilação por *biotina*, em *3-hidroxi 3-metilglutaril-CoA*. Este composto, que participa da via de síntese de corpos cetônicos (p. 201), é clivado a acetil-CoA e acetoacetato. Deste modo, a leucina é o único aminoácido *cetogênico*.

Lisina. Forma acetoacetyl-CoA através de 2-cetoadipato, como o triptofano. A lisina tem um grupo ϵ -amino que não pode ser removido por transaminação; a via de degradação predominante em mamíferos inicia-se com ligação do grupo ϵ -amino a α -cetoglutarato, formando um composto de adição, a sacaropina. Esta é clivada, liberando glutamato e 2-aminoadipato que, após transaminação, origina 2-cetoadipato (Fig. 17.22). Como quatro átomos de carbono da lisina originam acetoacetyl-CoA (os outros dois são eliminados como CO_2), esperar-se-ia que ela fosse um aminoácido cetogênico; todavia, quando administrada isoladamente a animais de laboratório, verifica-se que não há excreção aumentada de corpos cetônicos.

Triptofano. Produz acetoacetyl-CoA por uma via que inclui três reações com oxigênio: duas são catalisadas por *dioxigenases* e uma por *monoxigenase* (ou *hidroxilase*). As dioxigenases incorporam os dois átomos de oxigênio no substrato; a monoxigenase incorpora um átomo de oxigênio no substrato (como hidroxila) e utiliza o outro para oxidar NADPH. Um dos intermediários da via de degradação do triptofano é precursor de *ácido nicotínico*; esta síntese supre parte da necessidade total desta vitamina (Fig. 17.22).

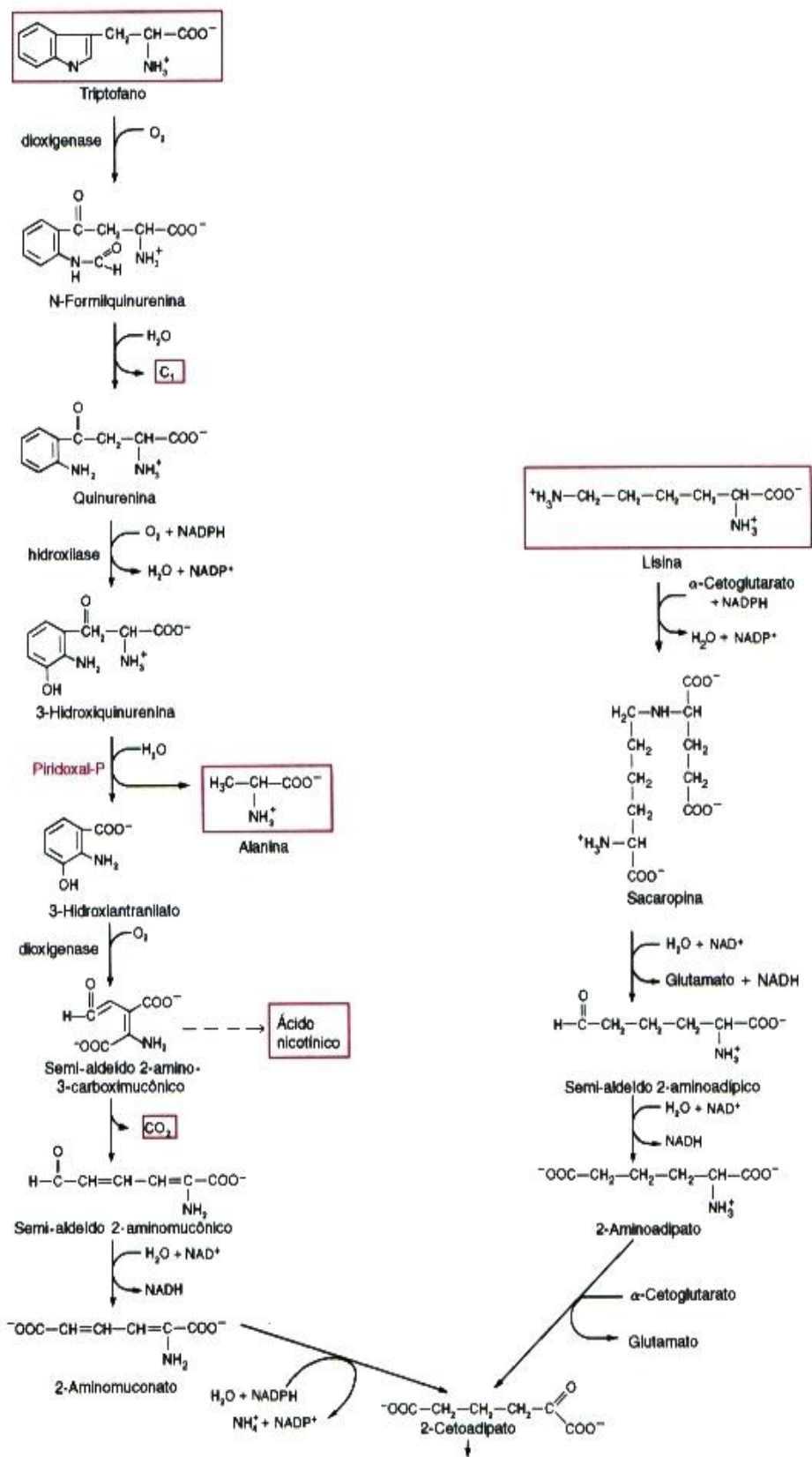


Fig. 17.22 Conversão de triptofano e lisina a acetoacetyl-CoA, através de um intermediário comum: o 2-cetoadipato.

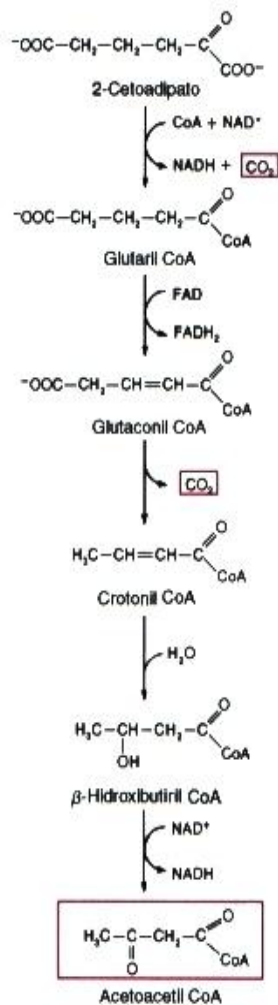


Fig. 17.22 Continuação.

17.2 DOENÇAS HEREDITÁRIAS DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

Um grande número de doenças hereditárias resultantes de defeitos enzimáticos foi descrito nos seres humanos. Estas doenças são geralmente raras e transmitidas por genes autossômicos recessivos. Em indivíduos homocigotos, a atividade enzimática pode apresentar-se alterada (K_M ou $V_{máx}$ modificados) ou estar ausente; os heterocigotos não manifestam a doença, pois um alelo normal determina síntese suficiente de enzima.

As doenças hereditárias do metabolismo de aminoácidos (são conhecidas mais de 100) constituem a maioria das síndromes genéticas metabólicas, refletindo o grande número de vias que compõem essa área do metabolismo.

A consequência direta da deficiência enzimática é o acúmulo de um metabólito em todos os fluidos corpóreos e a sua excreção na urina. O diagnóstico é feito por dosagem, no sangue ou na urina, do metabólito acumulado ou, alternativamente, por dosagem da enzima no sangue, hemácias ou leucócitos, materiais de fácil obtenção. Em alguns casos, só é possível dosar a enzima a partir de um grande número de células, que devem ser obtidas de culturas *in vitro*. Para o diagnóstico pré-natal, utilizam-se culturas de células coletadas do líquido amniótico. A dosagem da enzima permite ainda identificar portadores da moléstia, pois estes apresentam concentração de enzima menor do que a de indivíduos normais.

A alteração da via metabólica que inclui a enzima afetada tem amplos reflexos sobre outras vias. Os efeitos globais da deficiência enzimática variam de acordo com a enzima defeituosa, podendo ser tão gra-

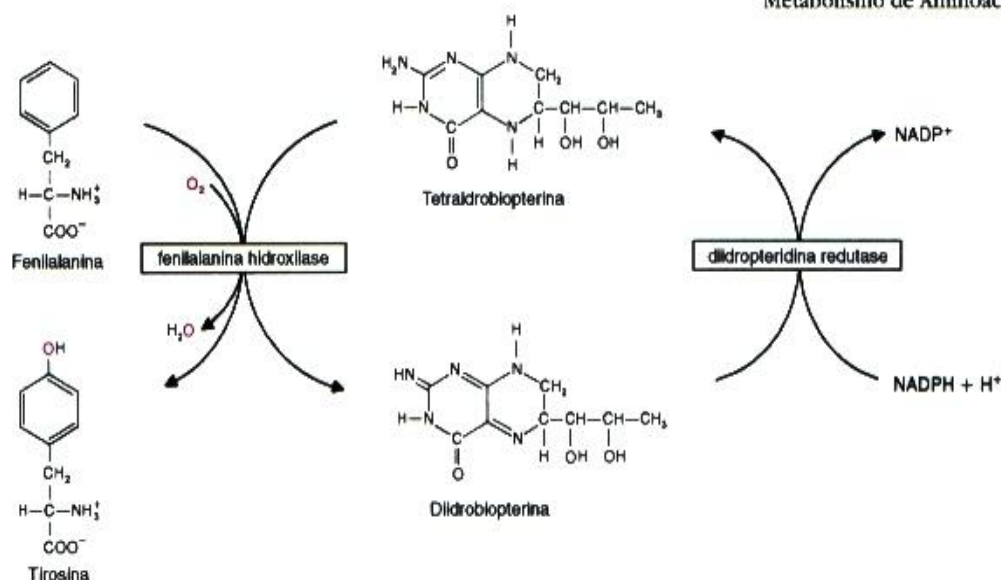


Fig. 17.23 Reação da fenilalanina hidroxilase, que converte fenilalanina em tirosina, com oxidação de tetraidrobiopterina. A tetraidrobiopterina é regenerada à custa de NADPH, por ação da diidropteridina redutase.

ves que inviabilizam o feto; mais freqüentemente, provocam lesões a partir dos primeiros meses de vida, determinando retardamento mental e físico e expectativa de vida reduzida. O diagnóstico precoce — logo após o nascimento, ou, ainda melhor, pré-natal — é fundamental porque a forma de suprimir ou atenuar os efeitos da moléstia é reduzir a ingestão do aminoácido ao nível mínimo compatível com um crescimento normal. A partir de 1990, alguns defeitos genéticos têm sido corrigidos através de terapia gênica. Um dos protocolos utilizados consiste, basicamente, em substituir o gene mutado de linfócitos por genes normais através de engenharia genética e introduzir as células modificadas no sistema circulatório dos indivíduos afetados.

O defeito hereditário mais freqüente do metabolismo de aminoácidos é a *fenilcetonúria*, causada por ausência de *fenilalanina hidroxilase*, ou, mais raramente, de *diidropteridina redutase* (Fig. 17.23). A fenilalanina hidroxilase converte fenilalanina em tirosina e utiliza *tetraidrobiopterina* como coenzima. O evento primário da moléstia é o acúmulo de fenilalanina, que é então utilizada por vias pouco significativas em indivíduos normais, como, por exemplo, a transaminação com α -cetoglutarato, originando *fenilpiruvato* (Fig. 17.24). Um dos efeitos do fenilpiruvato é competir com o piruvato pela piruvato translocase — que promove a entra-

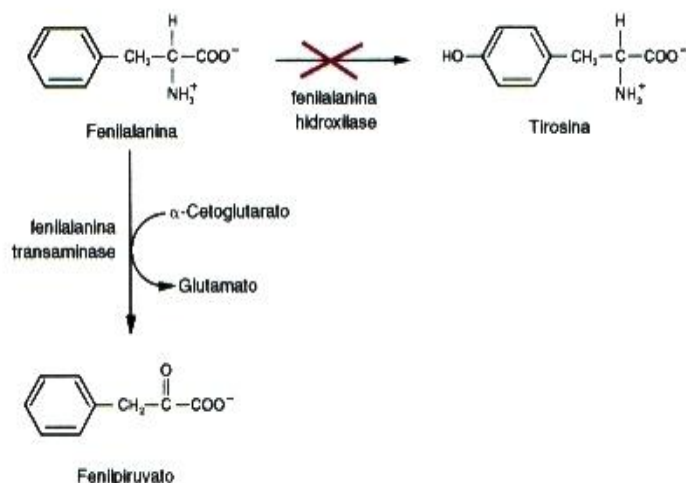


Fig. 17.24 Na fenilcetonúria, a fenilalanina não pode ser convertida em tirosina e origina fenilpiruvato.

da de piruvato na mitocôndria — restringindo a produção de ATP a partir de glicose, o único substrato oxidável para o cérebro. Nos indivíduos afetados, grandes quantidades de fenilpiruvato (e de outros compostos dele derivados) são excretadas na urina. O diagnóstico em recém-nascidos era feito, inicialmente, por dosagem de fenilpiruvato na urina. Este método tem sido substituído pela determinação da concentração de fenilalanina no sangue, o chamado “teste do pezinho”, que utiliza amostras da ordem de microlitros e constitui um critério de diagnóstico mais confiável. Na atualidade, o diagnóstico pré-natal também pode ser feito com sondas de DNA, que se tornaram disponíveis após a clonagem do gene de fenilalanina hidroxilase.

A avaliação do nível plasmático de fenilalanina em recém-nascidos é um procedimento de rotina em muitos países, inclusive no Brasil. Esta conduta é de vital importância, já que o tratamento da moléstia consiste em administrar, precocemente, uma dieta contendo um mínimo de fenilalanina; por isso, produtos industrializados contendo fenilalanina — o adoçante aspartame (p. 18), por exemplo — não devem ser consumidos por fenilcetonúricos. Estes indivíduos podem passar a ingerir fenilalanina em torno dos sete anos de idade, quando não há mais risco de injúria ao sistema nervoso central. Os indivíduos afetados apresentam, além de retardamento mental, pigmentação deficiente de pele e cabelo, devido à síntese inadequada de melanina. A fenilcetonúria foi a primeira doença genética metabólica a ser associada com um defeito enzimático específico, o que ocorreu no final da década de 40; os mecanismos que determinam o retardamento mental não são ainda conhecidos.

O *albinismo* compreende um conjunto de síndromes caracterizadas por pigmentação deficiente da pele, cabelo e olhos, devido à incapacidade de sintetizar *melanina*. A síntese de melanina inicia-se com a hidroxilação de tirosina (Fig. 17.25), catalisada pela *tirosina hidroxilase*, outra enzima que requer tetraidrobiopterina. A tirosina hidroxilase é a enzima ausente no tipo clássico de albinismo. Nos fenilcetonúricos, essa enzima sofre inibição parcial por fenilalanina, ocasionando a produção de quantidades menores de melanina. A importância da reação promovida pela tirosina hidroxilase vai ainda mais além, porque o produto formado — DOPA — origina neurotransmissores e hormônios, como dopamina, noradrenalina e adrenalina.

Na *moléstia da urina em xarope de bordo* (“*maple syrup urine disease*”), a deficiência da enzima responsável pela descarboxilação oxidativa dos aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina e valina) (Fig. 17.17) promove um acúmulo desses aminoácidos e de seus cetoácidos, que conferem à urina um odor semelhante ao do xarope de bordo.

A *acidemia isovalérica* caracteriza-se por um excesso de ácido valérico nos fluidos corpóreos, devido à ausência da *isovaleril-CoA desidrogenase*, que participa apenas do metabolismo da leucina (Fig. 17.17).

Com relação ao ciclo da uréia, já foram descritos defeitos hereditários causados por bloqueio parcial de cada uma das reações do ciclo (Fig. 17.26). A consequência é sempre uma *hiperamonemia* (nível aumentado de NH_4^+ no sangue), que pode levar ao coma e morte, dada a alta toxidez da amônia, especialmente para o sistema nervoso central. Nestes casos, o tratamento consiste na administração de uma dieta pobre em proteínas ou na substituição dos aminoácidos essenciais (Seção 17.3) da dieta pelos seus α -cetoácidos.

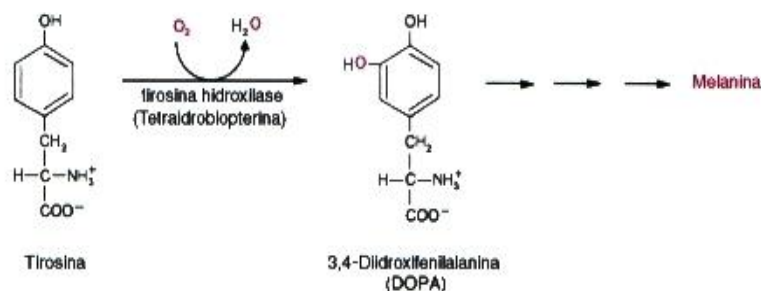


Fig. 17.25 Conversão de tirosina a 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA), catalisada por tirosinase, uma oxigenase que contém cobre. As reações que levam à síntese de melanina a partir de DOPA são pouco conhecidas.

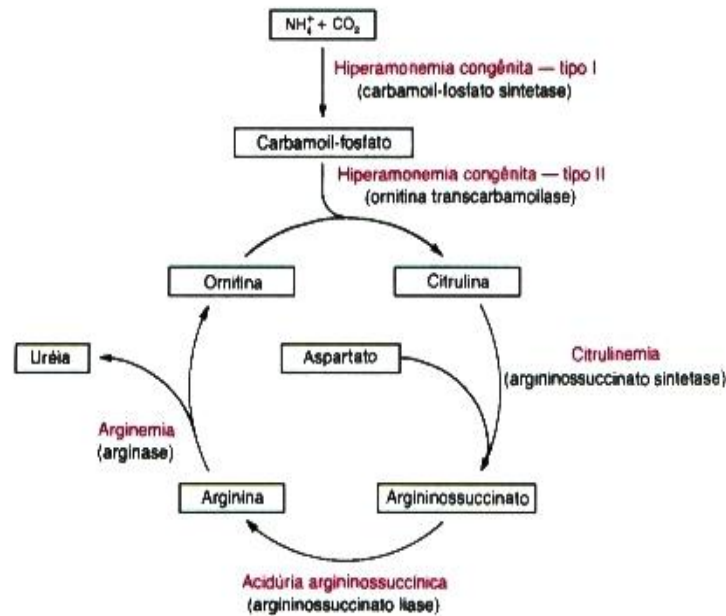


Fig. 17.26 Doenças hereditárias relacionadas com o ciclo da uréia. A enzima deficiente em cada moléstia está indicada entre parênteses.

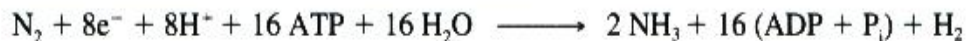
17.3 SÍNTESE DE AMINOÁCIDOS

O nitrogênio dos aminoácidos origina-se da atmosfera

Os diferentes organismos apresentam dependência muito variada do meio ambiente no que se refere ao suprimento de aminoácidos. Os vegetais e muitas bactérias são capazes de sintetizar todos os aminoácidos: o grupo amino é obtido a partir de amônia e a cadeia carbônica, a partir de carboidratos. Os seres humanos, por outro lado, dependem do suprimento externo de aminoácidos já “prontos”.

A fonte primária de nitrogênio para os seres vivos é o nitrogênio atmosférico (N_2), um gás muito pouco reativo, que deve ser convertido a uma forma “metabolizável”, por exemplo, amônia (Fig. 17.27 a). Surpreendentemente, apenas algumas poucas espécies de bactérias contêm a informação genética necessária para converter N_2 a NH_3 . São, por exemplo, bactérias do solo pertencentes ao gênero *Azotobacter*, de vida livre, ou ao gênero *Rhizobium*, que vivem associadas simbioticamente a raízes de plantas da família das leguminosas.

A conversão de N_2 a NH_3 , chamada *fixação de nitrogênio*, é realizada por um sistema enzimático complexo e ainda mal compreendido, denominado *nitrogenase*, que utiliza NADPH como doador de elétrons e processa-se com grande consumo de ATP. A reação global do processo é



A fixação de nitrogênio por simbiose é muito mais eficiente que a obtida por bactérias de vida livre, já que a planta fornece a energia necessária ao processo, através da oxidação de carboidratos produzidos por fotossíntese. A quantidade de amônia produzida pelas bactérias simbiotes excede as necessidades das leguminosas e é liberada no solo, contribuindo decisivamente para o seu enriquecimento em nitrogênio. Esta é a razão da técnica de rotação de culturas, largamente empregada na agricultura: o cultivo de plantas não-leguminosas é alternado com o de leguminosas, como feijão, soja, ervilha etc. Tendo em vista os altos custos da produção industrial de fertilizantes e os danos que causam ao meio ambiente, uma nova abordagem tem sido introduzida, a criação de plantas não-leguminosas transgênicas capazes de fixar nitrogênio. Todavia, além da transferência dos genes que codificam o complexo nitrogenase, é preciso criar condições para que a enzima funcione na planta “engenheirada”. Por exemplo, o complexo nitrogenase é extremamente sensível à inativação por oxigênio. Nos nódulos das leguminosas, este problema é resolvido pela presença de uma proteína com

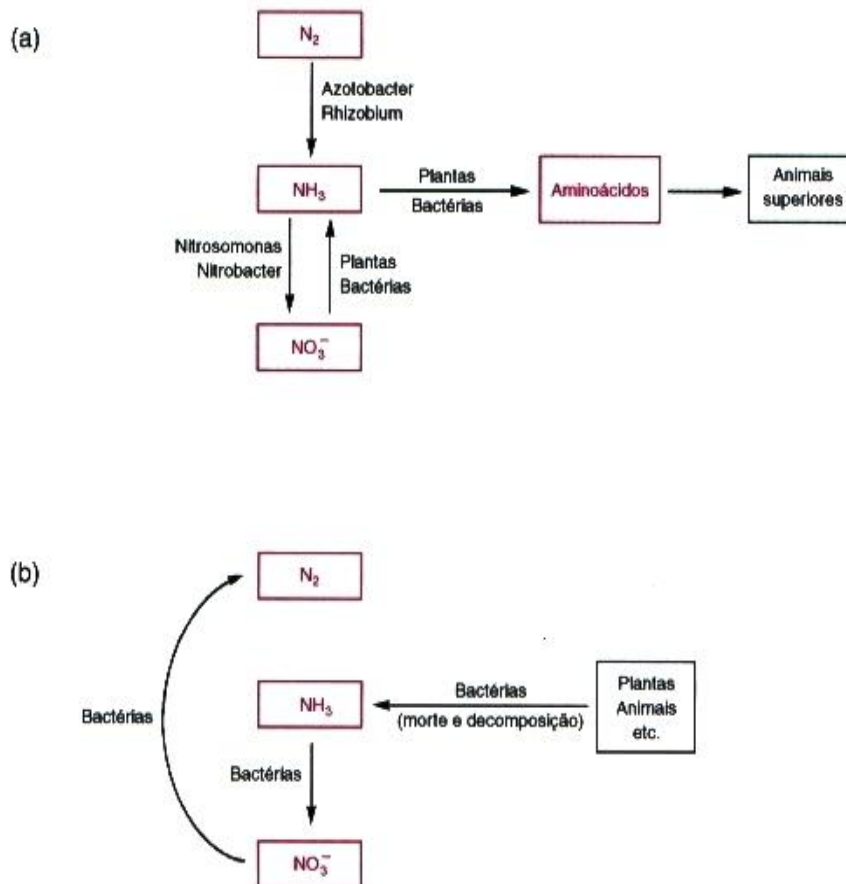


Fig. 17.27 Esquema simplificado do caminho percorrido pelo nitrogênio desde a atmosfera até os animais superiores e vice-versa. a) O N_2 atmosférico é reduzido a NH_3 por um pequeno número de espécies de bactérias; outras bactérias, muito abundantes no solo, transformam a maior parte da amônia em nitritos e, finalmente, em nitratos. A maioria das plantas e bactérias são capazes de converter estes compostos novamente a NH_3 , o precursor do grupo amino dos aminoácidos, que se tornam, então, disponíveis para os animais superiores. b) O ciclo do nitrogênio é mantido, graças aos seguintes processos bacterianos: o nitrogênio proveniente da decomposição dos organismos é reconvertido a NH_3 , depois a nitritos e nitratos e, finalmente, a nitrogênio gasoso.

alta afinidade por O_2 , a *leghemoglobina*, que contém, como a hemoglobina, um grupo heme (p. 38). A simbiose é indispensável para a sua síntese: a globina é sintetizada pela leguminosa e o grupo heme por *Rhizobium*.

A síntese industrial de fertilizantes para a agricultura produz, anualmente, uma quantidade de NH_3 equiparável à obtida por fixação biológica. Uma fração menor de nitrogênio é fixada por outros processos não-biológicos, como descargas elétricas e radiação ultravioleta.

A amônia presente no solo é, em grande parte, convertida a nitritos e, principalmente, a nitratos, por bactérias dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. As plantas não-leguminosas e a maioria das bactérias possuem enzimas capazes de reduzir nitritos e nitratos a amônia, que pode ser, então, utilizada na síntese de aminoácidos e de todos os outros compostos nitrogenados (Fig. 17.27 a).

A manutenção do equilíbrio entre os diferentes reservatórios de nitrogênio do planeta deve-se, novamente, à atuação das bactérias (Fig. 17.27 b). Organismos mortos são decompostos e seu nitrogênio gera amônia; esta é convertida a nitritos e nitratos, que podem ser reconvertidos a N_2 atmosférico, fechando o chamado *ciclo do nitrogênio*.

Os animais superiores obtêm todo o nitrogênio necessário para a síntese de seus compostos nitrogenados — proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidios etc. — na forma de aminoácidos, sintetizados por outros organismos.

O organismo humano só sintetiza 11 dos 20 aminoácidos constituintes das proteínas

O processo de síntese proteica requer que estejam presentes na célula, simultaneamente, todos os vinte aminoácidos. Esta condição é crítica, especialmente levando-se em conta dois fatos: nenhuma célula dispõe de reservas de aminoácidos e não são todos os aminoácidos que podem ser sintetizados pelo organismo humano. De fato, dos vinte aminoácidos encontrados nas proteínas, *nove* não podem ser sintetizados pelo homem (Quadro 17.3) e devem, portanto, ser obrigatoriamente obtidos pela dieta, chamando-se, por isto, *aminoácidos essenciais*. Ainda mais, dois outros aminoácidos — cisteína e tirosina — são sintetizados, pelo homem, unicamente a partir de aminoácidos essenciais — metionina e fenilalanina — e, quando ausentes da dieta, fazem aumentar a necessidade dos aminoácidos precursores. Restam, portanto, apenas nove aminoácidos que podem ser prontamente formados a partir de compostos intermediários do metabolismo de carboidratos e lipídios. Estes nove aminoácidos e os dois que são sintetizados a partir de aminoácidos essenciais são chamados *aminoácidos não-essenciais*.

Quadro 17.3 Aminoácidos essenciais e não-essenciais para os seres humanos

Essenciais	Não-essenciais
Fenilalanina	Alanina
Histidina	Arginina
Isoleucina	Asparagina
Leucina	Aspartato
Lisina	Cisteína ¹
Metionina	Glutamato
Treonina	Glutamina
Triptofano	Glicina
Valina	Prolina
	Serina
	Tirosina ¹

¹Sintetizados a partir de aminoácidos essenciais.

Glutamato e glutamina são os doadores de nitrogênio para a síntese dos aminoácidos

Nos seres vivos capazes de sintetizar todos os vinte aminoácidos — plantas e muitas bactérias — a amônia resultante da fixação de nitrogênio é utilizada, inicialmente, para a síntese de glutamato e glutamina, que constituem as mais importantes incorporações diretas de nitrogênio, a partir de NH_4^+ , como grupamentos de aminoácidos. Glutamato e glutamina fornecem, então, o nitrogênio para a produção dos demais aminoácidos. Nos mamíferos, a síntese dos aminoácidos não-essenciais também é feita à custa do nitrogênio de glutamato e glutamina, que têm, portanto, um papel central tanto na degradação (Seção 17.1), como na síntese de aminoácidos. Segue-se a descrição da síntese dos aminoácidos não-essenciais, que foram agrupados segundo o composto precursor de seu esqueleto de carbono (Fig. 17.28).

1. Glutamato, glutamina e prolina

O α -cetoácido deste grupo de aminoácidos provém de α -cetoglutarato.

Glutamato, nos mamíferos, é sintetizado por transaminação de α -cetoglutarato com a maioria dos outros aminoácidos. A glutamato desidrogenase, que poderia catalisar a incorporação de NH_4^+ em α -cetoglutarato, tem baixa afinidade por esse íon e o $\Delta G^{0'}$ da reação favorece a desaminação de glutamato (p. 219). Como se verá mais adiante, as outras sínteses de aminoácidos não-essenciais também utilizam-se de transaminações, isto é, transferências de grupo α -amino, sempre a partir do glutamato.

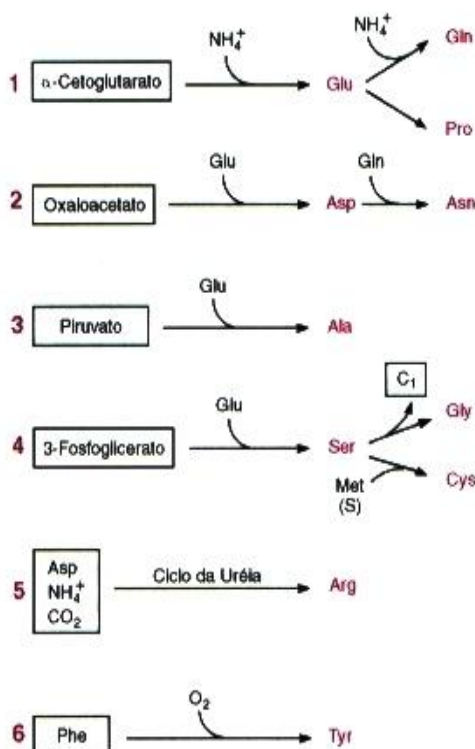
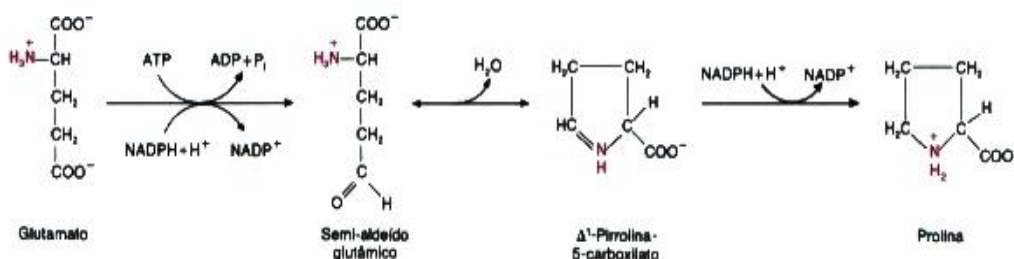


Fig. 17.28 Esquema geral da síntese dos onze aminoácidos não-essenciais. Os aminoácidos foram divididos em grupos (1 a 6), segundo o precursor dos seus átomos de carbono.

A **glutamina** é sintetizada, a partir de NH_4^+ , pela glutamina sintetase (p. 222). Note-se que, neste caso, a incorporação de NH_4^+ é feita como um grupo *amida*, e portanto este nitrogênio não pode participar de transaminações. Todavia, através de outros tipos de reações, o nitrogênio amídico pode ser utilizado na síntese de aminoácidos essenciais em plantas e bactérias, e na síntese de purinas e pirimidinas em mamíferos. A glutamina tem, ainda, um papel importante como veículo para o transporte de NH_4^+ entre os diferentes órgãos (p. 222).

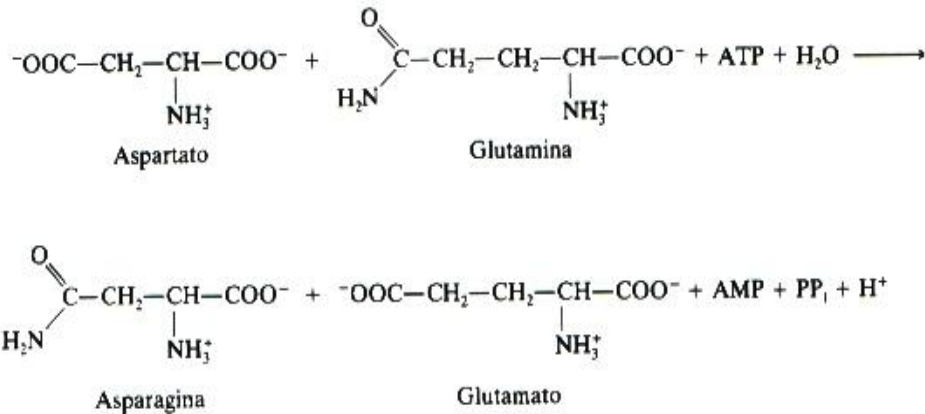
A **prolina** tem todos os seus átomos de carbono e seu átomo de nitrogênio provenientes do glutamato. Este aminoácido é convertido a um semi-aldeído, por uma redução complexa, dependente de ATP. A eliminação de H_2O produz o primeiro composto cíclico, a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato, que, novamente por redução, origina prolina:



2. Aspartato e asparagina

Aspartato é obtido a partir do esqueleto de carbono de oxaloacetato e do grupo amino de glutamato, por transaminação catalisada pela aspartato transaminase.

Asparagina é sintetizada a partir de aspartato. O grupo amida é proveniente da glutamina e a transferência é catalisada pela *asparagina sintetase*:

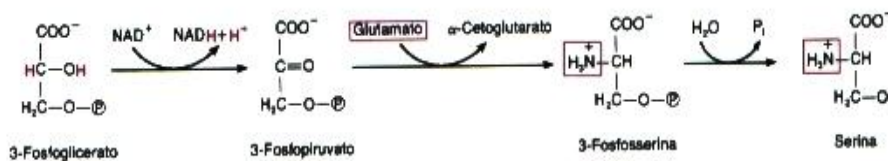


3. Alanina

Formada por transaminação entre piruvato e glutamato, promovida pela alanina transaminase.

4. Serina, glicina e cisteína

Serina origina-se de 3-fosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica, através de: redução, catalisada pela *fosfoglicerato desidrogenase*; transaminação, pela *fosfoserina transaminase*; e, finalmente, hidrólise do grupo fosfato, pela *fosfoserina fosfatase*:



A síntese de **glicina**, em mamíferos, ocorre fundamentalmente, a partir de serina, através da transferência de um de seus átomos de carbono para o tetraidrofolato (FH₄), catalisada pela *serina hidrometil transferase*, uma enzima que utiliza piridoxal fosfato como coenzima:



Esta reação foi mostrada na degradação de serina (p. 225) e, como é reversível, constitui também uma via de síntese de serina a partir de glicina.

A **cisteína** é derivada de serina, por substituição do oxigênio da hidroxila da serina por enxofre, proveniente de metionina, um aminoácido essencial. Esta reação faz parte da via de degradação de metionina (Fig. 17.18).

5. Arginina

É sintetizada como um dos intermediários do ciclo da uréia. A presença de grandes quantidades de arginina no fígado, todavia, faz com que a maior parte da arginina formada seja clivada em uréia e ornitina. Alguns órgãos, como cérebro e rim, contêm argininossuccinato liase e não contêm arginase, possibilitando a síntese de arginina. Note-se que a remoção deste aminoácido para sua utilização na síntese proteica não retira a finalidade principal do ciclo da uréia, que é a eliminação dos grupos NH₄⁺ excedentes do catabolismo dos aminoácidos. Ainda mais, a retirada de arginina não interrompe o ciclo da uréia, uma vez que ornitina pode ser produzida a partir de glutamato: glutamato → semi-aldeído glutâmico → ornitina (a primeira reação encontra-se na página 240 e a segunda na página 231, Fig. 17.20).

6. Tirosina

Origina-se da hidroxilação de fenilalanina, catalisada pela fenilalanina hidroxilase (Fig. 17.23). Esta é a única reação conhecida para a fenilalanina, em indivíduos normais, além de sua participação na síntese proteica. Quando a dieta inclui tirosina, as necessidades de fenilalanina diminuem consideravelmente. Por esta razão, na análise das quantidades recomendadas de aminoácidos na dieta, costumam ser consideradas as necessidades conjuntas de fenilalanina e tirosina. O mesmo princípio é aplicado à metionina e cisteína, cujas necessidades são também somadas (Capítulo 18).

18

OS SUBSTRATOS DAS VIAS METABÓLICAS: NUTRIÇÃO

Os alimentos consumidos pelos seres humanos, após digestão e absorção, originam uma grande diversidade de substâncias que finalmente são distribuídas às células, fornecendo, basicamente, os substratos das vias metabólicas oxidativas e biossintéticas e os compostos que os seres humanos não têm a capacidade de sintetizar, como os precursores de coenzimas (as vitaminas), os ácidos graxos essenciais e os aminoácidos essenciais. O funcionamento global do organismo vai depender da qualidade dos nutrientes ingeridos. O objetivo deste capítulo é fornecer noções básicas sobre a composição de uma dieta balanceada, indispensável para a manutenção de um estado saudável.

18.1 NUTRIÇÃO PROTEICA

As proteínas constituintes dos organismos, quaisquer que sejam as suas funções, estão continuamente sendo renovadas. A reciclagem de proteínas alimenta e utiliza o “pool” de aminoácidos, que deve ser entendido não como um reservatório estático de moléculas, mas como um conjunto de aminoácidos “em trânsito” entre os processos de síntese e degradação. Este *pool* precisa ser continuamente suprido por aminoácidos exógenos, por várias razões:

1. O *pool* de aminoácidos nunca é integralmente aproveitado para síntese, porque as proteínas sintetizadas em um dado instante não são as mesmas que estão sendo degradadas: os aminoácidos não utilizados, ainda que sejam aminoácidos essenciais, são oxidados.

2. A gliconeogênese utiliza seletivamente os esqueletos de carbono dos aminoácidos glicogênicos, retirando-os do *pool* em proporções significativas.

3. Alguns compostos nitrogenados são constantemente degradados e seu nitrogênio, excretado na urina. Entre estes estão a creatinina, resultante da degradação de fosfocreatina, uma reserva energética do músculo, e o ácido úrico, produto de degradação das purinas.

4. Existe uma síntese contínua de proteínas cujos aminoácidos não retornam ao *pool*: são as proteínas constituintes de mucosas e camadas epidérmicas que estão sempre sendo renovadas, de cabelos e unhas.

Há, portanto, uma perda constante de nitrogênio, que se manifesta mesmo quando um indivíduo é submetido, por vários dias, a uma dieta isenta de proteínas. Em experimentos deste tipo, foi verificada uma perda de 11 g de nitrogênio na urina e 0,8 g nas fezes, no primeiro dia da dieta. Nos dias subsequentes, a excreção diminuiu até atingir um valor constante de 3 g/dia na urina e 0,8 g/dia nas fezes. A perda de 3,8 g/dia de nitrogênio equivale a cerca de 24 g de proteína e, como mostra o experimento, é a excreção mínima obrigatória. Se o jejum for completo, um homem adulto de 70 kg chega a eliminar 80 g de proteína por dia. Com

uma dieta balanceada, este indivíduo excretaria cerca de 16,5 g de nitrogênio (100 g de proteína) por dia. A *única* forma de repor esta perda e manter estável o *pool* de aminoácidos, de maneira a não restringir a síntese de proteínas e compostos nitrogenados, é a ingestão de proteínas.

As proteínas dos alimentos são digeridas e seus aminoácidos são transportados para dentro das células. A digestão é obtida por hidrólise catalisada por enzimas proteolíticas presentes no tubo digestivo: a digestão inicia-se no estômago e completa-se no intestino delgado. Os aminoácidos resultantes são absorvidos pela mucosa intestinal e distribuídos para os tecidos, que, portanto, recebem um conjunto de aminoácidos cuja composição varia de acordo com as proteínas na alimentação.

18.1.1 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Um indivíduo adulto encontra-se em equilíbrio nitrogenado

A avaliação do metabolismo proteico de um indivíduo pode ser feita através do seu balanço de nitrogênio, a medida mais comumente utilizada para este fim. O balanço de nitrogênio é a diferença entre a quantidade de nitrogênio ingerido e a quantidade de nitrogênio excretado. A excreção de nitrogênio se dá, fundamentalmente, através da uréia eliminada na urina (em média, 90%) e de proteínas presentes nas fezes (10%), derivadas de proteínas não digeridas, da descamação da mucosa intestinal e também da flora intestinal. Vias minoritárias de excreção, como a transpiração, crescimento de cabelos e unhas e descamação da pele, não são computadas no cálculo do balanço nitrogenado.

Em um indivíduo adulto com dieta adequada, a eliminação equivale à ingestão e o balanço de nitrogênio é igual a zero; diz-se, então, que o estado é de *equilíbrio nitrogenado*. Quando aumenta o conteúdo proteico da dieta oferecida a um indivíduo em equilíbrio nitrogenado, após um período de adaptação, aumenta também a excreção de nitrogênio: a ingestão aumentada é compensada por uma maior eliminação de nitrogênio, permanecendo a condição de equilíbrio, embora com valores absolutos maiores. O conteúdo proteico de um indivíduo adulto não pode, portanto, ser aumentado com a dieta. O excesso de proteína ingerida é armazenado como triacilgliceróis.

O *balanço de nitrogênio negativo* ocorre quando a eliminação de nitrogênio é maior do que a ingestão. As condições que acarretam balanço de nitrogênio negativo são, além do jejum, dietas pobres em proteínas ou contendo proteínas de baixo valor biológico (p. 245) e dietas pobres em carboidratos. Diversas condições patológicas, como diabetes, câncer, infecções e situações de perda significativa de tecidos, como queimaduras graves, cirurgias etc., também provocam balanço negativo.

Deve-se notar que são bastante particulares as situações em que se estabelece um *balanço de nitrogênio positivo*, ou seja, excreção menor do que ingestão. Balanços positivos são verificados apenas quando há aumento real do conteúdo proteico por formação efetiva de tecido, como durante o crescimento, gravidez, lactação e convalescença.

18.1.2 VALOR NUTRICIONAL DAS PROTEÍNAS

Os alimentos de origem animal têm alto teor de proteína

Um dos parâmetros a ser considerado quando se avalia a importância de um alimento como fonte de proteínas é o seu conteúdo proteico, geralmente expresso em gramas de proteína por 100 g do alimento (%). O Quadro 18.1 mostra que carnes, peixes, laticínios e ovos são os mais ricos em proteína, chegando a conter de 10 a 100 vezes mais proteína que os vegetais. Cereais e legumes são relativamente pobres em proteínas; frutas e tubérculos, do ponto de vista das necessidades proteicas, são inadequados. Os alimentos básicos dos países em desenvolvimento, assim como os constituintes de dietas vegetarianas, têm, portanto, baixo teor proteico. A dieta típica da população brasileira de baixa renda é constituída, fundamentalmente, por uma mistura de três partes de arroz e uma de feijão, mistura esta que tem baixa concentração de proteína, em torno de 8%.

O real valor nutricional de um alimento, todavia, é refletido pela qualidade das proteínas que o compõem. A qualidade nutricional de uma proteína é aferida pela sua capacidade de prevenir alterações do conteúdo

Quadro 18.1 Conteúdo proteico de alimentos

Alimento ¹	Teor de proteína (g/100 g de alimento)
Carne bovina	27
Queijo	27
Fígado bovino	26
Peixe	22
Carne de frango	22
Carne de porco	21
Ovo	13
Feijão	6,0
Ervilha	5,1
Leite ²	3,5
Milho	2,6
Batata	2,3
Arroz	2,0
Banana	1,4
Cenoura	1,1
Laranja	1,0
Mandioca	0,6
Maçã	0,2

¹O conteúdo de proteína refere-se aos alimentos cozidos, exceto no caso das frutas, que são consideradas cruas.

²Leite contém caseína, uma proteína de excelente valor nutricional, mas tem alto teor de água.

proteico dos indivíduos quando apenas a proteína em questão é oferecida na dieta como fonte de nitrogênio. A ocorrência ou não de espoliação proteica é monitorada por medida do balanço de nitrogênio. A *ovalbumina* é a proteína utilizada como padrão de referência.

A qualidade nutricional das proteínas depende da sua digestibilidade e composição

As propriedades que definem a qualidade alimentar de uma proteína são sua digestibilidade e a adequação do seu conteúdo em aminoácidos para compor as proteínas endógenas.

A *digestibilidade* é uma medida do percentual da proteína ingerida que é digerido e efetivamente absorvido no trato gastrointestinal e, portanto, oferecido aos tecidos, sob a forma de aminoácidos. A parte não digerida é, naturalmente, eliminada nas fezes. Calcula-se a digestibilidade através de medidas do conteúdo de nitrogênio do alimento (N_{ingerido}) e do nitrogênio nas fezes (N_{fezes}). A diferença entre os dois valores corresponde ao nitrogênio absorvido ($N_{\text{absorvido}}$) (Fig. 18.1), e a digestibilidade (D) é expressa como:

$$D = \frac{N_{\text{absorvido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100 \quad \text{ou} \quad D = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fezes}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

A grande maioria das proteínas de origem animal exibem valores altos de digestibilidade quando comparadas a proteínas de origem vegetal (Quadro 18.2). Os vegetais têm alto teor de fibras não-digeríveis que diminuem a absorção intestinal de nutrientes.

Ainda que a digestibilidade seja alta, uma proteína pode apresentar baixo valor nutricional, em virtude do seu conteúdo inadequado de *aminoácidos essenciais*. A gelatina, por exemplo, tem alta digestibilidade, mas é uma proteína de baixa qualidade, porque é deficiente em aminoácidos essenciais. Para que uma proteína seja nutricionalmente satisfatória, deve conter aminoácidos essenciais em proporções adequadas à síntese das proteínas humanas. Uma proteína hipotética, a polimetionina, por exemplo, ainda que completamente digerida e absorvida não seria capaz de manter o equilíbrio nitrogenado, pois a metionina não poderia ser utilizada na síntese proteica, por falta dos outros aminoácidos essenciais. A metionina seria oxidada e seu nitrogênio, excretado como uréia. Até mesmo a ausência de um só aminoácido em uma refeição provoca grande diminuição

Quadro 18.2 Valores de digestibilidade de proteínas

Alimento	Digestibilidade
Ovo	97
Leite, queijo	95
Carne, peixe	94
Arroz polido	88
Milho	85
Feijão	78

na síntese proteica, cujos valores normais não chegam a ser retomados mesmo que o aminoácido ausente seja ingerido apenas 4 horas após a refeição. As proteínas deficientes mesmo em apenas um aminoácido essencial são incapazes de manter o equilíbrio nitrogenado quando constituem a única proteína da dieta, independentemente da quantidade ingerida.

Uma medida da adequação da composição em aminoácidos de uma proteína para suprir necessidades de sínteses dos seres humanos é dada pelo seu *valor biológico* (BV, de *Biological Value*). O valor biológico representa a fração de aminoácidos absorvidos pelo trato gastrointestinal que efetivamente origina os compostos nitrogenados do organismo (Fig. 18.1). A quantidade de nitrogênio retido (N retido) corresponde à diferença entre o nitrogênio absorvido e o nitrogênio excretado na urina (N urina). O valor biológico, portanto, é igual a:

$$BV = \frac{N_{\text{retido}}}{N_{\text{absorvido}}} \times 100 \quad \text{ou} \quad BV = \frac{N_{\text{absorvido}} - N_{\text{urina}}}{N_{\text{absorvido}}} \times 100$$

Como $N_{\text{absorvido}} = N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fezes}}$, obtém-se:
 $N_{\text{retido}} = N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fezes}} - N_{\text{urina}}$ ou
 $N_{\text{retido}} = N_{\text{ingerido}} - N_{\text{excretado}}$

Assim, pode-se expressar BV como:

$$BV = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{urina}} - N_{\text{fezes}}}{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fezes}}} \times 100 \quad \text{ou} \quad BV = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{excretado}}}{N_{\text{absorvido}}} \times 100$$

Deste modo, o BV não leva em consideração a fração não absorvida das proteínas da dieta, já que o conteúdo de nitrogênio das fezes é subtraído do nitrogênio ingerido tanto no numerador, quanto no denominador da equação. Ou seja, não avalia a digestibilidade da proteína, informando apenas sobre a qualidade da fração de aminoácidos que foi absorvida. Proteínas deficientes em um aminoácido essencial têm valores de BV próximos de zero. Proteínas com alto valor biológico são as de origem animal, como as do ovo, leite e carnes; a gelatina é uma exceção. As proteínas vegetais têm valores biológicos consideravelmente inferiores, devido à deficiência de um ou mais aminoácidos essenciais.

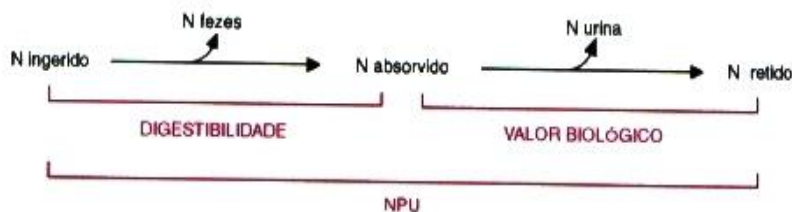


Fig. 18.1 Parâmetros para avaliar a qualidade nutricional das proteínas. A digestibilidade relaciona a quantidade de nitrogênio (N) absorvido com a quantidade de nitrogênio ingerido. O valor biológico refere-se à relação entre o nitrogênio absorvido e o retido. O NPU compara o nitrogênio ingerido e o retido.

A análise da digestibilidade e do valor biológico isoladamente não permite a avaliação completa da qualidade de uma proteína. Um índice que leva em consideração tanto a digestibilidade quanto o valor biológico e que, portanto, revela a real qualidade nutricional da proteína é o *NPU* (*Net Protein Utilization*) (Fig. 18.1). O NPU mede a fração de nitrogênio ingerido que é efetivamente retido:

$$\text{NPU} = \frac{N_{\text{retido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100 \quad \text{ou} \quad \text{NPU} = \frac{N_{\text{ingerido}} - N_{\text{excretado}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100$$

Como a grande maioria das proteínas animais exibem altos valores de digestibilidade e de valor biológico, têm, conseqüentemente, índices elevados de NPU (Quadro 18.3). As proteínas vegetais, por outro lado, têm digestibilidade e valor biológico menores, o que está refletido nos seus índices de NPU, também menores.

Certos agentes alteram o NPU de proteínas, agindo sobre sua digestibilidade. O aquecimento geralmente aumenta a digestibilidade das proteínas, por causar desnaturação, facilitando, assim, a hidrólise pelas enzimas digestivas. O calor seco, todavia, decresce a digestibilidade das proteínas por reduzir a quantidade absorvida de determinados aminoácidos. A lisina, por exemplo, pode unir-se a açúcares redutores através de ligações covalentes, que não podem ser rompidas pelas enzimas digestivas; este efeito é agravado no caso das proteínas de cereais, pobres em lisina.

Quadro 18.3 Valores de NPU de alimentos

Alimento	NPU
Leite humano	95
Ovo	90
Leite de vaca	81
Carne bovina	70
Arroz polido	60
Farinha de soja	58
Amendoim	50
Trigo integral	45
Milho	40

18.1.3 QUANTIDADES RECOMENDADAS DE PROTEÍNA NA DIETA

A ingestão proteica mínima depende do NPU das proteínas

A quantidade de proteína na dieta necessária para a manutenção do conteúdo proteico do organismo (equilíbrio nitrogenado) depende de diversos fatores, que interferem no aproveitamento da proteína consumida, principalmente o valor do seu NPU. As doses mínimas de proteína recomendadas não têm significado se não forem especificadas as proteínas que compõem a dieta. Além disso, a dose mínima varia segundo o teor de carboidratos e lipídios da dieta e de acordo com a idade e o sexo dos indivíduos. Os estudos nutricionais levam à recomendação de uma dose mínima diária de 0,8 g de proteína por quilo de peso corpóreo, considerando-se a ingestão de proteínas de alto NPU, como as de origem animal. Esta dose corresponde a 56 g para um homem de 70 kg e 44 g para uma mulher de 55 kg. A necessidade proteica da criança, por apresentar um balanço de nitrogênio positivo, é proporcionalmente maior do que a do adulto, chegando a 2 g por quilo de peso. Durante a gravidez e lactação, recomenda-se uma ingestão adicional diária de 20 a 30 g de proteína, respectivamente, para suprir as necessidades do feto em crescimento e da formação do leite.

As doses mínimas recomendadas são satisfatórias para os habitantes de países desenvolvidos, onde as dietas habituais são compostas de proteínas de alta qualidade, como carnes, peixes, ovos e leite. Nos Estados Unidos, por exemplo, 70% do total de proteínas consumidas são de origem animal e 30% apenas, de origem vegetal. Por outro lado, as proteínas presentes na dieta da maior parte da população mundial têm valores de NPU muito inferiores; no Brasil, 70% das proteínas consumidas são de origem vegetal. Quando a ingestão

proteica é feita com proteínas de baixa qualidade, os valores recomendados devem ser corrigidos para, no mínimo, 1,4 g de proteína por quilo de peso, o que corresponde a 100 g por dia para um homem adulto.

Uma forma compensatória para a má qualidade das proteínas é ingerir, em uma mesma refeição, proteínas com deficiências de aminoácidos essenciais diferentes, para que se obtenha o chamado *efeito complementar* das proteínas. Este cuidado deve ser tomado quando se planeja uma dieta vegetariana. Os produtos vegetais, como já foi assinalado, apresentam conteúdo proteico muito inferior aos produtos de origem animal, assim como deficiências de aminoácidos essenciais e baixa digestibilidade. Uma dieta vegetariana que possa suprir as necessidades proteicas mínimas de indivíduos adultos deve conter uma grande variedade, e uma grande quantidade, de proteínas que apresentem efeito complementar. Por exemplo, as proteínas dos cereais são deficientes em lisina, e às proteínas das leguminosas falta metionina. Uma mistura de arroz e feijão pode, então, fornecer o conjunto completo de aminoácidos essenciais, porém, em quantidades insuficientes. Assim sendo, uma dieta vegetariana satisfatória deve sempre ser complementada com proteínas de boa qualidade, como ovos e laticínios. Dietas vegetarianas não são recomendadas, em especial, para crianças, gestantes e lactentes. Além dos problemas referentes à necessidade proteica, este tipo de dieta é muito rico em fibras, que causam menor absorção de outros nutrientes.

Os ruminantes constituem uma exceção entre os mamíferos, no que concerne à ingestão proteica, porque podem sobreviver à custa de gramíneas (pasto). Nestes animais, a maior parte da uréia é transferida do sangue para o rúmen. Esta parte do sistema digestivo é habitada por microrganismos que utilizam a uréia como fonte de nitrogênio para sintetizar aminoácidos. A digestão destas bactérias em porções distais do trato gastrointestinal reduz grandemente as necessidades proteicas dos ruminantes.

Um outro fator que interfere nas doses mínimas recomendadas de proteína é o suprimento energético da dieta sob a forma de carboidratos e lipídios: sua ingestão concomitante reduz a utilização de proteínas como fonte de energia.

18.2 INGESTÃO CALÓRICA

18.2.1 DISPÊNDIO DE ENERGIA

Embora uma fração dos aminoácidos constituintes das proteínas da dieta seja sempre oxidada, a maior parte destina-se a servir como precursores para a síntese das proteínas características do organismo e demais compostos nitrogenados. Com os carboidratos e lipídios passa-se o oposto: destinam-se, em geral, a ser oxidados e, deste modo, fornecer energia para os processos vitais. A necessidade energética¹ de um indivíduo é composta de uma parte constante, que atende os gastos inevitáveis (metabolismo basal), e uma parte variável.

A *taxa metabólica basal* é a quantidade de energia necessária para a manutenção dos processos vitais básicos, como trabalho osmótico, bombeamento do sangue, respiração, atividade do sistema nervoso etc. O transporte ativo de íons através das membranas celulares e o cérebro consomem mais de 50% dos gastos energéticos basais. A taxa metabólica basal é medida pela perda de calor ou pelo oxigênio consumido por um sujeito em repouso e acordado, 12 horas após a última refeição; é proporcional à massa magra (músculos, ossos e vísceras) e à área de superfície corpórea. Corresponde, em média, a 1.800 kcal/dia (7.530 kJ) para homens e 1.500 kcal/dia (6.275 kJ) para mulheres.

A variável que mais interfere no consumo energético é a intensidade da atividade física: entre o repouso e o exercício intenso, o dispêndio de energia pode aumentar em até dez vezes. O gasto total de energia é a soma da taxa metabólica basal e da quantidade de energia gasta nas diferentes atividades diárias (Quadro 18.4). As necessidades energéticas variam, ainda, com a idade, sexo, altura e peso. As doses recomendadas de ingestão de calorias para adultos, ao contrário da necessidade proteica, não apresentam valores constantes por quilo de peso; são estabelecidas como o menor valor compatível com a manutenção da saúde e um grau apropriado de atividade física (Quadro 18.5). À semelhança do equilíbrio nitrogenado, deve haver um *equilíbrio energético*, ou seja, a ingestão calórica deve contrabalançar o gasto de energia de modo a manter um peso corpóreo constante. Uma ingestão calórica insuficiente leva a um balanço energético negativo: a mobilização das reservas

¹A necessidade energética é expressa em quilojoules (kJ) ou quilocalorias (kcal); uma quilocaloria equivale a 4,184 quilojoules.

Quadro 18.4 Consumo de energia por um homem adulto durante diferentes atividades

Tipo de atividade	kcal/h	kJ/h
Muito leves: ler, escrever, ver TV	110	460
Leves: dirigir, andar devagar, lavar louça	220	920
Moderadas: andar depressa, dançar, andar de bicicleta	370	1.550
Intensas: nadar, correr, jogar futebol ou basquetebol	580	2.430

Quadro 18.5 Doses recomendadas de ingestão diária de calorias para indivíduos com altura mediana e atividade física de leve a moderada

	Idade (anos)	Peso (kg)	Energia necessária	
			kcal	kJ
Homens	23-50	70	2.900	12.130
Mulheres	23-50	55	2.200	9.200
Grávidas			+300	+1.250
Lactantes			+500	+2.090

energéticas (lipídios) provoca perda de peso. Por outro lado, as dietas hipercalóricas resultam em ganho de peso, por aumento do depósito de gordura. Esta é uma situação freqüente na maturidade e instala-se sempre que a natural redução da atividade física com a idade não é acompanhada de uma adequação dos hábitos alimentares.

Adicionalmente, a *obesidade* — peso corporal com mais de 20% do peso médio para a idade e sexo considerados — constitui um problema nutricional comum em países desenvolvidos do Ocidente e nas camadas de maior poder aquisitivo dos países em desenvolvimento, em contraste com a desnutrição a que está submetida uma grande parcela da população mundial. A obesidade está associada a uma menor expectativa de vida, por desenvolvimento de várias doenças crônicas, como diabetes, aterosclerose, hipertensão, câncer etc. Resulta, quase sempre, de uma superalimentação — raramente é devida a problemas hormonais. O tratamento mais adequado é, portanto, a redução da ingestão calórica. Para emagrecimento e manutenção de um estado saudável, esta redução deve incidir sobre os componentes não-essenciais da dieta: carboidratos e lipídios. A ingestão proteica deve ser preservada, pois, além de indispensável, raramente é responsável pelo excedente alimentar. A prática regular de exercícios, e não a atividade esporádica, propicia a perda de peso, por induzir um aumento da degradação de lipídios e uma redução da sua síntese. O tratamento da obesidade pode tomar novos rumos, diante das evidências recentes de que o peso corpóreo possa ser geneticamente programado.

18.2.2 CONTRIBUIÇÃO DOS ALIMENTOS PARA A INGESTÃO CALÓRICA

A produção calórica por oxidação de carboidratos, proteínas e lipídios está indicada no Quadro 18.6. Qualquer destes três tipos de compostos pode suprir a demanda energética alimentar. A proporção recomendável em que estes nutrientes devem entrar na composição da dieta depende, entretanto, de várias considerações. Os alimentos ricos em carboidratos são muito abundantes e de custo mais baixo. As dietas ricas em lipídios estão relacionadas com a incidência de moléstias diversas. O baixo teor de proteínas da maioria dos alimentos e o alto custo daqueles contendo proteínas de alto NPU inviabilizam uma ingestão proteica em quantidades maiores do que a dose mínima recomendada. Estes e outros fatores determinam a recomendação de que a maior proporção de ingestão calórica seja constituída por alimentos ricos em carboidratos. Atualmente recomenda-se que o suprimento energético seja fornecido pela ingestão de uma dieta contendo 60% de carboidratos, 30% de lipídios e, no mínimo, 10% de proteínas.

Quadro 18.6 Energia derivada da oxidação de compostos da dieta

Compostos	Energia	
	kcal/g	kJ/g
Carboidrato	4	17
Proteína	4	17
Lipídio	9	38
Etanol ¹	7	29

¹O álcool, consumido com moderação (5-10% das calorias ingeridas), é considerado como fonte de energia.

Uma quantidade mínima de carboidratos deve ser consumida

A maior parte dos carboidratos da dieta deve ser constituída por polissacarídeos, como o amido; açúcares devem compor uma fração menor, para não aumentar os níveis de insulina e, se os depósitos de glicogênio estiverem preenchidos, causar deposição de gordura. O amido é encontrado principalmente em cereais, farináceos, batatas e raízes; a sacarose, em alimentos doces, mel e algumas frutas, e a lactose, no leite e seus derivados. Em dietas hipocalóricas, a frutose tem sido recomendada em substituição à glicose, por ser mais lentamente absorvida e não induzir a liberação de insulina.

É necessário ingerir um mínimo de 5 g de carboidratos por 100 kcal ingeridas (150 g para uma dieta de 3.000 kcal). A ingestão de quantidades menores tem como consequência uma hipoglicemia, compensada pela intensificação da gliconeogênese a partir de aminoácidos, levando à espoliação proteica e, portanto, a um balanço de nitrogênio negativo. Fica evidente, portanto, a ação poupadora de proteínas desempenhada pelos carboidratos. Ademais, quando a demanda energética é suprida pela oxidação de lipídios, sem a concomitante oxidação de carboidratos, advém a cetose.

As doses recomendadas de proteínas pressupõem, portanto, a ingestão concomitante de doses adequadas de carboidratos e lipídios, de modo que a maior parte das proteínas exógenas possam ser utilizadas na reposição das proteínas endógenas, e não como fonte de energia.

Alguns polissacarídeos presentes nos alimentos não são utilizados pelos seres humanos como fonte de energia: são componentes da parede celular de tecidos vegetais, denominados conjuntamente de *fibras* . Um destes polissacarídeos, muito abundante em verduras, legumes, frutas e cereais, é a celulose, um polímero de unidades de glicose, unidas por ligações β -1,4. Nenhum vertebrado possui enzimas digestivas capazes de hidrolisar esta ligação; nos ruminantes, a digestão da celulose é feita por microrganismos simbioses. A presença de fibras na dieta dos seres humanos adultos é, entretanto, extremamente importante. As fibras estimulam o peristaltismo intestinal e são responsáveis pela consistência das fezes; sua ausência da dieta leva a um decréscimo da massa fecal, acarretando uma constipação crônica, associada a diversas condições patológicas, como hérnias do trato gastrointestinal, hemorróidas, câncer do cólon etc. Além disso, as fibras têm efeito hipocolesterolêmico.

Os lipídios fornecem os ácidos graxos essenciais

Os lipídios mais abundantes nos alimentos são os triacilgliceróis, constituintes dos óleos e gorduras. Do ponto de vista do fornecimento de energia, são compostos dispensáveis, podendo ser substituídos por carboidratos; por outro lado, são imprescindíveis por conterem os *ácidos graxos essenciais* e por serem o veículo para a absorção das *vitaminas lipossolúveis* . O ácido graxo essencial para o organismo humano é o ácido linoleico; ainda há dúvidas se o ácido α -linolênico é realmente essencial.

O ácido linoleico é precursor de outros ácidos graxos poliinsaturados e também dos eicosanóides (p. 209). Os ácidos graxos insaturados são, também, componentes dos fosfolipídios estruturais e sua carência acarreta alterações de membranas, que incluem o aumento da permeabilidade e a diminuição da resistência dos capilares sanguíneos. Como os lipídios geralmente perfazem uma fração significativa da dieta, deficiências de ácidos graxos essenciais são raras, tornando-se mais freqüentes quando a alimentação é parenteral. Para satis-

Quadro 18.7 Porcentagem de ácidos graxos saturados e insaturados em gorduras de origem animal, margarinas e óleos vegetais

	Saturados	Monoinsaturados	Poliinsaturados
Gorduras			
Manteiga	66	31	3
Toicinho	43	44	13
Margarinas¹	26	49	25
Óleos			
Amendoim	20	50	30
Algodão	27	22	51
Soja	15	25	60
Milho	13	25	62
Girassol	11	21	68
Oliva	14	77	9
Coco ²	92	6	2

¹A composição das margarinas varia segundo o óleo vegetal utilizado na sua fabricação.

²O óleo de coco e o óleo de algumas palmeiras tropicais são exemplos raros de óleos vegetais ricos em ácidos graxos saturados.

fazer as necessidades de ácidos graxos essenciais, são recomendados os óleos vegetais, que têm alto conteúdo de ácidos graxos insaturados (Quadro 18.7).

Os ácidos graxos insaturados têm, ainda, um papel importante na redução do nível plasmático do “mau colesterol” (LDL-colesterol) e de triacilgliceróis. Os ácidos graxos saturados, abundantes nas gorduras animais, têm efeito oposto e, por isto, devem compor, no máximo, 10% do conteúdo calórico da dieta. Porém, quando a substituição dos ácidos graxos saturados é feita por ácidos graxos poliinsaturados, há também uma pequena redução do “bom colesterol” (HDL-colesterol); isto não acontece quando há consumo de monoinsaturados (óleo de oliva), razão pela qual são, atualmente, os ácidos graxos insaturados mais recomendados. Ainda visando a um maior consumo de ácidos graxos insaturados, em relação aos saturados, preconiza-se a ingestão de margarinas, obtidas por hidrogenação parcial de ácidos graxos insaturados de óleos vegetais, de modo a elevar o seu ponto de fusão e propiciar uma consistência sólida à temperatura ambiente. Todavia, este processo produz grande quantidade de ácidos graxos com configuração *trans* (os ácidos graxos naturais têm configuração *cis*), que não apresentam atividade de ácidos graxos essenciais e cujos efeitos a longo prazo não são bem conhecidos, sobretudo no que diz respeito à prevenção da aterosclerose. Assim sendo, a substituição de manteiga por margarina na dieta de indivíduos hipercolesterolêmicos ainda é uma conduta muito controversa.

O nível plasmático de colesterol é muito pouco influenciado pelo teor de colesterol da dieta, devido à existência de uma via eficiente de síntese endógena, cuja velocidade é adaptada à quantidade de colesterol absorvido no intestino; os seres humanos podem, inclusive, prescindir de colesterol exógeno. O colesterol só é encontrado em tecidos animais, sendo especialmente abundante na gema do ovo e cérebro; é ausente dos vegetais. Acreditava-se, anteriormente, que uma maior ingestão de produtos animais, em relação a produtos vegetais, provocava aumento do colesterol plasmático, como resultado da ingestão aumentada de colesterol. Na realidade, eram os ácidos graxos saturados, igualmente abundantes nos produtos animais, os responsáveis pelo resultado obtido.

A interferência dos lipídios presentes na dieta sobre o teor de colesterol plasmático e sua correlação com a incidência de aterosclerose estão detalhados na regulação do metabolismo do colesterol (p. 291).

18.3 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição é o problema nutricional mais comum

As necessidades proteicas do organismo são satisfeitas com a ingestão da dose mínima recomendada de proteínas com altos valores de NPU, característicos das proteínas animais. Entretanto, o custo elevado dos

produtos de origem animal é responsável por sua escassez na dieta dos habitantes de países em desenvolvimento, ocasionando a desnutrição proteica crônica. Nestes países, a moléstia é comum na população adulta, mas afeta principalmente as crianças. Os altos índices de mortalidade infantil por infecções respiratórias e gastrointestinais são, na verdade, resultantes da desnutrição, que facilita a instalação e o progresso daquelas moléstias. Um estudo recente, realizado com crianças brasileiras, confirma que o fator determinante desta situação é, primordialmente, econômico. A avaliação da altura em relação à idade — um indicador importante do estado nutricional — mostrou que apenas as crianças pertencentes a núcleos familiares com renda acima de cinco salários mínimos apresentavam medidas coincidentes com o padrão internacional (Fig. 18.2). Duas síndromes de desnutrição são muito frequentes: kwashiorkor e marasmo.

O *kwashiorkor* (a palavra significa “doença do desmame” em um dialeto da África Ocidental) é uma moléstia que se manifesta em crianças após a interrupção do aleitamento, quando elas passam a ingerir alimentos contendo principalmente carboidratos, e com pequeno teor de proteínas, que, além do mais, são de baixa qualidade. Caracteriza-se, portanto, como uma desnutrição essencialmente proteica. As crianças afetadas apresentam desenvolvimento retardado, apatia extrema, anorexia, edema (acúmulo de água nos tecidos, resultante da diminuição da osmolaridade plasmática provocada pela baixa concentração de albumina), alterações de pele, cabelos e olhos, lesões hepáticas, queda da resistência a infecções etc. O balanço de nitrogênio é, naturalmente, negativo.

O *marasmo*, ainda mais comum que o *kwashiorkor*, é causado por deficiência proteica associada à deficiência calórica. Pode ser distinguido do *kwashiorkor* por uma diminuição ainda mais acentuada de peso, acompanhada por redução extrema da musculatura e ausência de edema. A deficiência generalizada de nutrientes,

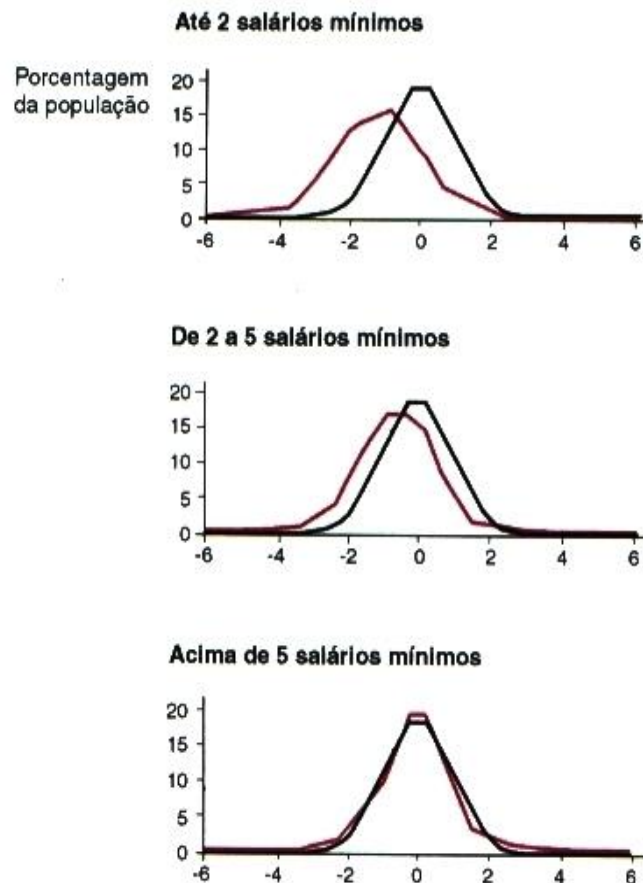


Fig. 18.2 Comparação da altura de crianças brasileiras, de até 10 anos, pertencentes a famílias com diferentes rendas, com o padrão internacional. As curvas coloridas referem-se às crianças brasileiras e as curvas em preto ao padrão ótimo de altura adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Os números nas abcissas indicam diferenças (em cm) em relação à altura média do padrão internacional. (Reproduzida de Sawaia, A. L. *Desnutrição Urbana no Brasil em um Período de Transição*. Editora Cortez, 1997.)

inclusive carboidratos, resulta em hipoglicemia crônica, que determina uma relação insulina/glucagon baixa. Os processos degradativos são estimulados: as proteínas musculares são consumidas lentamente, levando a um balanço negativo de nitrogênio. A intensa mobilização de proteínas tissulares seria responsável pela manutenção dos níveis de albumina compatíveis com a ausência de edema.

Marasmo e kwashiorkor nem sempre são síndromes inteiramente distinguíveis, pois encontra-se toda sorte de condições intermediárias. Além disso, as deficiências proteico-calóricas estão quase sempre associadas a deficiências de vitaminas e minerais, agravando o quadro.

18.4 MICRONUTRIENTES

Vitaminas e íons inorgânicos são fatores essenciais da dieta

Além dos macronutrientes — carboidratos, lipídios e proteínas — os seres humanos dependem da ingestão de pequenas quantidades de vitaminas e íons inorgânicos, conjuntamente denominados *micronutrientes*.

As vitaminas não são estocadas em níveis apreciáveis, devendo, portanto, ser supridas continuamente pela dieta. São classificadas em dois grandes grupos, segundo suas características de solubilidade.

As *vitaminas hidrossolúveis* incluem as vitaminas do complexo B (Quadro 5.11) e a vitamina C; são componentes de coenzimas, cuja atuação nas reações do metabolismo foi analisada ao longo deste texto. Eventuais excessos de vitaminas hidrossolúveis são excretados na urina e raramente provocam efeitos colaterais.

As *vitaminas lipossolúveis* — A, D, E e K — são eliminadas mais lentamente e a ingestão aumentada pode ocasionar efeitos danosos, particularmente no caso das vitaminas A e D. Ao contrário das hidrossolúveis, apresentam uma semelhança estrutural, por serem derivadas do isopreno. Ocorrem em alimentos de origem vegetal ou animal ricos em gordura; são absorvidas juntamente com os lipídios e, como estes, transportadas pelas lipoproteínas plasmáticas. Estão envolvidas em processos diversos, atuando, inclusive, como coenzimas. A vitamina K, por exemplo, participa como cofator de reações de carboxilação de resíduos de glutamato de várias proteínas, dentre as quais os fatores responsáveis pela coagulação sangüínea. A vitamina A, obtida a partir de carotenóides vegetais, está envolvida nas reações da visão e no crescimento e diferenciação de tecidos epiteliais; devido a esta última ação, o ácido retinóico — uma das formas da vitamina A — tem sido utilizado para a renovação da epiderme. Compostos precursores da vitamina D, presentes nos alimentos, são convertidos por radiação ultravioleta nas formas ativas, que atuam como hormônios reguladores do metabolismo do cálcio e fosfato.

A vitamina E, juntamente com as vitaminas A, C e D, atuam como *antioxidantes*, bloqueando a ação lesiva de radicais livres sobre as estruturas celulares. Acredita-se, atualmente, que radicais livres e outras espécies reativas estejam envolvidas em diversos processos patológicos. Estudos populacionais têm mostrado uma correlação significativa entre a incidência de câncer e doenças cardiovasculares, e o baixo consumo das vitaminas antioxidantes e de selênio. Por enquanto, não existe uma indicação explícita de suplementação de antioxidantes, recomendando-se, apenas, a ingestão de alimentos que os contenham em níveis significativos.

Os íons, também chamados de *nutrientes inorgânicos* ou *minerais*, além de atuarem como cofatores enzimáticos, participam de inúmeros processos importantes; são responsáveis, ainda, pela dureza de certas estruturas, como ossos e dentes. O número de minerais que são indispensáveis para a manutenção de um estado saudável é muito grande. Alguns, como Ca^{2+} , fosfato, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} etc., são necessários em quantidades da ordem de miligramas ou gramas, enquanto, para outros, bastam algumas dezenas de microgramas. Dentre estes, encontra-se o selênio, que é cofator da glutathione peroxidase (p. 163), responsável pela dissipação de peróxidos; assim, o selênio participa, como algumas vitaminas, do sistema antioxidante do organismo.

19

ESTRATÉGIAS DE REGULAÇÃO DO METABOLISMO

A estabilidade da massa corpórea e do aspecto geral de um indivíduo adulto e sadio esconde as grandes flutuações diárias de seu metabolismo. De fato, o hábito de ingerir alimentos através de refeições submete o organismo humano a situações opostas que, gradativamente, se alternam: abundância e escassez de nutrientes. Uma consequência importante desta alternância é a necessidade de haver estoques de energia para serem utilizados nos períodos de jejum. Além disso, a diversidade de composição das refeições implica uma variação qualitativa dos nutrientes absorvidos, cada um dos quais poderá ter mais de um destino metabólico. Por exemplo, a glicose absorvida após uma refeição poderá ser oxidada a CO_2 e H_2O , mas poderá também gerar aminoácidos não-essenciais ou ser polimerizada a glicogênio ou ainda ser armazenada como gordura. As vias metabólicas que levam a cada um destes produtos finais não funcionam com velocidades iguais. Ao contrário, cada via será acionada com intensidade variada, dependendo da situação fisiológica considerada, que se refere não apenas a estados nutricionais diferentes, mas, também, a demandas energéticas diferentes, como no repouso ou sob exercício vigoroso.

O ajuste do metabolismo às diferentes condições fisiológicas é obtido graças a processos que, em conjunto, são chamados de *regulação metabólica*. Os eventos de regulação não são isolados; cada um deles atua como um gerador primário de sinais, captados por geradores secundários, capazes de retransmiti-los até atingir toda a rede metabólica e repercutir, a distância, em outros órgãos. A complexidade do processo é enorme, mas justifica-se por permitir um ajuste sensívelíssimo do metabolismo a diferentes situações, propiciando uma resposta pronta e logicamente organizada.

Diante desta complexidade, o estudo da regulação metabólica será feito em três etapas. Neste capítulo serão analisadas as estratégias de que o organismo dispõe para regular o metabolismo; no próximo capítulo será apresentada a regulação, em separado, de cada via metabólica. No Capítulo 21, os dados recolhidos em cada uma das vias serão combinados para descrever a regulação metabólica integrada, frente a situações escolhidas como exemplos. Esta descrição compreenderá o metabolismo de alguns órgãos e a influência dos hormônios considerados mais relevantes. Finalmente, no Capítulo 22 serão analisadas as fontes de energia utilizadas pelo organismo para o exercício e o ajuste do metabolismo a esta situação.

Fundamentalmente, a regulação metabólica é feita por interferência direta em determinadas reações químicas que compõem o metabolismo, aumentando ou diminuindo sua velocidade. O resultado imediato desta alteração de velocidade é o aumento da oferta de substratos para as reações subsequentes ou o acúmulo de metabólitos, o que, indiretamente, irá afetar outras vias relacionadas. Assim, o efeito é propagado para toda a rede metabólica.

A forma mais eficiente de interferir na velocidade de uma reação catalisada é, naturalmente, alterar a *concentração* ou a *eficiência* do seu catalisador.

19.1 ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMAS

No caso das reações biológicas, o catalisador — a enzima — é sintetizado pelas próprias células e sua concentração pode ser alterada por variação na velocidade de sua síntese ou na velocidade de sua degradação. Este é um mecanismo de regulação a longo prazo, manifestando-se em tempos da ordem de horas ou dias. O controle da síntese de enzimas é exercido, basicamente, sobre a frequência de transcrição do gene estrutural que codifica a enzima, determinando uma alteração na concentração celular da proteína. A regulação da transcrição gênica é um processo complexo que pode depender de fatores que vão desde a concentração do substrato sobre o qual a enzima atua, até a ação de hormônios específicos. A velocidade de degradação de uma enzima também sofre controle rigoroso. Enzimas diferentes têm tempos de permanência diferentes nas células, ou seja, têm meias-vidas diferentes (Quadro 17.1). Em geral, as enzimas que catalisam reações-chave do metabolismo têm tempos curtos de vida. Esta contínua síntese e degradação proteica deve ser entendida como um processo de adaptação do metabolismo, que permite drenar o fluxo metabólico em uma ou outra direção, de acordo com as condições fisiológicas prevalentes no momento. Tais desvios seriam dificultados se a concentração das enzimas permanecesse constante em qualquer condição.

A concentração das enzimas pertencentes a uma determinada via metabólica varia com a oferta de substratos para a via; esta alteração, frequentemente, é mediada pela ação de hormônios, como insulina, glucagon e adrenalina. Assim, é sabido que, se a dieta contiver proteínas em abundância, a concentração das enzimas do ciclo da uréia é aumentada. Uma dieta rica em carboidratos provoca aumento das concentrações de várias enzimas da glicólise e da síntese de glicogênio, acionado por insulina. Este hormônio aumenta também a síntese de acetil-CoA carboxilase e da sintase de ácidos graxos, entre outras enzimas. Por outro lado, metabólitos derivados do colesterol inibem a síntese e estimulam a degradação da HMG-CoA redutase.

19.2 ALTERAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS

Mesmo durante o tempo em que a concentração de uma enzima é mantida constante, a velocidade da reação que ela catalisa pode variar em função da variação da concentração de substratos e coenzimas. Ainda mais importante é a existência de um segundo nível de regulação, mais imediato do que a alteração da concentração da enzima e que se manifesta a curto prazo, com tempo da ordem de segundos ou minutos: a velocidade da reação que as enzimas catalisam pode ser aumentada ou diminuída como resultado de mudanças conformacionais da própria enzima, provocadas por ligação de compostos ou grupos à cadeia polipeptídica. Esta ligação pode ser do tipo não-covalente (*regulação alostérica*) ou do tipo covalente (*regulação por modificação covalente*). A regulação alostérica da atividade das enzimas depende da concentração celular de determinados compostos que são claros indicadores das condições metabólicas da célula. A regulação por modificação covalente está sob influência indireta da ação hormonal, que coordenará a resposta do organismo como um todo. O alvo destas regulações são certas enzimas-chave, presentes nas vias metabólicas, chamadas *enzimas reguladoras*, cuja atividade será decisiva para o funcionamento de toda a via.

As regulações alostéricas e por modificação covalente terão seus princípios gerais descritos a seguir.

19.2.1 REGULAÇÃO ALOSTÉRICA

As enzimas reguladas por modificação não-covalente são chamadas *alostéricas*. Este tipo de enzima é encontrado em quase todas as vias metabólicas, catalisando geralmente uma reação irreversível localizada no início da via. Estruturalmente, são proteínas oligoméricas, compostas de várias cadeias polipeptídicas, cada uma com um sítio ativo. A ligação do substrato ao sítio ativo de uma subunidade afeta a conformação das outras, facilitando a ligação de outras moléculas de substrato aos outros sítios ativos. Esta cooperatividade, estabelecida entre os sítios catalíticos, é evidenciada pela cinética da catálise: o gráfico de velocidade da reação contra a concentração de substrato é uma *curva sigmóide*, ao invés da *curva hiperbólica* de Michaelis-Menten (Fig. 19.1 a). Trata-se do mesmo tipo de cooperatividade encontrada na ligação do oxigênio à hemoglobina, também uma proteína oligomérica, com um sítio de ligação para o oxigênio, o grupo heme, em cada subunidade. Em contraposição, a ligação do oxigênio à mioglobina é feita segundo uma cinética hiperbólica, como a das enzimas michaelianas. Estas enzimas apresentam, geralmente, uma única cadeia polipeptídica, com um só sítio ativo, assim como a mioglobina, que tem apenas

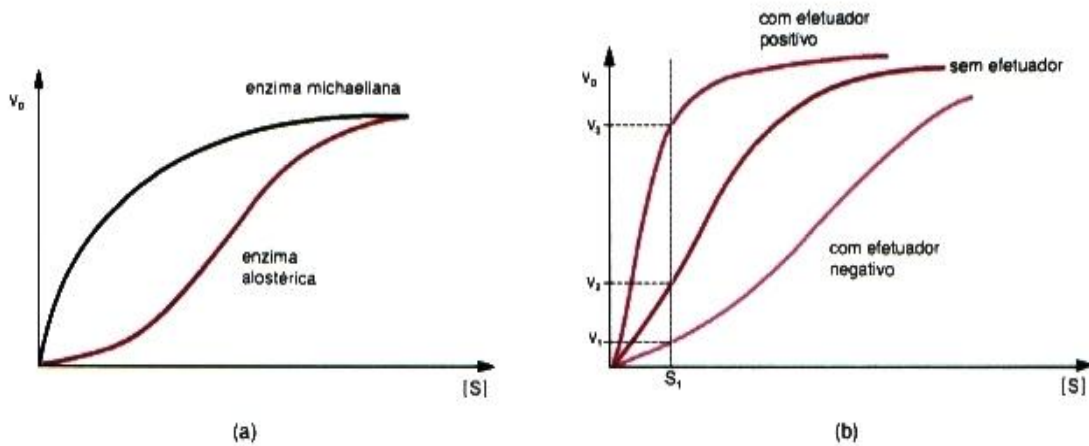


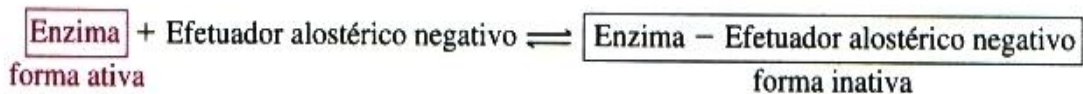
Fig. 19.1 a) Gráfico da velocidade de reação em função da concentração de substrato para uma enzima alostérica e para uma enzima michaeliana. A curva sigmoideal exibida pela enzima alostérica é o reflexo da cooperatividade apresentada pelas suas subunidades; as enzimas monoméricas, michaelianas, têm cinética hiperbólica. b) Cinética da reação catalisada por uma enzima alostérica na presença e na ausência de efetadores alostéricos. Note-se que, para concentrações não-saturantes de substrato, a velocidade da reação varia grandemente dependendo da presença de efetadores.

uma cadeia polipeptídica, com um único grupo heme. Mesmo enzimas oligoméricas podem apresentar cinética michaeliana, desde que não exista efeito cooperativo entre suas subunidades.

As enzimas alostéricas são sensíveis reguladores do metabolismo graças à possibilidade de ligarem-se a determinados metabólitos celulares, o que provoca grandes alterações de sua atividade. Estes metabólitos, os *efetadores* ou *moduladores alostéricos*, são chamados *positivos* (ou *ativador alostérico*) ou *negativos* (ou *inibidor alostérico*), segundo provoquem aumento ou redução da velocidade da reação catalisada (Fig. 19.1 b). Um efetador alostérico liga-se a um nicho específico da estrutura tridimensional da enzima, chamado *centro* ou *sítio alostérico*, que é tão específico para o efetador quanto o sítio ativo é para o substrato.

As enzimas alostéricas caracterizam-se por apresentarem duas conformações espaciais diferentes e interconversíveis, com alta ou baixa afinidade pelo substrato. O efeito dos efetadores alostéricos pode ser explicado por sua ligação preferencial a uma das formas — muito ativa ou pouco ativa — da enzima. Como esta ligação estabiliza a enzima em uma dada forma, os efetadores alostéricos atuam como inibidores ou ativadores da reação enzimática.

Como a ligação dos efetadores à enzima é não-covalente e reversível, o percentual de enzima que se encontrará na forma ativa ou inativa vai depender da concentração do efetador alostérico. Por exemplo:



Em uma dada situação fisiológica, se a concentração do efetador alostérico negativo for baixa, praticamente todas as moléculas de enzima estarão ativas; à medida que a concentração do efetador aumenta, percentuais crescentes de enzima estarão a ele ligadas e, portanto, inativas. Quando o inibidor alostérico (que é um produto do metabolismo) for consumido por qualquer outra reação celular e sua concentração decrescer, percentuais cada vez maiores de enzima voltarão à forma ativa.

Uma mesma enzima alostérica pode ser regulada por efetadores alostéricos positivos e negativos que poderão estar presentes em diferentes concentrações. Assim, a velocidade da reação que ela catalisa pode variar em uma larga faixa — a menor velocidade possível será obtida na presença de concentrações altas do efetador negativo, e a maior velocidade, na presença de grandes concentrações do efetador positivo. Desta forma, *para uma mesma concentração de substrato e mesma concentração de enzima*, a velocidade da reação catalisada por uma enzima alostérica pode apresentar grande variação; note-se, na Fig. 19.1 b, os valores diferentes de velocidade (v_1 , v_2 , v_3), obtidos com a concentração S_1 de substrato. Esta capacidade não é encontrada nas enzimas michaelianas, para as quais, salvo em concentrações saturantes, cada concentração de substrato provoca uma única velocidade de reação.

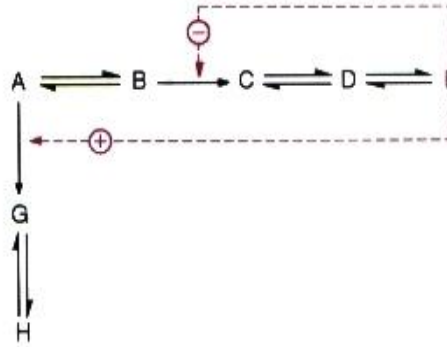


Fig. 19.2 Regulação alostérica de duas vias metabólicas hipotéticas. No esquema apresentado, o composto F é efetor alostérico negativo da enzima que catalisa a conversão de B em C e efetor alostérico positivo da enzima que converte A em G. Neste esquema, a oferta de A resultará em síntese aumentada de H.

Nas vias metabólicas é frequente que o produto final atue como efetor alostérico negativo de uma enzima alostérica que catalisa uma das primeiras reações da via (Fig. 19.2). Quando aumenta a concentração celular deste produto, sua atuação como inibidor alostérico faz diminuir a velocidade da via, restringindo sua própria produção. Este é o mecanismo conhecido como *inibição por feedback* ou *retroinibição*. À medida que o metabólito é consumido por outras seqüências metabólicas e sua concentração diminui, percentuais crescentes de enzima voltam à forma ativa, aumentando a velocidade da via. Note-se que a localização da enzima reguladora em uma etapa inicial da via é estratégica, constituindo um fator de economia celular, impedindo o acúmulo de intermediários que poderiam interferir de modo negativo sobre outras vias. Muitas vezes, o produto final de uma via atua também como efetor alostérico positivo em uma outra via metabólica que utiliza o mesmo substrato inicial. Naturalmente, esta segunda via dispõe de seus próprios efetores alostéricos e sua regulação irá interferir em uma terceira via, e assim por diante. O resultado final desta série de interferências é o rigoroso ajuste da produção de cada composto ao seu consumo e o funcionamento harmônico e coordenado das reações que compõem o metabolismo celular.

As coenzimas são efetores alostéricos importantes

A função de modulador alostérico não é exercida apenas por compostos intermediários do metabolismo — é muito frequente que coenzimas também desempenhem este papel, ligando-se ao sítio alostérico. Uma coenzima pode participar de uma reação exercendo seu papel precípua de coenzima, ligando-se ao sítio ativo da enzima; a mesma coenzima pode atuar como efetor alostérico de outra enzima, ligando-se, neste caso, ao sítio alostérico e alterando a velocidade da reação. Casos mais complexos ocorrem quando a coenzima de uma reação atua como inibidor alostérico da mesma enzima, sendo, portanto, reconhecida tanto pelo sítio ativo como pelo sítio alostérico. O exemplo clássico é o ATP na reação catalisada pela fosfofrutoquinase 1. Este caso constitui um aparente paradoxo, pois a ligação da coenzima ao sítio alostérico impediria sua ligação ao sítio ativo, inviabilizando a reação. Na realidade, a afinidade da coenzima pelo sítio ativo é muito maior do que pelo sítio alostérico. Em baixas concentrações da coenzima, a ligação com o sítio ativo é favorecida; em altas concentrações, a ligação com o sítio alostérico torna-se possível e a reação passa a ser inibida.

O Quadro 19.1 alista as enzimas alostéricas mais importantes, bem como seus principais efetores positivos e negativos.

As coenzimas, além de atuarem como efetores alostéricos, podem determinar a velocidade das reações das quais participam em função de sua concentração. Em cada reação a coenzima é utilizada em quantidade estequiometricamente equivalente à do substrato e, como as concentrações celulares das coenzimas são muito inferiores às dos substratos, elas são, portanto, limitantes da velocidade da reação. A ação contínua das coenzimas é viabilizada pelo fato de oscilarem constantemente entre suas duas formas possíveis: NAD^+ e NADH , ATP e ADP etc. As mesmas coenzimas participam de muitas vias metabólicas diferentes, algumas das quais consomem a forma oxidada da coenzima, e outras, a forma reduzida. É o caso, por exemplo, do

Quadro 19.1 Principais enzimas alostéricas e seus efetadores

Enzima	Efetadores alostéricos	
	Negativos	Positivos
Hexoquinase	Glicose 6-fosfato	
Fosfofrutoquinase 1	ATP, Citrato	AMP, Frutose 2,6-bisfosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase	AMP, Frutose 2,6-bisfosfato	
Fosfofrutoquinase 2	Citrato, Fosfoenolpiruvato	AMP
Frutose 2,6-bisfosfatase	Frutose 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato
Piruvato quinase		Frutose 1,6-bisfosfato
Piruvato desidrogenase	Acetil-CoA, NADH, ATP	
Piruvato carboxilase		Acetil-CoA
Isocitrato desidrogenase	NADH	ADP
α -Cetoglutarato desidrogenase	Succinil-CoA, NADH, ATP	
Acetil-CoA carboxilase	Acil-CoA	Citrato
Carnitina acil transferase I	Malonil-CoA	
Citrato liase	Acil-CoA	

ciclo de Krebs, que utiliza a forma oxidada de NAD^+ e FAD e produz as respectivas formas reduzidas; em contrapartida, a cadeia de transporte de elétrons recebe as coenzimas reduzidas e oxida-as. Estas vias podem, então, trabalhar em associação utilizando uma pequena quantidade absoluta de coenzimas, reciclando-as permanentemente. É também o que ocorre com a via das pentoses-fosfato e a síntese de ácidos graxos. O NADPH, a forma predominante da coenzima no citossol, inibe as desidrogenases da via das pentoses-fosfato; assim, somente quando processos de sínteses redutoras, como a síntese de ácidos graxos, fazem diminuir a concentração citossólica de NADPH e aumentar a de NADP^+ , as desidrogenases e, por consequência, a via das pentoses podem funcionar.

A soma das concentrações celulares das duas formas de uma coenzima é constante ($[\text{NAD}^+ + \text{NADH}]$, $[\text{ATP} + \text{ADP}]$ etc.), de modo que o aumento da concentração de uma das formas é sempre acompanhado pela diminuição da outra forma. A proporção entre as duas formas varia com o compartimento celular. Em hepatócitos, por exemplo, a razão ATP/ADP é 10 vezes maior no citossol do que na mitocôndria. No citossol das mesmas células, a razão NAD^+/NADH é próxima de 1.000 e a razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ é cerca de 0,01. Há, portanto, grande disponibilidade de NAD^+ para os processos oxidativos e de NADPH para os processos biossintéticos.

As coenzimas constituem indicadores sensíveis da fisiologia celular, e pequenas alterações na concentração de uma de suas formas são imediatamente percebidas pelas reações que se processam naquele compartimento celular e, subsequentemente, pelos ciclos metabólicos de outros compartimentos. Quando, por exemplo, a fibra muscular executa contração intensa, com um aporte insuficiente de oxigênio, o aumento da concentração mitocondrial de NADH é refletido no citossol, “forçando” a reação catalisada pela lactato desidrogenase no sentido da formação de lactato, regenerando NAD^+ .

19.2.2 REGULAÇÃO POR MODIFICAÇÃO COVALENTE

A atividade de uma enzima pode ser drasticamente alterada pela ligação covalente de certos grupos à cadeia polipeptídica, modificando grandemente sua conformação. A alteração de atividade é decorrente de uma mudança na afinidade pelo substrato ou na sensibilidade aos efetadores alostéricos.

A modificação covalente constitui uma reação química — ao contrário da ligação não-covalente de efetadores alostéricos — e é, portanto, catalisada por enzimas. A modificação de atividade não é definitiva, pois este sistema de controle também inclui enzimas capazes de catalisar a retirada do grupo adicionado, devolvendo a enzima modificada à sua conformação original. Várias são as modificações possíveis (metilação, adenilação, acetilação etc.), mas a mais freqüente consiste na fosforilação da cadeia polipeptídica.

Quadro 19.2 Modificação da atividade enzimática por fosforilação

Via metabólica	Enzima fosforilada	Atividade
Glicogenólise	Fosforilase quinase	Ativa
	Proteína inibidora da fosfoproteína fosfatase 1	Ativa
	Glicogênio fosforilase	Ativa
Glicogênese	Glicogênio sintase	Inativa
Glicólise e gliconeogênese	Fosfofrutoquinase 2	Inativa
	Frutose 2,6-bisfosfatase	Ativa
	Piruvato quinase	Inativa
Piruvato → Acetil-CoA	Piruvato desidrogenase	Inativa
Lipólise	Lipase	Ativa
Lipogênese	Acetil-CoA carboxilase	Inativa

A fosforilação é catalisada por *proteína quinases*, que transferem o grupo fosfato terminal do ATP para resíduos específicos de serina, treonina ou de tirosina, formando uma ligação éster fosfórico:



Em cada tecido há determinadas proteínas que são substratos das proteína quinases. A fosforilação pode transformá-las de inativas em ativas, ou vice-versa (Quadro 19.2). As próprias proteína quinases estão sujeitas a regulação, podendo ser ativadas por mecanismos diversos, mediados por AMP cíclico ou íons Ca^{2+} por exemplo.

A retirada do grupo fosfato, introduzido pela ação das proteína quinases, é catalisada pelas *fosfoproteína fosfatases* (ou *proteína fosfatases*), através de hidrólise:



O controle da atuação das fosfoproteína fosfatases (denominadas 1, 2 etc.) é menos conhecido do que o das proteína quinases.

A predominância de uma das formas — fosforilada ou desfosforilada — de uma dada proteína dependerá, portanto, da enzima que estiver ativada: proteína quinase ou proteína fosfatase. Nos animais superiores, o mecanismo geral de regulação por modificação covalente está intimamente associado à ação hormonal.

19.3 AÇÃO HORMONAL

Os organismos superiores têm seu metabolismo regulado de forma global e integrada. Nestes organismos, há uma especialização de funções, distribuídas pelos diferentes órgãos ou tecidos, que, embora desempenhando papéis específicos, não são autônomos, mas devem reagir de forma concertada a um determinado estímulo. A coordenação das respostas dos diferentes órgãos e tecidos ao mesmo sinal permite a reação adequada do organismo como um todo e é obtida pela ação de *hormônios*. A atuação de cada hormônio sobre cada tecido é específica, provocando resposta também específica, mas o conjunto das respostas é cooperativo, tornando lógico e harmônico o ajuste do organismo a uma determinada condição fisiológica.

A interferência hormonal sobre a velocidade das reações do metabolismo depende do hormônio e do tecido considerados e é exercida, como foi assinalado, em dois níveis diferentes: indução ou repressão da síntese de determinadas enzimas e modificação covalente de enzimas suscetíveis em cada tecido.

Os hormônios são os primeiros mensageiros do sistema endócrino

Os hormônios são compostos sintetizados pelo sistema endócrino e secretados na corrente sanguínea. Ao atingirem células sensíveis — *células-alvo* —, vão provocar modificações de seu metabolismo, por interferência na atividade de enzimas, no controle da expressão gênica ou no transporte através de membranas. São,

portanto, os *primeiros mensageiros* químicos, extracelulares, do sistema endócrino, que, juntamente com o sistema nervoso, constituem os sistemas responsáveis pela integração das funções vitais nos animais.

Alguns tipos importantes de hormônios são os *esteróides* (cortisol, aldosterona, testosterona e progesterona), os *tireoídicos* (tiroxina e triiodotironina), os *peptídicos* (insulina e glucagon) e as *catecolaminas* (adrenalina e noradrenalina).

Os receptores hormonais localizam-se no citossol, no núcleo ou na membrana plasmática das células-alvo

A ação hormonal é iniciada pela interação do hormônio com receptores específicos presentes nas células-alvo. A localização dos receptores depende do tipo de hormônio; podem situar-se no citossol, no núcleo ou na membrana plasmática das células. Os receptores são proteínas, capazes de ligarem-se aos hormônios com grande afinidade: os efeitos dos hormônios são verificados com concentrações plasmáticas menores do que 10^{-10} M. Por ocorrerem no plasma, os hormônios são distribuídos por todo o organismo, e é a presença do receptor que torna uma célula responsiva ao hormônio.

Os receptores dos hormônios esteróides são proteínas solúveis, presentes no citossol das células-alvo. A solubilidade destes hormônios em lipídios permite sua rápida difusão pela membrana plasmática, propiciando sua ligação aos receptores. O complexo hormônio-receptor transloca-se para o núcleo e fixa-se a sítios específicos do DNA. Os hormônios tireoídicos também atravessam a membrana plasmática e têm seus receptores no núcleo; o complexo hormônio-receptor também se liga a sítios específicos da cromatina. A ação destes dois tipos de hormônios será, portanto, exercida ao nível da expressão gênica, alterando a velocidade de transcrição de determinados genes. Geralmente, a consequência da ligação do complexo hormônio-receptor é a ativação da transcrição gênica, com a consequente produção de proteínas. A resposta do tecido ao estímulo hormonal é resultado da ação destas proteínas.

Os receptores dos hormônios peptídicos e das catecolaminas são proteínas situadas na membrana plasmática. Assim sendo, estes hormônios não penetram nas células. Entretanto, a formação do complexo hormônio-receptor inicia, na membrana, uma seqüência de eventos que leva à produção intracelular de um *segundo mensageiro* químico da ação hormonal. A atuação deste segundo mensageiro sobre as reações processadas na célula-alvo resulta na resposta característica de um dado tecido a um determinado hormônio, sem que este tenha sido introduzido na célula. O mecanismo pelo qual o estímulo hormonal repercute nas reações intracelulares é chamado *transdução de sinal*.

Os segundos mensageiros da ação hormonal constituem uma classe de compostos agrupados não pela estrutura química, mas pela sua função. Alguns exemplos importantes são: AMP cíclico, íons Ca^{2+} e derivados de fosfolipídios de membrana.

O AMP cíclico é o segundo mensageiro de vários hormônios peptídicos e de catecolaminas

O segundo mensageiro mais bem conhecido atualmente é a *adenosina 3',5'-monofosfato*, o *AMP cíclico* (*cAMP*). Este nucleotídeo é sintetizado a partir de ATP, por ação da *adenilato ciclase*, uma enzima localizada na face interna da membrana plasmática. A presença de cAMP nas células irá provocar alterações nas atividades de determinadas enzimas e, por consequência, a modificação do metabolismo que constitui a resposta celular ao estímulo hormonal. Esta resposta é temporária, porque o cAMP pode ser hidrolisado a 5'-AMP por uma reação catalisada pela *fosfodiesterase* (Fig. 19.3). A concentração celular de cAMP e, portanto, a resposta ao hormônio estão na dependência das atividades relativas da adenilato ciclase e da fosfodiesterase.

A transdução de sinal dos hormônios que utilizam cAMP como segundo mensageiro depende de três proteínas presentes na membrana plasmática: o receptor hormonal, a adenilato ciclase e uma proteína da família das proteínas G, que conecta as duas primeiras. As *proteínas G* são assim designadas pela propriedade de ligarem-se a nucleotídeos de guanina, GDP e GTP. São compostas de três subunidades, α , β e γ , e é a subunidade α que tem a capacidade de associação a GDP ou GTP: na ausência do hormônio está ligada a GDP e na presença dele, a GTP. Os eventos que levam à produção de cAMP a partir do estímulo hormonal são os seguintes (Fig. 19.4 a):

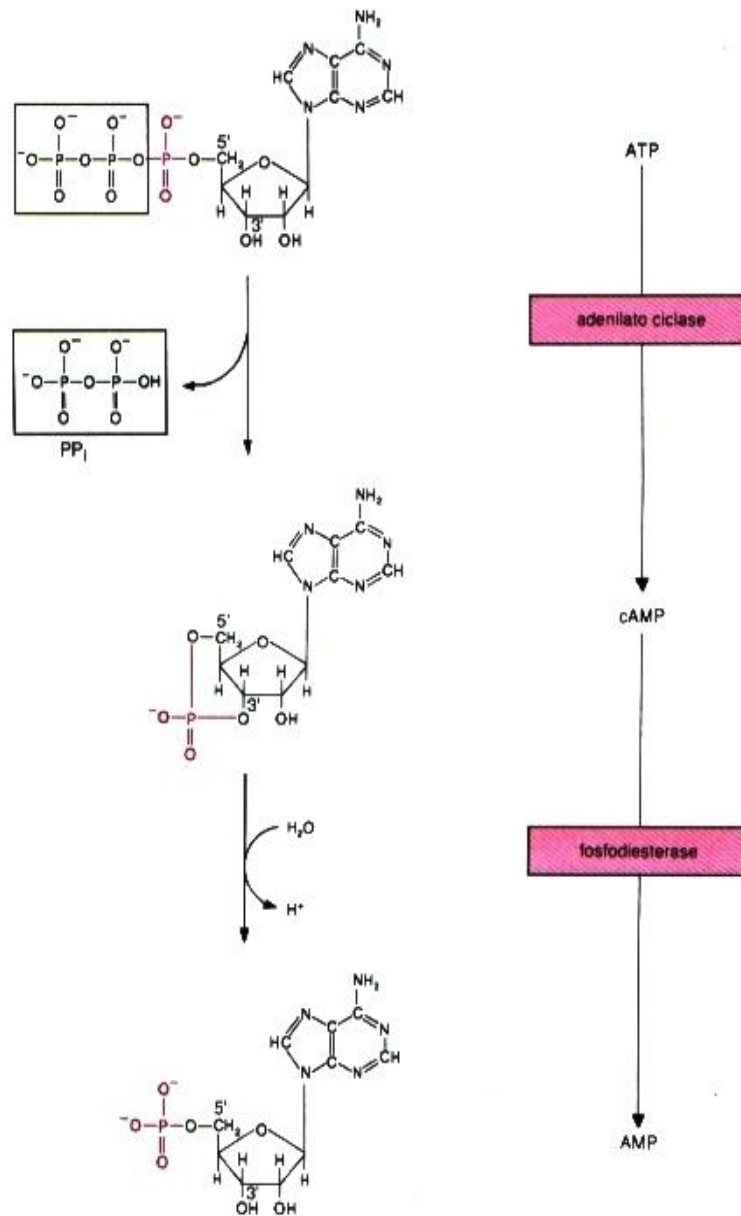


Fig. 19.3 Reações de síntese e degradação de adenosina 3',5'-monofosfato, o AMP cíclico (cAMP). Sua concentração celular está na dependência das atividades relativas da adenilato ciclase e da fosfodiesterase.

1. Ligação do hormônio ao receptor, na face externa da membrana plasmática.
2. O receptor, agora complexado com o hormônio, sofre uma mudança de estrutura, que provoca sua ligação à proteína G.
3. Na ausência do hormônio, a subunidade α apresentava-se unida a GDP. A ligação do complexo hormônio-receptor à proteína G altera sua estrutura, fazendo diminuir a afinidade de α por GDP e aumentar a afinidade por GTP. Em conseqüência, o GDP é trocado por GTP.
4. A ligação de GTP a α promove sua dissociação das outras duas unidades da proteína G, e o complexo α -GTP move-se pela membrana até ligar-se à adenilato ciclase, formando o complexo α -GTP-adenilato ciclase.
5. A adenilato ciclase estava inativa, mas a ligação de α -GTP estimula esta enzima e, portanto, o cAMP é produzido.

A estimulação da adenilato ciclase é pouco duradoura. A própria subunidade α tem atividade GTPásica, ou seja, é capaz de catalisar a hidrólise de GTP a GDP. Quando isto acontece com o GTP a ela ligado, há dissociação

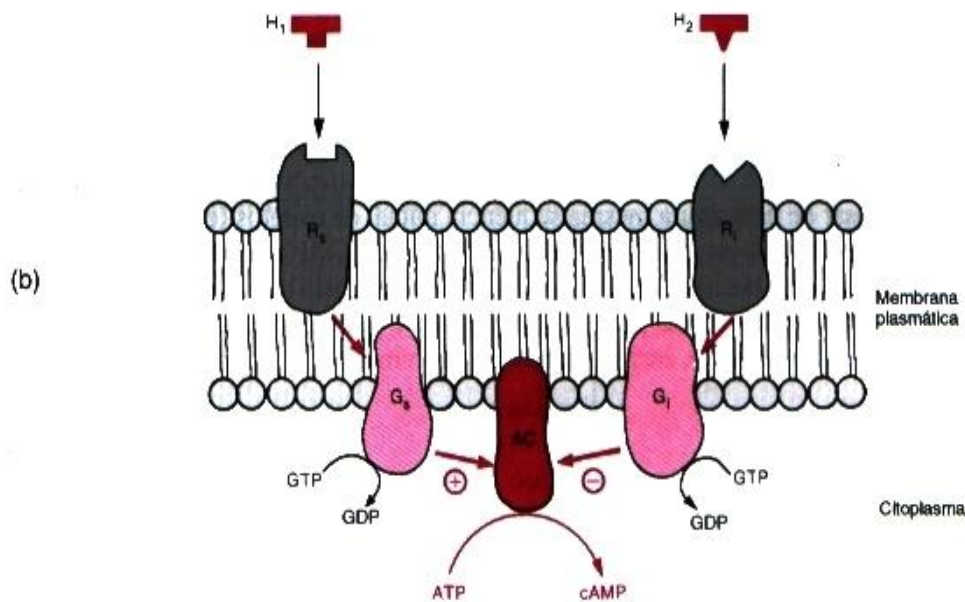
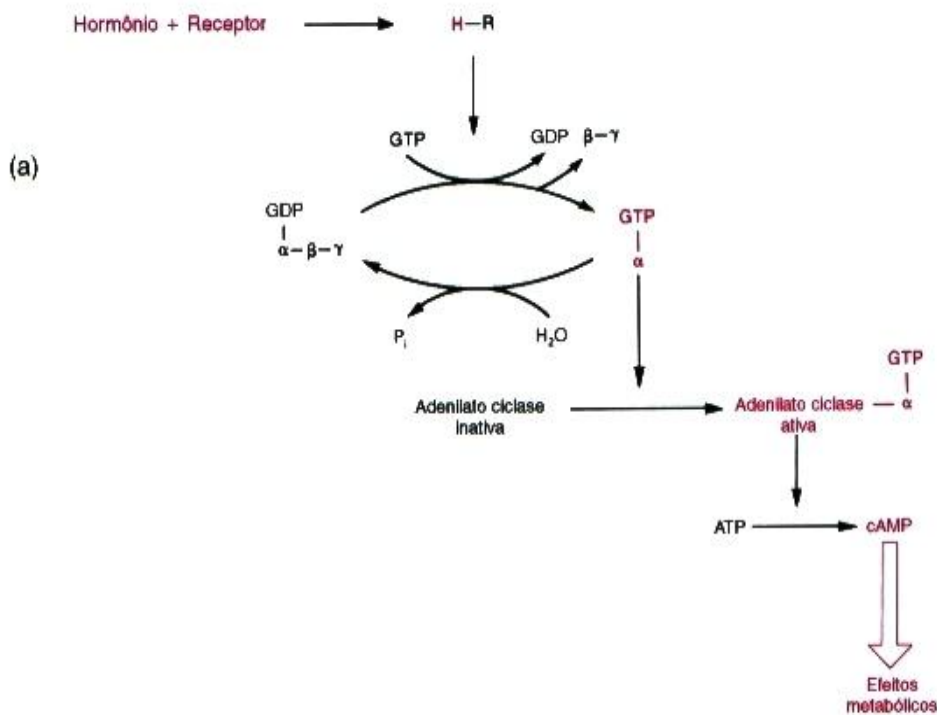


Fig. 19.4 (a) Seqüência dos eventos que levam à formação de cAMP. O complexo hormônio-receptor (H-R) induz a troca do GDP ligado à subunidade α da proteína G por GTP; após dissociação das subunidades $\beta-\gamma$, o complexo α -GTP liga-se à adenilato ciclase, ativando-a. A atividade GTPásica da subunidade α resulta na diminuição gradual do estímulo da adenilato ciclase, até novo impulso hormonal. (b) Esquema da regulação da adenilato ciclase (AC) por hormônios estimuladores (H_1) ou inibidores (H_2) da sua atividade. O complexo hormônio-receptor induz a ligação de GTP à proteína reguladora G_s ou G_i , que provocam, respectivamente, o estímulo ou a inibição da enzima.

ação do complexo α -GDP-adenilato ciclase e a subunidade α volta a associar-se às subunidades β e γ , reconstituindo a proteína G. Em virtude da ação GTPásica da subunidade α , a atividade da adenilato ciclase depende de estimulação hormonal contínua, cessando na ausência do hormônio.

O mecanismo descrito refere-se à ação de hormônios que ativam a adenilato ciclase. Em outros casos, ocorre o inverso, ou seja, há hormônios, reconhecidos por receptores diferentes dos anteriores, que produzem uma inibição da adenilato ciclase. O processo que resulta nesta inibição é análogo ao do estímulo (Fig. 19.4 b). Na verdade, existem dois tipos de proteínas G: o primeiro deles, designado G_s , com subunidade α chamada α_s (*s* de *stimulation*), está associado a receptores de hormônios que provocam o estímulo da adenilato ciclase, receptores denominados R_s . O segundo tipo é chamado G_i , com subunidade α indicada por α_i (*i* de *inhibition*), e intermedeia a ação de hormônios que levam à inibição da adenilato ciclase. Após a ligação desta categoria de hormônio a seu receptor, do tipo R_i , os eventos são semelhantes ao caso do estímulo: troca de GDP por GTP e ligação de α_i -GTP a adenilato ciclase. Esta ligação, entretanto, provoca inibição da enzima (Fig. 19.4b). Alguns hormônios, como as catecolaminas, podem ligar-se, em tecidos diferentes, a receptores R_s ou R_i .

O nível intracelular de cAMP pode encontrar-se elevado em virtude da ativação da adenilato ciclase ou da inibição da fosfodiesterase. A *toxina da cólera*, por exemplo, determina a ativação da adenilato ciclase. Esta toxina é uma enzima que catalisa a transferência de uma unidade ADP-ribose do NAD^+ para um resíduo de arginina da subunidade α_s . Esta modificação covalente determina a perda da atividade GTPásica de α_s , que permanece ligada a GTP, mantendo ativada a adenilato ciclase mesmo na ausência do hormônio. O nível elevado de cAMP nas células da mucosa intestinal acelera o transporte de íons, resultando em grande afluxo de sódio e água para a luz intestinal, ocasionando a diarreia profusa característica da cólera. Por outro lado, inibidores da fosfodiesterase, como *caféina* e *teofilina*, também determinam níveis celulares altos de cAMP, simulando ou potencializando a ação hormonal.

Estimulada por cAMP, a proteína quinase promove a fosforilação de proteínas

O cAMP exerce seus efeitos intracelulares ativando um tipo particular de proteína quinase, chamada *proteína quinase dependente de cAMP*, para distingui-la de outras que são ativadas por Ca^{2+} ou por GMP cíclico (cGMP). A proteína quinase dependente de cAMP é uma enzima oligomérica, composta por subunidades catalíticas e subunidades reguladoras que, quando associadas, formam um complexo inativo. O cAMP liga-se às subunidades reguladoras, provocando a dissociação das subunidades catalíticas, que então tornam-se ativas (Fig. 19.5).

A ação catalítica da proteína quinase (a fosforilação de proteínas) é exercida sobre proteínas diferentes, dependendo da equipe de proteínas sintetizadas pelo tecido-alvo do hormônio que provocou o aumento de cAMP. Algumas destas proteínas tornam-se ativas em virtude da fosforilação; outras perdem a atividade. Sendo assim, um mesmo hormônio, apesar de provocar a mesma seqüência inicial de eventos (elevação nos níveis celulares de cAMP e conseqüente ativação da proteína quinase dependente de cAMP), levará a respostas metabólicas diferentes em cada tecido porque as enzimas que serão fosforiladas em cada tecido também serão diferentes.

A fosforilação de proteínas, catalisada pela proteína quinase, não é permanente. A ação desta enzima é revertida pela fosfoproteína fosfatase 1 (Seção 19.2), enzima hidrolítica que remove o grupo fosfato adicionado pela proteína

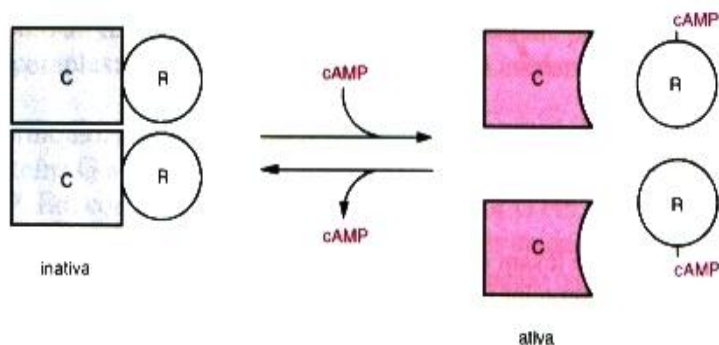


Fig. 19.5 Esquema da ativação da proteína quinase dependente de AMP cíclico. A enzima é formada por duas subunidades catalíticas (C) e por duas subunidades reguladoras (R). A ligação de cAMP às subunidades reguladoras provoca a dissociação das subunidades catalíticas, que passam a ser ativas.

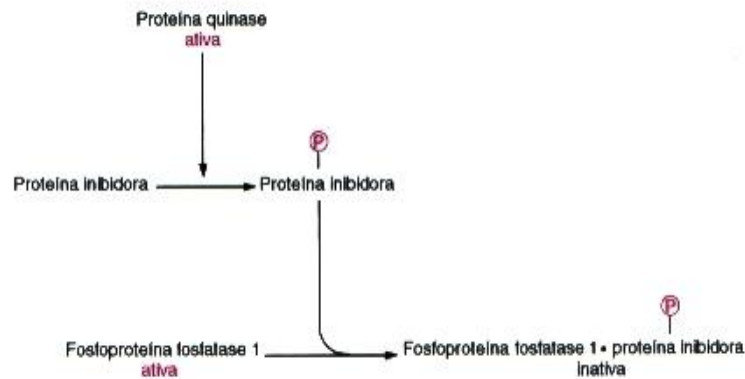


Fig. 19.6 Inibição da fosfoproteína fosfatase 1, induzida pela proteína quinase dependente de cAMP.

quinase dependente de cAMP, devolvendo a enzima à forma desfosforilada. A atuação da fosfoproteína fosfatase 1 também é regulada pelo cAMP: uma das proteínas-substrato da proteína quinase é a *proteína inibidora da fosfoproteína fosfatase 1*. Quando fosforilada, esta proteína inibidora liga-se à fosfoproteína fosfatase 1, inativando-a (Fig. 19.6). Adicionalmente, a própria fosfoproteína fosfatase 1 pode ser fosforilada pela proteína quinase dependente de cAMP, resultando também a sua inibição (ver Regulação do Metabolismo do Glicogênio, Capítulo 20). Assim, a própria proteína quinase dependente de cAMP mantém a fosfoproteína fosfatase 1, cuja ação é antagônica à da proteína quinase, na forma inativa.

Em resumo, pode-se dizer que a resposta celular a um dado hormônio que utiliza cAMP como segundo mensageiro depende, em primeiro lugar, da existência de receptores específicos na membrana plasmática e, em segundo lugar, das funções exercidas pelas enzimas que, naquela célula, serão alteradas por fosforilação.

Entre os hormônios que utilizam cAMP como segundo mensageiro, dois estão diretamente ligados à regulação do metabolismo: a adrenalina e o glucagon.

Íons Ca^{2+} e derivados de fosfolipídios de membrana atuam como segundos mensageiros

A atuação de hormônios, como a adrenalina, via receptores α_1 (Seção 19.4), resulta em aumento da concentração citossólica de Ca^{2+} , liberado dos depósitos intracelulares deste íon, as vesículas do retículo endoplasmático (retículo sarcoplasmático em células musculares).

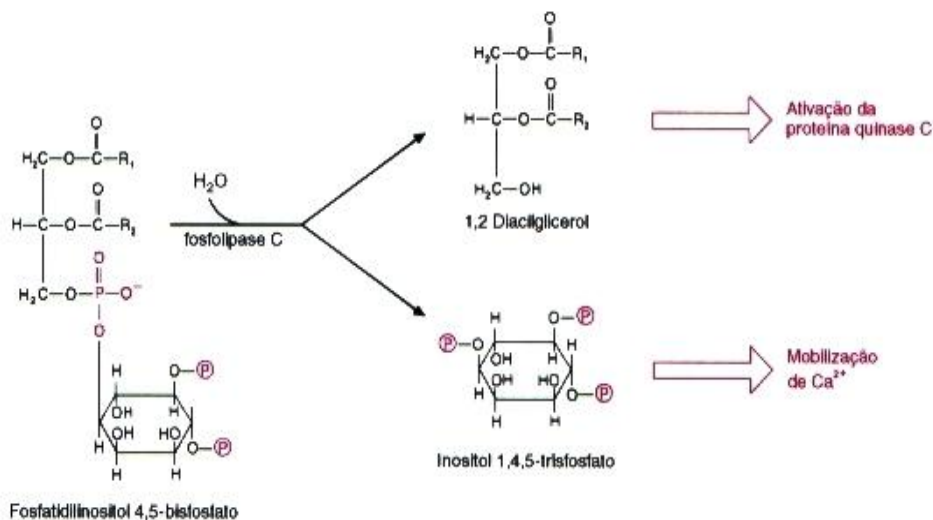


Fig. 19.7 Estruturas do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) e dos produtos de sua hidrólise, catalisada pela fosfolipase C.

A ligação do hormônio ao receptor ativa uma proteína G específica que estimula uma fosfolipase de membrana, a *fosfolipase C*. Esta enzima catalisa a hidrólise de *fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (FIP₂)*, um componente minoritário da membrana plasmática, produzindo *inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃)* e *1,2 diacilglicerol (DG)* (Fig. 19.7). IP₃ é hidrossolúvel e difunde-se para o citossol, induzindo a liberação de Ca²⁺ dos reservatórios celulares; constitui, assim, o elo de ligação entre o hormônio (complexado com o receptor na membrana plasmática) e o *pool* interno de Ca²⁺ (Fig. 19.8). Nas células musculares, os íons Ca²⁺ desencadeiam a contração e promovem a degradação do glicogênio (Capítulo 22). Em outras células, ligam-se à *calmodulina* (ver a seguir), uma proteína reguladora de muitos processos celulares, que exerce esta ação por ativar uma série de proteínas (incluindo diversas quinases) quando ligada àqueles íons.

O diacilglicerol permanece ligado à membrana e, na presença de Ca²⁺, ativa uma proteína quinase de membrana, a *proteína quinase C*, que catalisa a fosforilação de um conjunto de proteínas, diferente do conjunto modificado pelo complexo Ca²⁺ · calmodulina. A alteração da atividade de todas estas proteínas-alvo desencadeia a resposta celular ao hormônio.

O complexo Ca²⁺ · calmodulina e cAMP interagem na regulação da atividade celular

A *calmodulina* (em inglês, *calmodulin*, de *calcium-modulating protein*), além de constituir a subunidade receptora de íons Ca²⁺ da glicogênio fosforilase quinase, ocorre sob forma livre na maioria das células de animais e vegetais. A calmodulina é uma proteína pequena, tendo uma sequência de aminoácidos que apresenta 70% de homologia com a troponina C e quatro sítios de ligação para Ca²⁺ (Fig. 19.9). A ocupação destes sítios por Ca²⁺ determina uma mudança conformacional na calmodulina, que pode então ligar-se a várias proteínas-alvo, alterando

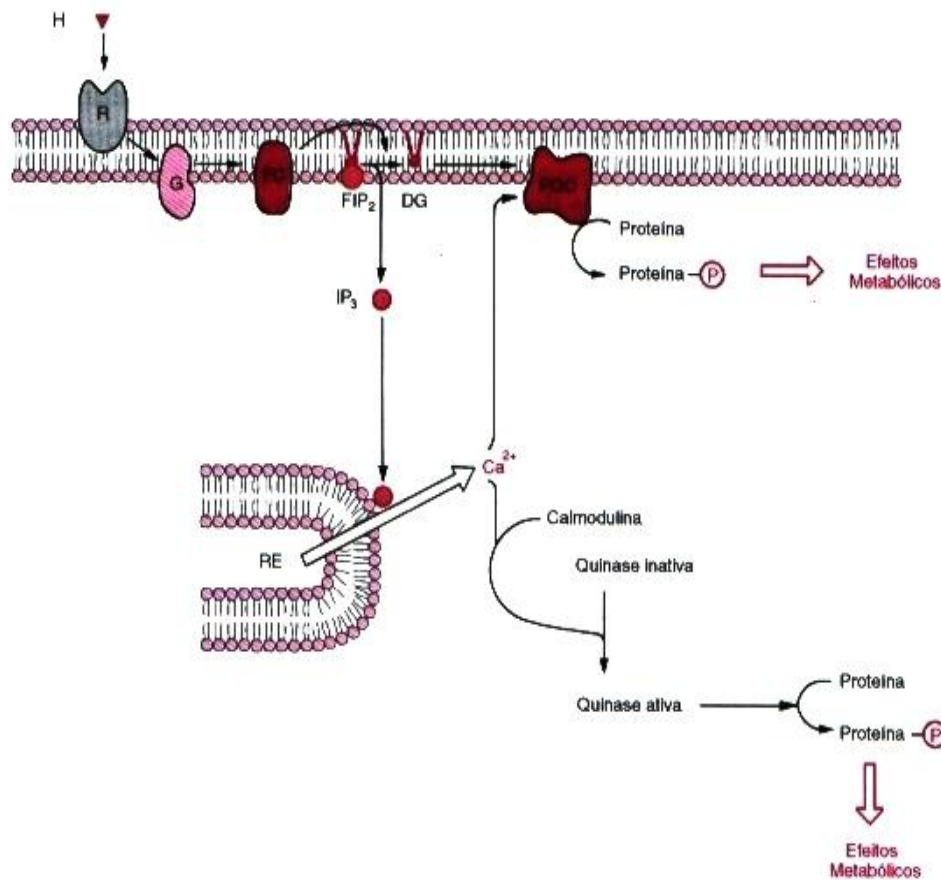


Fig. 19.8 Esquema da transdução de sinal determinada por hormônios, como, por exemplo, a adrenalina ligando-se a receptores α_1 . A sequência de eventos está descrita no texto. As proteínas fosforiladas devido à ligação do hormônio ao seu receptor desencadeiam os efeitos metabólicos que constituem a resposta celular ao hormônio. FC: fosfolipase C; FIP₂: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; DG: 1,2 diacilglicerol; IP₃: inositol 1,4,5-trisfosfato; PQC: proteína quinase C; RE: retículo endoplasmático.



Fig. 19.9 Estrutura da calmodulina, com quatro sítios de ligação de íons Ca^{2+} , representados por esferas. (Reproduzida de Voet, D. & Voet, J.: Biochemistry, John Wiley & Sons, Inc., 1995.)

sua atividade. Nos casos conhecidos de regulação pelo *complexo* $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{calmodulina}$ — glicogênio fosforilase, proteína quinases dependentes de $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{calmodulina}$, miosina quinase de músculos lisos, fosfodiesterase e adenilato ciclase —, ocorre a ativação da enzima. Agindo sobre a fosfodiesterase e a adenilato ciclase, o complexo $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{calmodulina}$ participa diretamente da regulação do nível de cAMP das células de eucariotos. Assim, os processos metabólicos que utilizam Ca^{2+} e cAMP como segundos mensageiros são interligados em pelo menos dois níveis (Fig. 19.10):

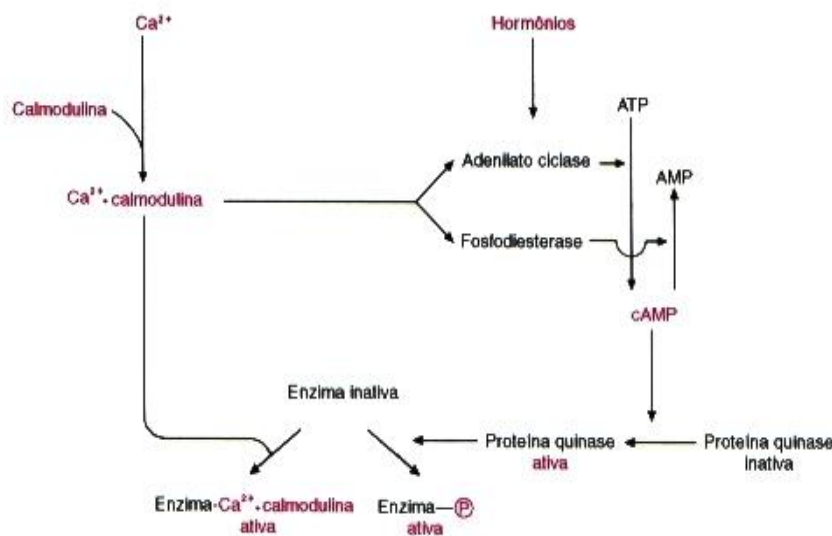


Fig. 19.10 Interação de Ca^{2+} e cAMP na regulação metabólica: o nível celular de cAMP, além de estar submetido à regulação hormonal, depende ainda da atuação do complexo $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{calmodulina}$. A ativação de enzimas inativas pode ser feita diretamente, pelo complexo, e indiretamente, através da ativação da proteína quinase.

1. A concentração intracelular de Ca^{2+} pode influenciar diretamente o nível de cAMP; este é o caso em que a calmodulina regula a atividade das enzimas que sintetizam e degradam este nucleotídeo.
2. Uma mesma proteína pode ser regulada tanto por Ca^{2+} como por cAMP, como ocorre com a fosforilase quinase e a miosina quinase de músculos lisos.

19.4 ADRENALINA, GLUCAGON E INSULINA

Os hormônios que têm papel fundamental na regulação do metabolismo — *adrenalina*, *glucagon* e *insulina* — serão discutidos brevemente neste capítulo. Sua atuação em vias metabólicas específicas será analisada nos capítulos seguintes.

A adrenalina tem efeitos metabólicos degradativos

A medula da supra-renal é uma glândula endócrina que faz parte do sistema nervoso autônomo e, quando estimulada, libera *adrenalina* (ou *epinefrina*) e *noradrenalina* (ou *norepinefrina*). Estes hormônios, chamados *catecolaminas* por sua semelhança estrutural ao catecol, são derivados de tirosina (Fig. 19.11). A adrenalina é o principal produto da medula da supra-renal, constituindo cerca de 80% das catecolaminas. As catecolaminas são também sintetizadas pelos nervos autonômicos, onde atuam como neurotransmissores.

A liberação de adrenalina é provocada por estímulo nervoso autônomo sobre a supra-renal em situações de perigo real ou imaginário, exercício físico, hipoglicemia e exposição a baixas temperaturas. A adrenalina determina uma série coordenada de efeitos que permitem ao animal reagir a essas situações. Entre os efeitos mais importantes estão: glicogenólise muscular e hepática; degradação de triacilgliceróis do tecido adiposo; relaxamento de alguns músculos lisos, como os dos brônquios e das arteríolas dos músculos esqueléticos, facilitando a tomada de ar e a oxigenação dos músculos voluntários; contração dos músculos lisos dos vasos abdominais, desviando mais sangue para os músculos esqueléticos; aumento da força e ritmo cardíacos. Seus efeitos metabólicos são marcadamente degradativos, contrapondo-se assim aos da insulina e coadjuvando a ação do glucagon. A interação destes hormônios é ainda mais íntima devido à ação das catecolaminas sobre a secreção dos outros dois: inibe a de insulina e estimula a de glucagon.

O *cortisol*, um glicocorticóide produzido pelo córtex da supra-renal, atua conjuntamente com a adrenalina na resposta do organismo ao estresse, aumentando a disponibilidade de substratos oxidáveis. Promove a gliconeogênese através de duas ações: aumenta a liberação de aminoácidos dos tecidos periféricos (músculos, principalmente) e induz a síntese de enzimas-chave da gliconeogênese. Estimula também a lipólise, contribuindo para a elevação da quantidade de ácidos graxos circulantes.

As diferentes ações da adrenalina sobre os vários tecidos são resultantes da presença de dois tipos de *receptores adrenérgicos*, α e β , nas células-alvo. A distinção entre os dois tipos de receptores é estabelecida

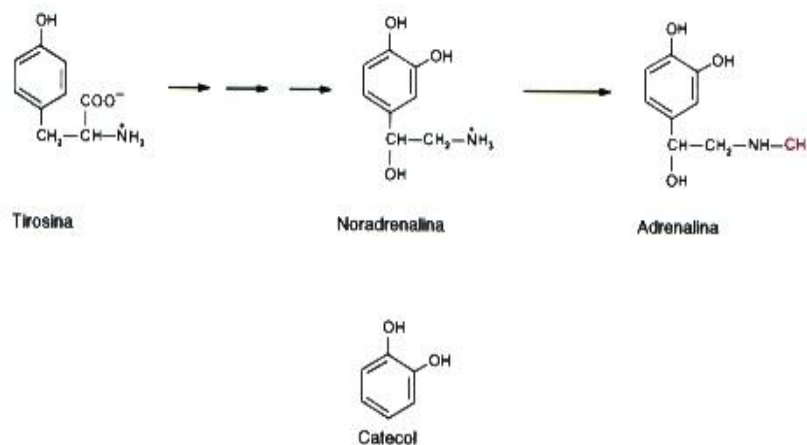


Fig. 19.11 A tirosina é precursora das catecolaminas, assim denominadas por sua semelhança estrutural com o catecol. Através de reações de hidroxilação e descarboxilação, a tirosina origina a noradrenalina que é metilada, convertendo-se em adrenalina.

com base na atuação de *agonistas*, isto é, substâncias capazes de ligarem-se aos receptores e induzir respostas equivalentes às dos hormônios, ou de *antagonistas*, compostos que também se ligam aos receptores, mas sem provocar efeitos. Por mimetizarem ou inibirem os efeitos hormonais, os agonistas e antagonistas têm largo emprego terapêutico. Ainda com base na especificidade ou na potência da ação de agonistas e antagonistas, é possível subdividir os receptores α em α_1 e α_2 . A ligação hormônio-receptor α_1 tem seus efeitos mediados por íons Ca^{2+} . Quando a adrenalina se liga a receptores α_2 e β , o segundo mensageiro é o cAMP; no primeiro caso há inibição da adenilato ciclase e no segundo caso, estimulação. As atuações da adrenalina sobre a regulação de vias metabólicas (por exemplo, a glicogenólise e a lipólise — Capítulo 20) resultam de sua interação com receptores β e do conseqüente aumento dos níveis intracelulares de cAMP.

A ativação de adenilato ciclase via receptores β (receptores do tipo R_s) é mediada pela proteína G_s . Por outro lado, os receptores α_2 (receptores R_i) determinam a inibição da adenilato ciclase, mediada pela proteína G_i . Esta ação é bloqueada pela *toxina da coqueluche* que, por um mecanismo análogo ao da toxina da cólera, bloqueia a atividade GTPásica de α_i , impedindo a inibição da adenilato ciclase e resultando em sua ativação permanente.

O glucagon é liberado em resposta à hipoglicemia

O glucagon é um peptídeo formado por 29 aminoácidos, sintetizado pelas células α das ilhotas de Langerhans do pâncreas (Fig. 19.12). O principal estímulo para a liberação de glucagon é a hipoglicemia. Seus efeitos metabólicos são eminentemente degradativos, incidindo sobre glicogênio, lipídios e proteínas, em especial no fígado e tecido adiposo. Nos hepatócitos, o estímulo que provoca na glicogenólise e gliconeogênese e a conseqüente exportação da glicose produzida tendem a corrigir os níveis de glicose sangüínea. Em paralelo, o glucagon estimula a lipólise no tecido adiposo. A glicose, direta ou indiretamente — por ação mediada por insulina — inibe a liberação de glucagon; este fenômeno ilustra a atuação oposta de glucagon e insulina sobre o metabolismo.

O glucagon provoca seus efeitos metabólicos ativando a proteína quinase dependente de cAMP e alterando a transcrição gênica.

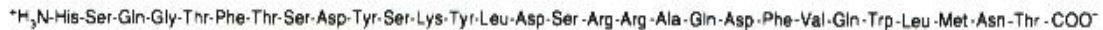


Fig. 19.12 Estrutura primária do glucagon.

A insulina é liberada em resposta à hiperglicemia

A insulina é uma proteína pequena, formada por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto (Fig. 19.13). É secretada pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, em resposta à hiperglicemia, e tem efeitos metabólicos antagônicos aos do glucagon (Quadro 19.3). Na deficiência de insulina, como no diabetes tipo I, os níveis de glucagon aparecem sempre muito elevados.

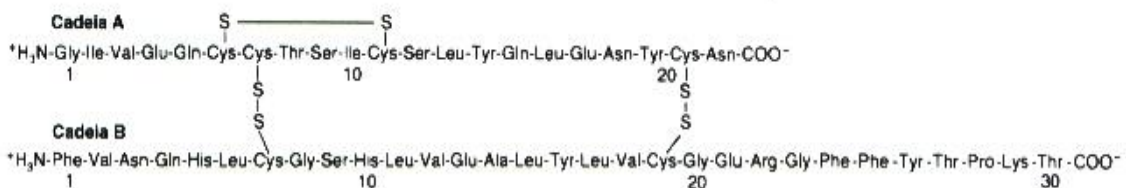


Fig. 19.13 Sequência de aminoácidos da insulina humana. A insulina é sintetizada como uma única cadeia polipeptídica, contendo mais 24 aminoácidos ligados ao resíduo B_1 e 35 aminoácidos ligando B_{30} a A_1 . Por ação de enzimas hidrolíticas, estes segmentos são eliminados, restando as duas cadeias unidas por pontes dissulfeto que constituem a forma funcional do hormônio.

Quadro 19.3 Efeitos metabólicos de insulina e glucagon

	Insulina	Glucagon
Glicemia	↓	↑
Glicogenólise hepática	↓	↑
Glicogênese hepática	↑	↓
Gliconeogênese hepática	↓	↑
Lipólise (tecido adiposo)	↓	↑
Lipogênese hepática	↑	↓
Cetogênese hepática	↓	↑

↑ = velocidade aumentada;
↓ = velocidade diminuída.

O receptor da insulina tem atividade de proteína quinase

O receptor de insulina, presente na membrana plasmática das células-alvo, é uma glicoproteína constituída por subunidades α e β , ligadas por pontes dissulfeto, formando um complexo com estrutura tetramérica — $\alpha_2\beta_2$ (Fig. 19.14). As subunidades α , situadas extracelularmente, ligam-se à insulina e as subunidades β fazem a transdução de sinal. A união da insulina ao seu receptor estimula a atividade de proteína quinase intrínseca ao próprio receptor, específica para resíduos de tirosina. A atividade de *tirosina quinase* reside na porção citoplasmática das subunidades β , que apresenta resíduos de tirosina suscetíveis a fosforilação. A autofosforilação do receptor desencadeia a fosforilação em cascata de uma série de proteínas sinalizadoras, ainda pouco conhecidas, que inclui diversas proteína quinases que se tornam ativas (*cascata de proteína quinases*). Estas quinases fosforilam outras proteínas, amplificando o sinal hormonal, que passa a interferir na regulação do metabolismo, no transporte de metabólitos e na transcrição gênica. A hipótese alternativa da existência de um segundo mensageiro da insulina continua sendo pesquisada: admite-se que a ocupação do seu receptor induziria a liberação de um fosfatidilinositol glicosilado da membrana para o citossol, onde atuaria sobre o grau de fosforilação de proteínas.

Níveis altos de insulina provocam diminuição do número de seus receptores

A quantidade de receptores celulares está submetida a um processo de regulação que depende da concentração do hormônio circulante: o número de receptores diminui com níveis altos do hormônio. Os receptores ligam-se ao hormônio, provocando a manifestação celular, e são internalizados por endocitose adsortiva. Nos lisossomos, a insulina é separada do receptor e degradada; uma parte dos receptores também é degradada e outra parte é reciclada para a membrana.

A junção do hormônio ao receptor determina, portanto, uma diminuição transitória do número de receptores presentes na membrana celular. Cessado o estímulo hormonal, o número de receptores é restabelecido através de síntese proteica. Quando o nível hormonal é mantido alto, a recomposição dos receptores não se

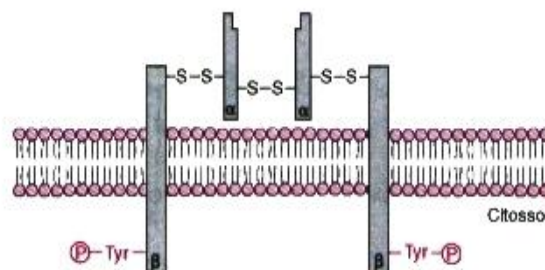


Fig. 19.14 Esquema do receptor de insulina, uma proteína tetramérica que atravessa a membrana plasmática das células-alvo. A ligação do hormônio se dá nas subunidades α e tem como consequência a indução da atividade de tirosina quinase das subunidades β , que sofre autofosforilação e fosforila diferentes proteínas-alvo.

completa e, a longo prazo, verifica-se uma diminuição do seu número. É o que ocorre em certas situações patológicas, como *diabetes insulino-independente* (diabetes tipo II) e *obesidade*, em que há uma diminuição da resposta celular a níveis aumentados de insulina.

A insulina interfere na fosforilação e na síntese de enzimas

Muitos dos efeitos metabólicos da insulina resultam de alterações da atividade enzimática, decorrentes da *desfosforilação de proteínas* (Quadro 19.4). O exato mecanismo do estímulo da remoção de grupos fosfato apresenta, ainda, pontos obscuros, mas admite-se que poderia ocorrer através de dois efeitos principais:

1. diminuição do nível de cAMP, que poderia obviamente resultar de ativação da fosfodiesterase de cAMP e/ou inibição da adenilato ciclase, levando à desativação da proteína quinase dependente de cAMP;
2. fosforilação de proteína quinases específicas (independentes de cAMP), desencadeada pela cascata de proteína quinases, que provocariam o estímulo de fosfoproteína fosfatases. Ou seja, a insulina promoveria a desfosforilação de proteínas através da fosforilação de outras proteínas.

Ambas as ações da insulina convergem para a estimulação de fosfoproteína fosfatases (p. 267 e p. 278) e explicam seu antagonismo ao glucagon e à adrenalina.

A insulina determina, ainda, grandes alterações na concentração de diversas enzimas nos seus tecidos-alvo (Capítulo 20), por intervenção na velocidade de transcrição dos genes que as codificam. Conhecem-se, atualmente, dezenas de RNAs mensageiros cuja síntese é regulada por insulina. Esta ação parece ter importância comparável à regulação do metabolismo por fosforilação/desfosforilação de enzimas. Um outro nível de atuação da insulina é a tradução de RNAs mensageiros; sua interferência neste processo deriva da fosforilação de proteínas ribossomais. Assim, estimula a síntese proteica nos músculos esqueléticos e cardíaco, no tecido adiposo e no fígado. A insulina, portanto, além de atuar sobre o metabolismo, interfere na replicação e diferenciação celular.

A insulina aumenta o transporte de glicose para o interior das células

O transporte de glicose através da membrana plasmática da maioria das células humanas é um processo passivo, mediado por uma família de permeases, denominadas GLUT 1, 2, 3 etc. (GLUT de *Glucose Transporter*). Estes sistemas de transporte apresentam distribuição diferencial pelos tecidos e são sensíveis ou não à insulina. GLUT 4, por exemplo, é responsável pelo transporte de glicose em células do tecido adiposo e muscular, que pode ser aumentado por insulina em 10 vezes ou mais, em poucos minutos. *A transferência de glicose para o interior dessas células resulta em diminuição da glicemia, o efeito mais rápido e marcante da insulina.* O mecanismo da ativação por insulina envolve a mobilização de moléculas de permease, armazenadas em vesículas membranosas, do interior da célula para a membrana plasmática. A atividade física regular também promove o aumento da GLUT 4 na membrana das fibras musculares e, por esta razão, é recomendada para portadores de diabetes.

Quadro 19.4 Enzimas desfosforiladas por ação de insulina

Via metabólica	Enzima desfosforilada	Atividade
Glicogênese	Glicogênio sintase	Ativa
Glicogenólise	Glicogênio fosforilase	Inativa
Glicólise e gliconeogênese	Fosfofrutoquinase 2	Ativa
	Frutose 2,6-bisfosfatase	Inativa
	Piruvato quinase	Ativa
Piruvato → Acetil-CoA	Piruvato desidrogenase	Ativa
Lipogênese	Acetil-CoA carboxilase	Ativa
	HMG-CoA redutase	Ativa
Lipólise	Lipase	Inativa

Outros tecidos têm transportadores de glicose insensíveis a insulina: o cérebro, garantindo assim a utilização de glicose mesmo quando a glicemia é baixa; as células das ilhotas de Langerhans, que, através da entrada de glicose proporcional à glicemia, respondem com a liberação de insulina ou glucagon; e as hemácias, que obtêm energia exclusivamente a partir de glicose. O fígado tem uma situação especial no que se refere à dependência de insulina para a tomada de glicose: embora a permease que medeia a entrada do açúcar (GLUT 2) seja insensível ao hormônio, o fígado depende dele para a síntese de glicocinase, sem a qual não pode utilizar a glicose.

A insulina facilita ainda o transporte de aminoácidos para as células, particularmente para o músculo.

A produção deficiente de insulina ou de seus receptores ocasiona o diabetes

O *diabetes mellitus*, uma doença metabólica de alta incidência, é provocada por diminuição na produção de insulina ou na sensibilidade das células-alvo a este hormônio. Há dois tipos de *diabetes mellitus*. O *diabetes tipo I*, também chamado *diabetes juvenil*, manifesta-se geralmente na adolescência, em indivíduos com peso normal, e caracteriza-se por baixos níveis sanguíneos de insulina, devido à redução do número de células β no pâncreas. Este tipo é dito *insulino-dependente* e seu tratamento consiste na administração de insulina. O *diabetes tipo II*, ou *diabetes da maturidade*, manifesta-se em indivíduos de meia-idade e geralmente obesos, que apresentam níveis insulínicos normais ou aumentados, sendo, portanto, um diabetes *insulino-independente*. A obesidade parece ser um fator desencadeante da moléstia, de modo que, em países onde constitui um distúrbio nutricional freqüente, 90% dos casos de diabetes são do tipo II. A superalimentação destes indivíduos ocasiona níveis elevados de insulina, que determinam uma diminuição do número de receptores na superfície de células sensíveis ao hormônio. O controle do diabetes tipo II é conseguido, muitas vezes, apenas por regime alimentar. Alternativamente, diversos agentes farmacológicos que estimulam a liberação de insulina — sulfoniluréia, tolbutamida etc. — são empregados no tratamento deste tipo de diabetes. Apesar de constituir uma forma menos severa da doença, pode evoluir para as mesmas complicações clínicas que o diabetes juvenil: arteriosclerose, hipertensão, doenças vasculares, nefropatias, cegueira etc. ***Alguns distúrbios metabólicos do diabetes serão analisados no Capítulo 21.***

20

REGULAÇÃO DAS VIAS METABÓLICAS PRINCIPAIS

20.1 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

A degradação e a síntese de glicogênio são efetuadas por vias distintas e, evidentemente, ativadas em condições metabólicas diferentes. Ademais, as regulações — hormonal e alostérica — destas vias são coordenadas, de modo que a estimulação de uma delas ocorre simultaneamente com a inibição da outra. *Os mecanismos de controle operantes em músculos esqueléticos serão descritos inicialmente.*

20.1.1 REGULAÇÃO DA DEGRADAÇÃO: GLICOGÊNIO FOSFORILASE

A *glicogênio fosforilase*, a enzima responsável pela glicogenólise, é um dímero e existe em duas formas: a forma *b* (inativa) e a forma *a* (ativa), obtida por fosforilação da forma *b*.



Esta enzima está sujeita a regulação por efetadores alostéricos e por modificação covalente.

Regulação Alostérica. A forma *a* é insensível à regulação alostérica; a forma *b*, encontrada no músculo em repouso, é ativada alostericamente por AMP. A concentração celular de AMP é, habitualmente, baixa mas eleva-se durante a contração muscular. De fato, nestas condições, o grande dispêndio energético provoca a conversão de ATP em ADP. A elevação da concentração de ADP acarreta o aumento da concentração de AMP, pois as concentrações de ATP, ADP e AMP podem ser ajustadas através da reação catalisada pela *adenilato quinase* (ou *mioquinase*):



Assim, à medida que aumenta a concentração de ADP, o equilíbrio desta reação favorece a formação de ATP. Esta produção de ATP oferece energia adicional para manter a contração e faz aumentar a concentração de AMP. A ligação de AMP à forma *b* da glicogênio fosforilase torna-a ativa, intensificando a degradação do glicogênio.

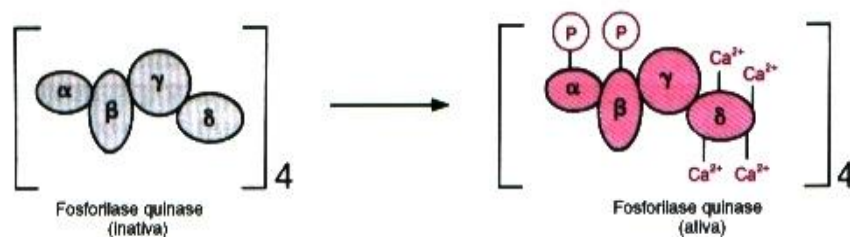
Regulação por Modificação Covalente. A ativação da glicogênio fosforilase pode também ser obtida através de modificação covalente. Esta modificação consiste na fosforilação de um resíduo de serina da forma *b* (inativa)

que se converte na forma *a* (ativa). Esta é a regulação mais importante e de resultados mais radicais, mas o conjunto das duas regulações converge todas as formas da glicogênio fosforilase para formas ativas.

A fosforilação (e ativação) da glicogênio fosforilase é catalisada pela glicogênio fosforilase quinase, que também existe em duas formas, uma inativa e outra ativa.

A **glicogênio fosforilase quinase** de músculos esqueléticos é composta por quatro cadeias polipeptídicas diferentes, com a composição ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$)₄. A subunidade catalítica é γ ; as outras subunidades têm papel regulador da atividade da enzima. A fosforilase quinase pode ser ativada por dois processos distintos:

1. Fosforilação das cadeias α e β pela proteína quinase, ativada por cAMP produzido sob estímulo de adrenalina (receptores β).
2. Ligação da subunidade δ , idêntica à *calmodulina* (p. 268), a íons Ca^{2+} , liberados nas fibras musculares durante a contração, em resposta a um estímulo nervoso.



A atividade máxima da enzima é obtida com a configuração representada para a forma ativa na figura acima.

A degradação do glicogênio muscular pode, portanto, ser provocada, em primeira instância, por estímulo hormonal (que ativa a proteína quinase dependente de cAMP) ou nervoso (que provoca a liberação de Ca^{2+}). No primeiro caso, portanto, o mediador intracelular é o cAMP e, no segundo caso, íons Ca^{2+} .

O processo completo de ativação da glicogênio fosforilase resulta de uma seqüência de ativações enzimáticas, conhecida como *cascata enzimática* (Fig. 20.1). Revendo o processo em ordem cronológica dos seus eventos, temos:

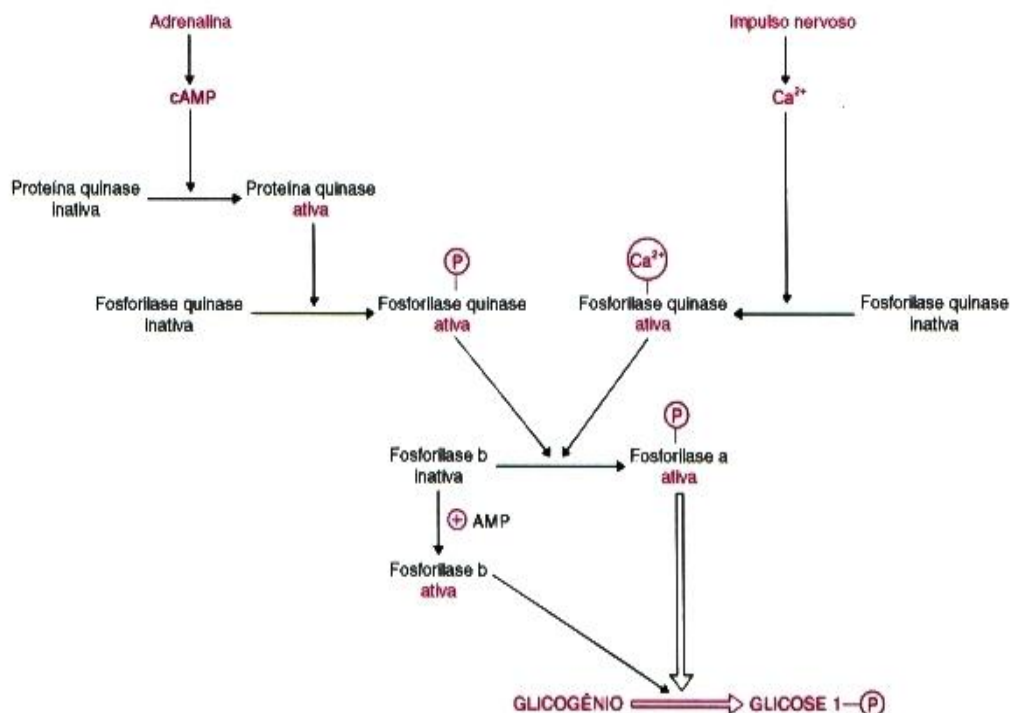


Fig. 20.1 Cascata enzimática de ativação da degradação do glicogênio muscular, desencadeada por estímulo hormonal ou nervoso. As formas ativas das enzimas são as fosforiladas. No fígado, a degradação processa-se de forma análoga, mas principalmente sob influência do glucagon.

1. Ligação do hormônio ao receptor.
2. Modificação da proteína G e troca de GDP por GTP.
3. Ativação da adenilato ciclase pela subunidade α da proteína G, ligada a GTP.
4. Produção de cAMP pela adenilato ciclase.
5. Ligação de cAMP às subunidades reguladoras da proteína quinase, liberando as subunidades catalíticas, ativas.
6. Fosforilação da glicogênio fosforilase quinase pela proteína quinase, ativando-a.
7. Fosforilação da glicogênio fosforilase pela glicogênio fosforilase quinase, ativando-a.
8. Degradação do glicogênio pela glicogênio fosforilase.

A degradação do glicogênio libera glicose 1-fosfato, que, isomerizada a glicose 6-fosfato, vai ser metabolizada nas células musculares exclusivamente pela via glicolítica.

A cascata enzimática tem grande efeito amplificador, porque, iniciando-se com baixíssimas concentrações de hormônio, inclui ativações intermediárias de enzimas que catalisam, por sua vez, a ativação de outras enzimas. Assim, o estímulo hormonal é aumentado de muitas ordens de grandeza. Adicionalmente, o estímulo nervoso que provoca o aumento da concentração sarcoplasmática de Ca^{2+} é quase sempre acompanhado da liberação de adrenalina. As estimulações sobre a degradação do glicogênio são, portanto, convergentes, ainda mais porque, quando as subunidades α e β estão fosforiladas, a afinidade da enzima por Ca^{2+} é aumentada, promovendo então sua conversão à forma de maior atividade possível.

20.1.2 REGULAÇÃO DA SÍNTESE

cAMP e Ca^{2+} estimulam a degradação e inibem a síntese do glicogênio muscular

Na cascata enzimática de degradação do glicogênio, a forma ativa das enzimas é sempre a forma fosforilada. Com a *glicogênio sintase*, inverte-se a situação: sua forma fosforilada é inativa e a forma desfosforilada é ativa. A glicogênio sintase tem vários sítios de fosforilação e o processo é menos conhecido do que a cascata de degradação. A fosforilação pode ser catalisada por várias quinases, entre as quais as mais importantes parecem ser a proteína quinase dependente de cAMP, a fosforilase quinase e uma proteína quinase dependente de Ca^{2+} -calmodulina (Fig. 20.2).

O estímulo hormonal trazido pela adrenalina, portanto, determina simultaneamente o estímulo da degradação e a inibição da síntese de glicogênio muscular. Estes mesmos efeitos são desencadeados por íons Ca^{2+} , liberados em resposta a estímulos nervosos (Fig. 20.3).

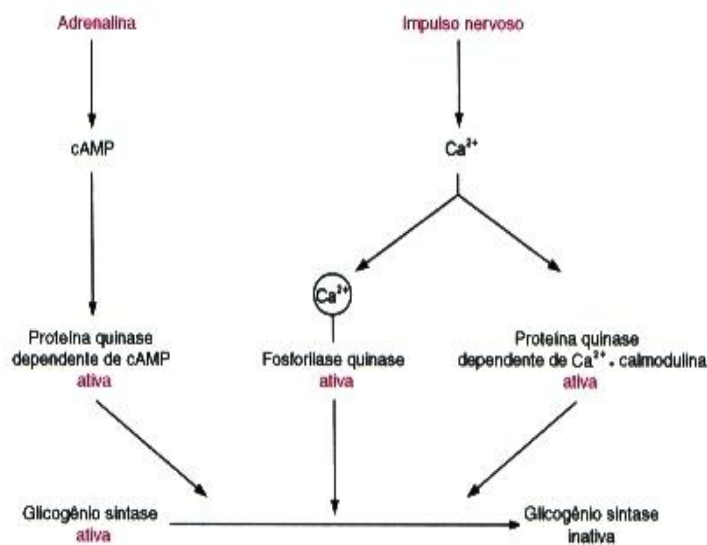


Fig. 20.2 Cascata enzimática de inibição da síntese de glicogênio muscular. A inativação da glicogênio sintase é acionada pelos mesmos estímulos (hormonal e nervoso) que provocam a ativação da glicogenólise. Estão incluídas apenas três das diversas quinases que parecem ser responsáveis pela fosforilação da sintase.

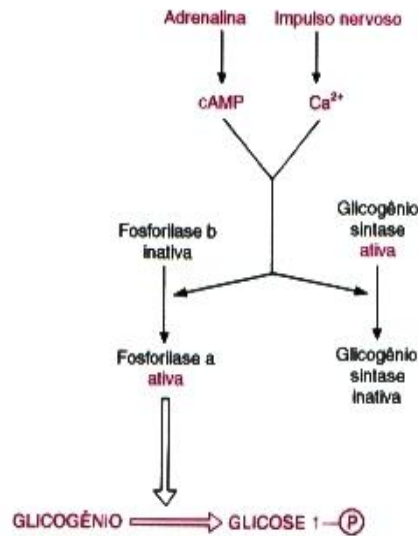


Fig. 20.3 Esquema resumindo a ativação da degradação e a inibição da síntese do glicogênio muscular por adrenalina e estímulo nervoso.

A síntese de glicogênio muscular ocorre quando as enzimas são desfosforiladas

Cessado o estímulo por adrenalina, seus efeitos metabólicos desaparecem graças à ação coordenada de um conjunto de enzimas. O quadro vigente e que deve ser revertido para que a célula volte à situação de repouso e esteja preparada para a síntese de glicogênio caracteriza-se por:

1. Adenilato ciclase ativada.
2. Concentração de cAMP alta.
3. Proteína quinase dependente de cAMP ativa.
4. Enzimas fosforiladas e ativas, com exceção da glicogênio sintase, que está inativa.

Todas estas condições precisam ser desfeitas, para devolver a célula à situação de repouso e/ou de síntese. Os eventos ocorridos para reverter cada uma das condições são os seguintes:

1. Graças à atividade GTPásica da subunidade α da proteína G, o GTP a ela associado é hidrolisado, sendo convertido a GDP. Esta troca de nucleotídeos diminui a afinidade da subunidade α da proteína G pela adenilato ciclase, fazendo-a associar-se às outras subunidades da proteína G. Desligada da subunidade α , a adenilato ciclase fica inativa, parando a produção de cAMP.
2. A fosfodiesterase hidrolisa o cAMP a 5'-AMP, reduzindo, portanto, a concentração celular do nucleotídeo cíclico.
3. Desligada do cAMP, a subunidade reguladora da proteína quinase volta a associar-se à subunidade catalítica, impedindo sua ação. A proteína quinase, portanto, torna-se inativa.
4. As enzimas fosforiladas têm seus grupos fosfatos removidos por hidrólise catalisada pela fosfoproteína fosfatase 1. Na verdade, o percentual de enzimas fosforiladas depende da intensidade relativa das atuações da proteína quinase dependente de cAMP e da fosfoproteína fosfatase 1. Durante o tempo em que prevaleceu a ação da adrenalina, a fosfoproteína fosfatase 1 estava impedida de reverter as fosforilações provocadas pela proteína quinase dependente de cAMP, devido a duas ações desta mesma quinase: fosforilação da proteína inibidora da fosfoproteína fosfatase 1 (p. 266) e fosforilação da própria fosfoproteína fosfatase 1. A modificação covalente das duas proteínas promove a sua associação, o que resulta na inativação da fosfoproteína fosfatase 1.

Quando termina o estímulo de adrenalina, a proteína inibidora da fosfoproteína fosfatase 1 e a fosfoproteína fosfatase 1 são desfosforiladas e a proteína inibidora desliga-se da fosfoproteína fosfatase 1, que pode então catalisar a hidrólise de grupos fosfato de todas as enzimas. Desta forma, as enzimas responsáveis pela degradação do glicogênio passam à forma desfosforilada e inativa, enquanto a glicogênio sintase passa à forma desfosforilada e ativa (Fig. 20.4). Esta mudança no sentido do metabolismo do glicogênio é determinada por insulina.

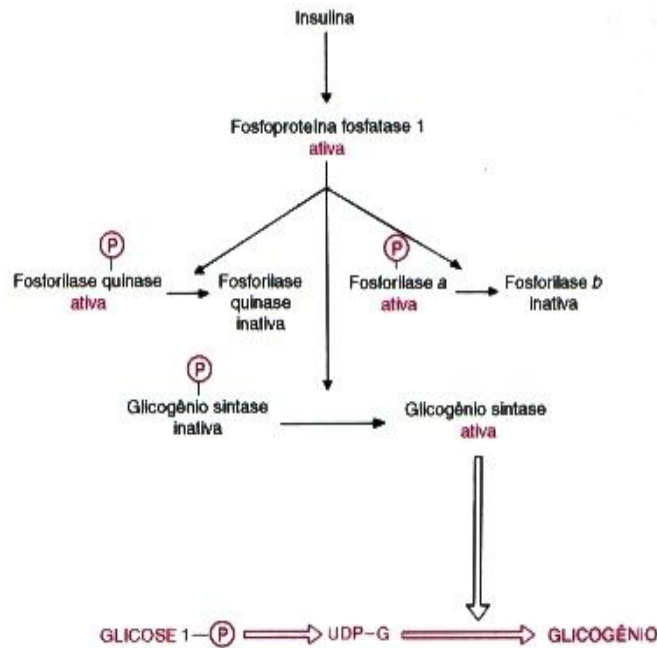


Fig. 20.4 Esquema mostrando a desfosforilação de enzimas pela fosfoproteína fosfatase 1 e a conseqüente inibição da degradação e ativação da síntese de glicogênio, determinadas por insulina.

A insulina promove a síntese de glicogênio

A síntese de glicogênio depende, de forma decisiva, da intervenção da insulina. O exato mecanismo de ação deste hormônio apresenta ainda pontos obscuros, mas um de seus efeitos conhecidos é promover a desfosforilação de proteínas, por redução dos níveis de cAMP ou por ativação de uma cascata de proteína quinases (Capítulo 19). Com baixos níveis de cAMP, cessam os efeitos inativadores exercidos pela proteína quinase dependente de cAMP sobre a fosfoproteína fosfatase 1. Adicionalmente, uma das enzimas que participam da cascata de quinases desencadeada por insulina, a *proteína quinase dependente de insulina*, fosforila a fosfoproteína fosfatase 1, que passa a exibir atividade máxima. Este evento de fosforilação tem, portanto, efeito antagônico ao da proteína quinase dependente de cAMP. De qualquer modo, as ações da insulina convergem para a conversão da forma inativa da glicogênio sintase na forma ativa.

Para que a síntese possa ser levada a cabo, é obviamente necessário que, além da adequação da atividade das enzimas reguladoras, haja disponibilidade do substrato precursor: a glicose. As fibras musculares são insulino-dependentes, ou seja, só podem receber glicose quando, em virtude de glicemia elevada, o pâncreas libera insulina. Isto é o que ocorre após as refeições, permitindo que a glicose plasmática seja captada e convertida a glicogênio, já que as regulações das enzimas relacionadas ao metabolismo do glicogênio, nesta situação, inibem sua degradação e ativam sua síntese.

A regulação do metabolismo do glicogênio hepático é semelhante à do muscular

No fígado, o metabolismo do glicogênio é regulado através das mesmas cascatas de reações descritas para o músculo. Neste caso, entretanto, a degradação é provocada, fundamentalmente, por glucagon. A síntese é igualmente promovida por insulina. Apesar de a insulina não interferir no transporte de glicose através da membrana do hepatócito, a captação de glicose é aumentada indiretamente porque a insulina induz a síntese de glicocinase, a enzima responsável pela fosforilação da glicose no fígado. É a fosforilação do açúcar que garante a sua permanência na célula e possibilita sua utilização pelas vias metabólicas.

A própria glicose exerce um papel regulador sobre o metabolismo do glicogênio hepático. Quando sua concentração celular aumenta, a glicose liga-se à glicogênio fosforilase *a*, tornando-a sensível à ação da fos-

foproteína fosfatase 1. Desfosforilada, a glicogênio fosforilase é inativa. Deste modo, a glicose contribui para a inibição da glicogenólise.

A glicose 1-fosfato obtida da degradação do glicogênio é sempre isomerizada a glicose 6-fosfato. Este açúcar terá, entretanto, destinos diferentes no fígado e no músculo. Como será visto a seguir, a degradação do glicogênio hepático ocorre em situações em que a glicólise está inibida. O destino da glicose é ser exportada do hepatócito.

20.2 REGULAÇÃO DA GLICÓLISE E GLICONEOGÊNESE

A glicólise é uma via metabólica encontrada na maioria das células vivas, capaz de fornecer energia. No fígado, e com menor importância no córtex renal, encontra-se também a gliconeogênese, uma via que, de forma geral, é antagônica à glicólise. Nestes órgãos, a regulação das duas vias é feita de forma recíproca, isto é, quando uma delas está ativa, a outra está desacelerada. Uma vez que a glicólise e a gliconeogênese compartilham várias enzimas, a regulação diferencial só pode ser exercida nas etapas em que as vias diferem, incidindo sobre enzimas que pertencem a uma só das vias. Há, portanto, três sítios de controle, que são as conversões entre: (1) glicose e glicose 6-fosfato; (2) frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato; (3) fosfoenolpiruvato e piruvato. Deve-se notar que as enzimas-alvo da regulação de ambas as vias catalisam reações irreversíveis: na glicólise, as reações catalisadas por hexoquinase (glicoquinase, no fígado), fosfofrutoquinase e piruvato quinase; na gliconeogênese, a etapa inicial, catalisada pela piruvato carboxilase juntamente com a fosfoenolpiruvato carboxiquinase e as reações catalisadas por frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase. O quadro a seguir resume a regulação diferencial da glicólise e da gliconeogênese.

Sítios de controle (Etapas diferentes nas duas vias)	Enzimas-alvo da regulação (Reações irreversíveis)	
Conversão entre:	Glicólise	Gliconeogênese
(1) Glicose e glicose 6-fosfato	Hexoquinase	Glicose 6-fosfatase
(2) Frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato	Fosfofrutoquinase	Frutose 1,6-bisfosfatase
(3) Fosfoenolpiruvato e piruvato	Piruvato quinase	PEP carboxiquinase Piruvato carboxilase

A fosforilação da glicose é o primeiro sítio de controle da glicólise

Na maioria dos tecidos, a fosforilação da glicose é catalisada pela *hexoquinase*. Esta enzima apresenta um valor de K_M de 0,1 mM; como a concentração de glicose plasmática é de cerca de 5 mM, a hexoquinase funciona em $V_{máx}$. Entretanto, o produto da reação, *glicose 6-fosfato*, é um potente inibidor alostérico da enzima. Quando a utilização da glicose 6-fosfato pela via glicolítica diminui, sua concentração aumenta e a hexoquinase fica momentaneamente inibida, restringindo a fosforilação da glicose e, portanto, ajustando a captação do açúcar pelo tecido à sua utilização. No fígado, a situação é um pouco diferente, pela presença de outra enzima responsável pela fosforilação da glicose: a *glicoquinase*. Embora promovendo exatamente a mesma reação, esta enzima tem K_M igual a 10 mM, portanto, 100 vezes maior do que o da hexoquinase (Fig. 20.5). A baixa afinidade da glicoquinase por seu substrato ajusta rigorosamente sua atividade à concentração de glicose plasmática, pois aumentos da concentração plasmática do açúcar levam a aumentos da velocidade da reação catalisada pela glicoquinase. É o que acontece sempre que o nível sanguíneo de glicose se eleva, como após uma refeição rica em carboidratos. Por outro lado, esta baixa afinidade restringe a captação de glicose pelo fígado em situação de baixa concentração plasmática do açúcar, deixando-o disponível para tecidos estritamente dependentes de glicose, como o cérebro. O aumento da velocidade da reação catalisada pela glicoquinase

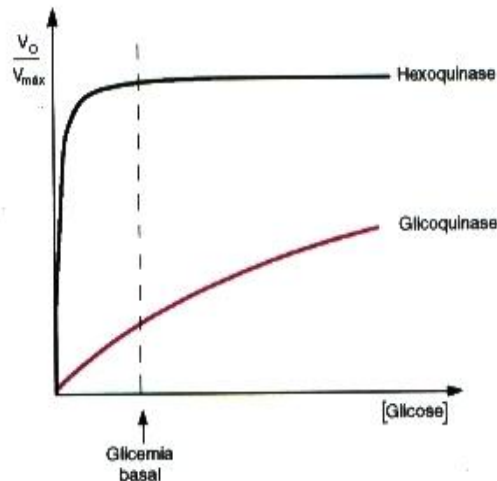


Fig. 20.5 Velocidade relativa de fosforilação de glicose em função de sua concentração, catalisada por hexoquinase ($K_M = 0,1 \text{ M}$) e por glicocquinase ($K_M = 10 \text{ mM}$). O valor da glicemia basal é 5 mM . A captação de glicose pelos tecidos que têm hexoquinase só é restringida pela inibição da enzima por glicose 6-fosfato. No fígado, a glicocquinase permite que a velocidade de captação aumente quando a glicemia se eleva.

com glicemia alta permite o armazenamento da glicose circulante como glicogênio. Em tecidos como o cérebro, que contém hexoquinase, a fosforilação da glicose independe do valor da glicemia, dentro do seu intervalo fisiológico de flutuação, e assegura um suprimento constante de glicose, graças à alta afinidade da enzima pelo substrato.

A etapa inversa à fosforilação da glicose é a hidrólise do grupo fosfato, catalisada pela *glicose 6-fosfatase*, uma enzima da gliconeogênese, ou seja, uma enzima hepática. Nenhum mecanismo de regulação é conhecido para esta enzima. Sua atividade permite a exportação de glicose do fígado quando as concentrações intracelulares de glicose 6-fosfato aumentam, em virtude do estímulo da glicogenólise ou da gliconeogênese. Como será visto a seguir, em ambas as situações, a via glicolítica encontra-se inibida.

A fosfofrutoquinase é o principal sítio de regulação da glicólise

O segundo sítio de controle compreende a interconversão de frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato, catalisada pela *fosfofrutoquinase* (glicólise) e pela *frutose 1,6-bisfosfatase* (gliconeogênese). Esta etapa é a mais importante e a mais complexa da regulação das duas vias (Fig. 20.6).

Os principais inibidores alostéricos da fosfofrutoquinase (chamada também *fosfofrutoquinase 1*, para diferenciá-la da *fosfofrutoquinase 2*, que será discutida mais adiante) são *ATP* e *citrato*. A inibição por ATP representa uma situação clássica de regulação por *feedback*, em que um dos produtos finais da via regula sua velocidade. A inibição por citrato permite ajustar a velocidade da glicólise à do ciclo de Krebs: se o suprimento de substratos para o ciclo ultrapassa sua capacidade de utilizá-los, acumula-se citrato (ver Regulação do ciclo de Krebs, p. 286), que, difundindo-se para o citossol, inibe a fosfofrutoquinase 1, reduzindo a produção de acetil-CoA a partir de glicose.

Os efetadores alostéricos positivos mais importantes da fosfofrutoquinase 1 são *AMP* e *frutose 2,6-bisfosfato*.

AMP. A ativação por AMP é particularmente importante no caso de músculos em contração vigorosa, quando o aumento da concentração de AMP estimula a fosfofrutoquinase. Nesta situação, também aumenta a disponibilidade de substrato para a glicólise, pois o metabolismo do glicogênio está regulado no sentido degradativo. A consequência é uma aceleração da glicólise. O aporte de oxigênio para o músculo é insuficiente para permitir a oxidação pela cadeia de transporte de elétrons da grande quantidade de coenzimas reduzidas derivadas da intensa degradação de glicose. Resulta um aumento da concentração de NADH mitocondrial, que acaba por refletir-se no citossol, pois não há disponibilidade de NAD^+ mitocondrial que possa ser usado pelo sistema de lançadeira para oxidar o NADH citossólico. O aumento da concentração de NADH no

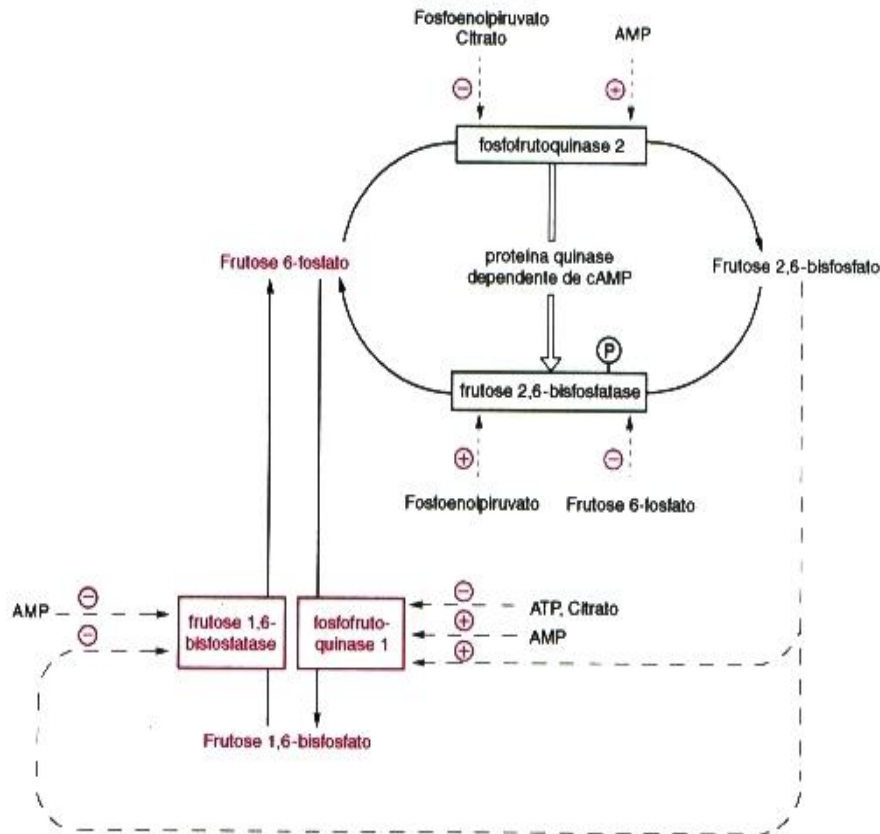


Fig. 20.6 Regulação da interconversão de frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato. As atividades de fosfofrutoquinase 2 e de frutose 2,6-bisfosfatase — presentes em uma mesma enzima bifuncional — determinam a concentração da frutose 2,6-bisfosfato, o mais potente efetor alostérico desta etapa. No esquema, as setas contínuas representam reações químicas, as setas interrompidas indicam regulações alostéricas, positivas (+) ou negativas (-), e a seta dupla refere-se à regulação hormonal.

citossol “força” a reação catalisada pela *lactato desidrogenase* no sentido da formação de lactato e oxidação do NADH. O NAD⁺ assim produzido permite o prosseguimento da glicólise, agora anaerobiamente, gerando ATP para sustentar a contração muscular. Ocorre, portanto, a fermentação láctica (p. 126). Resultam altas concentrações plasmáticas de lactato, características do esforço muscular intenso. O lactato é captado pelo fígado, onde pode ser convertido a glicose. O desvio do metabolismo da glicose, ocasionado por oxigenação insuficiente, acontece em músculos constituídos predominantemente por fibras lentas (Capítulo 22), que são ricas em mitocôndrias e obtêm a maior parte do ATP por fosforilação oxidativa. Nas fibras rápidas, desprovidas de mitocôndrias, predomina sempre a fermentação láctica.

Frutose 2,6-bisfosfato. No fígado, o efetor alostérico mais potente no controle da glicólise e da gliconeogênese é a frutose 2,6-bisfosfato, que influencia a atividade da fosfofrutoquinase 1 e da frutose 1,6-bisfosfatase. Esta forma bifosforilada da frutose não é um intermediário da glicólise, e da sua concentração celular vai depender a ativação ou inibição da glicólise e da gliconeogênese. Sendo assim, sua própria produção está sob controle estrito.

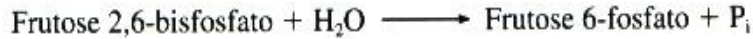
A produção de frutose 2,6-bisfosfato está sob controle alostérico e hormonal

A concentração celular de frutose 2,6-bisfosfato está na dependência de duas ações enzimáticas — quinase e fosfatase —, presentes em domínios diferentes de uma mesma proteína bifuncional, chamada *fosfofrutoquinase 2/frutose 2,6-bisfosfatase*. A atividade de quinase é denominada *fosfofrutoquinase 2*, para distingui-la da fosfofrutoquinase da glicólise, a fosfofrutoquinase 1.

A frutose 2,6-bisfosfato é produzida, portanto, de forma análoga à frutose 1,6-bisfosfato, através da seguinte reação:



A frutose 2,6-bisfosfato não segue qualquer via metabólica conhecida. A única alternativa para diminuir sua concentração é a hidrólise do grupo 2-fosfato, com regeneração de frutose 6-fosfato. A desfosforilação é catalisada pela atividade de fosfatase, análoga à frutose 1,6-bisfosfatase, a *frutose 2,6-bisfosfatase*:



Assim, quando a atividade de fosfofrutoquinase 2 está favorecida, aumenta a concentração de frutose 2,6-bisfosfato; o oposto ocorre quando prevalece a ação de frutose 2,6-bisfosfatase (Fig. 20.6).

A frutose 2,6-bisfosfato ativa fortemente a fosfofrutoquinase 1 e inibe a frutose 1,6-bisfosfatase, favorecendo, portanto, a glicólise e inibindo a gliconeogênese. A fosfofrutoquinase 2/frutose 2,6-bisfosfatase, responsável pela concentração celular de frutose 2,6-bisfosfato, está submetida a controle alostérico e hormonal.

A regulação alostérica da fosfofrutoquinase 2 é análoga à da fosfofrutoquinase 1: é estimulada por *AMP* e inibida por *citrato* e *fosfoenolpiruvato*. A frutose 2,6-bisfosfatase é estimulada por *fosfoenolpiruvato* e inibida por *frutose 6-fosfato*. Portanto, o nível de frutose 2,6-bisfosfato depende inversamente do nível de fosfoenolpiruvato e, diretamente, do nível de frutose 6-fosfato. O aumento da concentração de fosfoenolpiruvato indica (1) que este composto não está sendo utilizado pela piruvato quinase ou (2) que está sendo produzido para a gliconeogênese. Em qualquer dos dois casos, os efeitos do aumento de sua concentração sobre as atividades enzimáticas responsáveis pela concentração de frutose 2,6-bisfosfato levam à diminuição da concentração da frutose bifosforilada, abrindo caminho para que se complete a gliconeogênese. Por outro lado, o acúmulo de frutose 6-fosfato assinala a necessidade de sua utilização pela fosfofrutoquinase 1 e, portanto, a necessidade da manutenção de seu efetador principal, a frutose 2,6-bisfosfato. Isto é obtido por inibição da frutose 2,6-bisfosfatase por frutose 6-fosfato.

O predomínio de uma das duas atividades da fosfofrutoquinase 2/frutose 2,6-bisfosfatase e, portanto, o nível de frutose 2,6-bisfosfato, depende de regulação hormonal. Esta enzima é substrato da proteína quinase dependente de cAMP. Quando desfosforilada, predomina a atividade de quinase; quando está fosforilada, a atividade exercida é a de fosfatase. Assim, sob estímulo de glucagon, liberado em hipoglicemia, a produção intracelular de cAMP ativa a proteína quinase e a enzima bifuncional é fosforilada; sua atividade de fosfatase leva à redução dos níveis de frutose 2,6-bisfosfato. A fosfofrutoquinase 1, desprovida do seu efetador alostérico, fica inativa, desativando a glicólise. A diminuição da concentração de frutose 2,6-bisfosfato elimina também a inibição da frutose 1,6-bisfosfatase, levando ao estímulo da gliconeogênese.

Em períodos de jejum, o glucagon estimula a degradação do glicogênio hepático, com produção de glicose 1-fosfato, que é isomerizada a glicose 6-fosfato. Como nesta situação a glicólise está inibida, o destino da glicose 6-fosfato é ser convertida a glicose e exportada do fígado, contribuindo para a correção da baixa glicemia que originou a liberação do glucagon. À medida que se prolonga o jejum e vai sendo esgotado o depósito de glicogênio hepático, aumenta a importância da gliconeogênese para a produção de glicose. O fluxo gliconeogênico, intensificado por glucagon (a baixa concentração de frutose 2,6-bisfosfato restabelece a atividade da frutose 1,6-bisfosfatase), soma-se à degradação do glicogênio, aumentando a produção de glicose 6-fosfato.

É interessante ressaltar que a atuação da frutose 2,6-bisfosfato impede a síntese de glicose quando este açúcar está disponível: altos níveis de glicose acarretam altos níveis de frutose 6-fosfato, inibidor da frutose 2,6-bisfosfatase; a concentração de frutose 2,6-bisfosfato aumenta e a gliconeogênese fica inibida. Além disso, com disponibilidade de glicose, a alta relação insulina/glucagon vigente determina baixos níveis de cAMP, favorecendo a atividade da fosfofrutoquinase 2, que produz frutose 2,6-bisfosfato, contribuindo para a inibição da gliconeogênese. Simultaneamente, a glicólise fica ativa, por estimulação da fosfofrutoquinase 1.

No músculo cardíaco, a degradação de glicogênio é concomitante com a ativação da glicólise

A descrição dos efeitos da frutose 2,6-bisfosfato no fígado mostra que, em presença de glucagon, sua concentração diminui, impedindo a glicólise. Em decorrência, o glicogênio hepático nunca é utilizado pelo próprio hepatócito, destinando-se sempre à manutenção da glicemia.

No músculo cardíaco, a situação é oposta: o glicogênio é sempre utilizado pelas próprias fibras musculares, porque quando sua degradação está estimulada, a via glicolítica também está.

A diferença das regulações reside na fosfofrutoquinase 2/frutose 2,6-bisfosfatase. A enzima de músculo cardíaco tem a atividade de quinase aumentada por fosforilação dependente de cAMP, ao contrário do que ocorre com a isoenzima hepática. De tal sorte que, quando sob estímulo de adrenalina, o glicogênio está sendo degradado, a concentração de frutose 2,6-bisfosfato aumenta, estimulando a fosfofrutoquinase 1 e, portanto, a glicólise. Esta ativação responde à liberação de adrenalina, que sinaliza a necessidade de produção de ATP para o trabalho muscular.

A piruvato quinase é estimulada por frutose 1,6-bisfosfato

A regulação do terceiro sítio de controle da glicólise e gliconeogênese incide especialmente sobre a *piruvato quinase* (Fig. 20.7). A enzima de fígado é estimulada por *frutose 1,6-bisfosfato*. Assim, quando a regulação da fosfofrutoquinase 1 estabelece uma alta atividade para esta enzima, seu produto, a frutose 1,6-bisfosfato, estimula a piruvato quinase, “preparando” a enzima para receber o fluxo de substratos da via glicolítica. A piruvato quinase também sofre regulação hormonal: é substrato da proteína quinase dependente de cAMP, tornando-se inativa quando fosforilada. Em hipoglicemia, por estímulo de glucagon, esta inativação se processa, aumentando a concentração de fosfoenolpiruvato, com duas conseqüências imediatas: inibição da fosfofrutoquinase 2 e estímulo da frutose 2,6-bisfosfatase. Decresce, portanto, a concentração de frutose 2,6-bisfosfato, cessando o estímulo sobre a fosfofrutoquinase 1 e interrompendo a via glicolítica. Através das outras regulações citadas, fica simultaneamente ativada a gliconeogênese.

A piruvato quinase hepática é inibida alostericamente por *alanina*. Esta regulação é fundamental durante períodos prolongados de jejum, quando o fígado recebe quantidades apreciáveis de alanina, proveniente do tecido muscular. Este aminoácido é um composto gliconeogênico e, para a síntese de glicose, deve sofrer transaminação, convertendo-se em piruvato. A seguir, o piruvato é convertido em oxaloacetato e este, em fosfoenolpiruvato, que segue a via gliconeogênica. A inibição da piruvato quinase por alanina impede que o fosfoenolpiruvato formado possa ser reconvertido a piruvato. No músculo, que não faz gliconeogênese, a piruvato quinase não sofre as regulações descritas anteriormente.

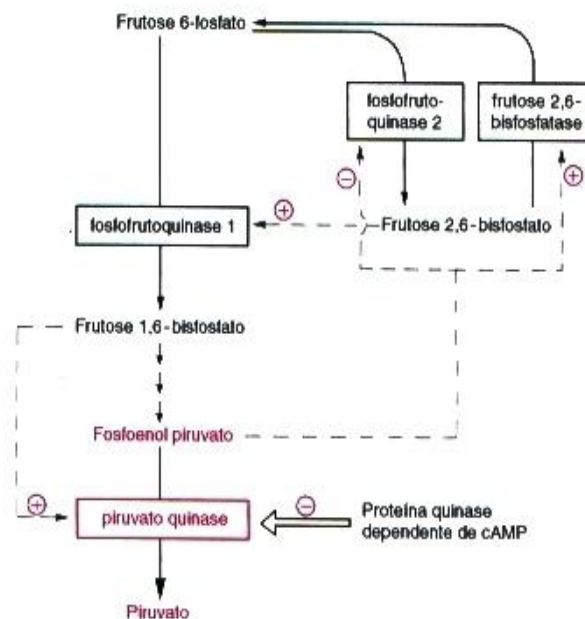


Fig. 20.7 Regulação da piruvato quinase por ação hormonal (seta dupla) e alostérica (setas interrompidas). Quando há inibição da enzima, o fosfoenolpiruvato, seu substrato, regula sua própria produção por inibir a formação de frutose 2,6-bisfosfato, o principal ativador da fosfofrutoquinase.

A concentração das enzimas também é regulada

Um outro nível de regulação da glicólise e da gliconeogênese é o controle do conteúdo enzimático celular, exercido por ação hormonal. Com uma dieta rica em carboidratos, a insulina induz a síntese de glicoquinase e de piruvato quinase, que tem sua concentração elevada de até cinco vezes. No jejum e no diabetes, quando prevalece a ação de glucagon, a concentração de glicoquinase cai até 50%, as concentrações de fosfoenolpiruvato carboxiquinase, frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase aumentam.

20.3 REGULAÇÃO DA VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO

A atividade da via das pentoses-fosfato varia segundo o tecido, sendo muito mais intensa em tecidos que sintetizam ácidos graxos ativamente, como fígado e tecido adiposo. As duas desidrogenases que participam desta via convertem NADP^+ a NADPH e são inibidas competitivamente por NADPH . A oxidação de NADPH a NADP^+ é feita nas sínteses redutoras, como as de ácidos graxos, de colesterol e de hormônios esteroídicos.

A utilização da glicose 6-fosfato pela via das pentoses-fosfato ou pela glicólise está subordinada às relações ATP/ADP e NADPH/NADP^+ existentes nas células. Quando a relação ATP/ADP é baixa (carga energética baixa), a glicose é degradada pela via glicolítica, produzindo ATP , pois, nestas condições, a glicólise está estimulada pelos processos regulatórios já descritos; não ocorre síntese de ácidos graxos e a relação NADPH/NADP^+ é alta, inibindo a via das pentoses-fosfato. Se a relação ATP/ADP é alta, a via glicolítica fica inibida e a síntese de ácidos graxos é favorecida, consumindo NADPH e eliminando a inibição das desidrogenases. Assim, quando a carga energética celular é alta, o consumo de glicose 6-fosfato pela via das pentoses-fosfato é favorecido.

A via das pentoses é ativa quando as taxas glicêmicas são altas; os níveis altos de insulina resultantes acarretam, no tecido adiposo, aumento da permeabilidade à glicose e, no fígado, intensa síntese de glicoquinase. Estas duas condições propiciam a síntese de ácidos graxos, via esta também estimulada por insulina. A ocorrência da via das pentoses-fosfato está, portanto, associada a condições celulares em que predominam processos de síntese.

As partes oxidativa e não-oxidativa da via das pentoses-fosfato podem ser acionadas separadamente

A existência de intermediários comuns (glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato) na glicólise e na via das pentoses-fosfato, somada à reversibilidade das reações catalisadas por transaldolases e transcetolases, permite uma grande flexibilidade no metabolismo da glicose. De fato, é possível haver adaptações não só às necessidades celulares de ATP , mas também à produção diferencial de NADPH e ribose 5-fosfato, sem que nenhum dos dois compostos seja acumulado:

1. Quando são necessários NADPH e ribose 5-fosfato simultaneamente, há predomínio da parte oxidativa da via.
2. Quando a necessidade de ribose 5-fosfato é maior do que a de NADPH , a parte oxidativa não é acionada, e a ribose 5-fosfato é obtida a partir da frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, produzidos pela glicólise, através da ação da transaldolase e transcetolase. Esta é a situação vigente na maioria dos tecidos (músculo, por exemplo) que não se encarregam das sínteses redutoras já citadas, mas que devem produzir ribose 5-fosfato para a síntese de nucleotídeos.
3. Quando a necessidade de NADPH (para produção de ácidos graxos, por exemplo) é maior do que a de ribose 5-fosfato, a ribose 5-fosfato produzida na parte oxidativa é convertida a gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato através da etapa não-oxidativa. A frutose 6-fosfato pode retornar à via das pentoses-fosfato após sua conversão a glicose 6-fosfato. O gliceraldeído 3-fosfato poderá originar glicerol 3-fosfato, necessário para a esterificação dos ácidos graxos sintetizados, formando triacilgliceróis. O excedente de gliceraldeído 3-fosfato é conduzido à via glicolítica.

É importante assinalar que, nas condições de carga energética celular alta, a inibição da fosfofrutoquinase não impede que os carbonos originários da glicose sejam incorporados em ácidos graxos. Esta inibição, na verdade, apenas encaminha a glicose 6-fosfato para a via das pentoses-fosfato. Um dos produtos desta via, entretanto, é o gliceraldeído 3-fosfato, que pode retomar a via glicolítica, pois aparece como um intermediário da via formado *adiante* do ponto de inibição (a fosfofrutoquinase 1).

20.4 REGULAÇÃO DO COMPLEXO PIRUVATO DESIDROGENASE

O piruvato tem vários destinos possíveis: ser usado como precursor na síntese de carboidratos (gliconeogênese), aminoácidos (transaminação) e ácidos graxos (via acetil-CoA) ou ser totalmente oxidado a CO_2 (via acetil-CoA e ciclo de Krebs). A ação da *piruvato desidrogenase*, transformando piruvato em acetil-CoA, limita os destinos do piruvato; a acetil-CoA só pode ser oxidada ou convertida a ácidos graxos e colesterol ou seus derivados.

O complexo piruvato desidrogenase está sujeito a modificação covalente, através de fosforilação independente de cAMP. Esta fosforilação é catalisada por uma quinase específica associada ao complexo, a *piruvato desidrogenase quinase* (Fig. 20.8). Quando fosforilado, o complexo torna-se inativo. Uma outra enzima do complexo, a *piruvato desidrogenase fosfatase*, remove o grupo fosfato, reativando o complexo. A insulina estimula esta fosfatase, promovendo a desfosforilação do complexo e, portanto, sua ativação.

A piruvato desidrogenase quinase é ativada alostericamente pelos produtos da reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase — acetil-CoA e NADH — e, também, ATP. Quando as relações acetil-CoA/CoA e NADH/NAD⁺ mitocondriais aumentam, como acontece durante a oxidação intensa de ácidos graxos pelo ciclo de Lynen, a piruvato desidrogenase quinase é estimulada e o complexo piruvato desidrogenase fica inoperante, resultando a impossibilidade de oxidação da glicose.

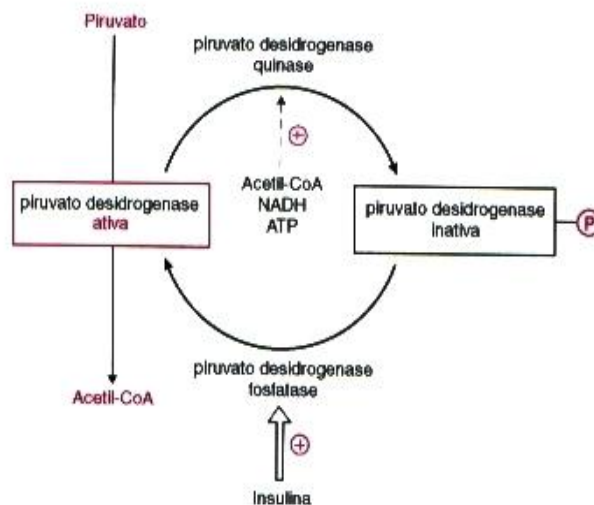


Fig. 20.8 Regulação do complexo piruvato desidrogenase. A interconversão da forma ativa e inativa do complexo depende da ação da insulina (seta dupla) e da ação de efetores alostéricos (seta interrompida): a primeira leva à ativação do complexo e a segunda à sua inativação.

20.5 REGULAÇÃO DO CICLO DE KREBS

O ciclo de Krebs apenas reduz coenzimas, sem reoxidá-las. É, portanto, uma via que não tem autonomia funcional, dependendo da associação com a cadeia de transporte de elétrons para manter-se ativa.

A velocidade de oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs é regulada pela relação NAD⁺/NADH, que, por sua vez, está na dependência direta da velocidade da cadeia de transporte de elétrons, isto é, do controle respiratório. A razão entre as formas oxidada e reduzida da coenzima é importante, não só porque o ciclo

inclui três reações de óxido-redução que requerem NAD^+ , como pelo fato de NADH ser inibidor alostérico de enzimas do ciclo. A regulação do ciclo de Krebs é exercida em dois níveis: o controle sobre a produção de citrato e, posteriormente, o controle sobre sua oxidação a CO_2 e oxaloacetato.

A atividade da citrato sintase depende da concentração de oxaloacetato

O primeiro ponto de controle do ciclo é a reação catalisada pela *citrato sintase*. A atividade desta enzima depende, é claro, das concentrações de seus substratos, especialmente do nível de *oxaloacetato*, cujas baixas concentrações mitocondriais são o fator limitante da oxidação da acetil-CoA pelo ciclo. Esta limitação é contornada pelo aumento da concentração de oxaloacetato induzida pela própria acetil-CoA. De fato, a *acetil-CoA* é efetador alostérico positivo da *piruvato carboxilase*. Desta forma, ao elevar-se o nível de acetil-CoA, como resultado da degradação de carboidratos, ácidos graxos e aminoácidos, a piruvato carboxilase ativada deriva o piruvato proveniente de carboidratos ou de alguns aminoácidos para síntese de oxaloacetato. A elevação da concentração de oxaloacetato permite máxima atividade da citrato sintase.

O destino metabólico do citrato depende da atividade da isocitrato desidrogenase

Uma vez formado, o citrato poderá ser oxidado, através de prévia conversão a seu isômero, o isocitrato, por ação da aconitase. Se a oxidação de isocitrato estiver alostericamente impedida (ver a seguir), o equilíbrio da reação catalisada pela aconitase favorece o acúmulo de citrato.

A "decisão" entre oxidação ou acúmulo de citrato está na dependência do segundo e mais importante sítio de regulação do ciclo de Krebs: a reação catalisada pela *isocitrato desidrogenase*. Sobre esta enzima atuam dois efetadores alostéricos: o *ADP* tem efeito positivo, e o *NADH*, negativo. Níveis altos de *ADP*, assinalando a necessidade celular de *ATP*, estimulam a enzima, levando à oxidação do citrato. Este aumento da velocidade do ciclo leva à produção de coenzimas reduzidas e conseqüente ativação da fosforilação oxidativa. À medida que a concentração de *ADP* diminui, decresce também a velocidade da fosforilação oxidativa, havendo então um aumento da concentração de *NADH*, o inibidor alostérico da isocitrato desidrogenase. O citrato acumulado flui para o citossol, onde inibe a fosfofrutoquinase 1, ajustando a velocidade da glicólise à do ciclo de Krebs; além disto, é o citrato citossólico o precursor da formação de acetil-CoA citossólica, que será utilizada na síntese de ácidos graxos. Desta forma, a inibição da isocitrato desidrogenase assinala suprimento adequado de *ATP* e desvia o fluxo metabólico da oxidação para o armazenamento.

O *complexo α -cetoglutarato desidrogenase* constitui o terceiro sítio de controle, sendo inibido por succinil-CoA, *NADH* e *ATP*. O ciclo apresenta ainda controles secundários: a citrato sintase é inibida competitivamente por succinil-CoA, e a succinato desidrogenase, por oxaloacetato (Fig. 20.9).

Não há regulações por modificação covalente conhecidas para o ciclo de Krebs.

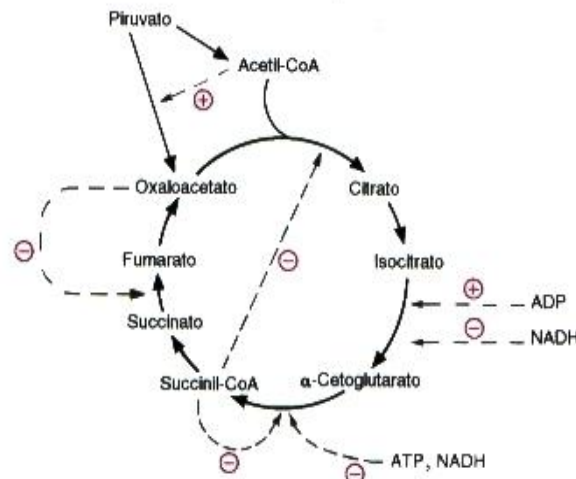


Fig. 20.9 Principais regulações alostéricas do ciclo de Krebs (setas interrompidas).

20.6 REGULAÇÃO DA CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

As velocidades do transporte de elétrons (medida pela velocidade de consumo de O_2) e da síntese de ATP estão fortemente acopladas. De fato, se a síntese de ATP é absolutamente dependente do fluxo de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons, a recíproca também é verdadeira, ou seja, o fluxo de elétrons só ocorre enquanto houver síntese de ATP. Este controle, denominado *controle respiratório* ou *controle do aceptor*, tem um claro sentido de economia celular: a oxidação de substratos é impedida sempre que a concentração de ATP tem níveis compatíveis com a demanda. A velocidade de produção de ATP é determinada fundamentalmente pela disponibilidade de ADP e P_i , os substratos da ATP sintase. Entre os dois, o ADP é o fator limitante, especialmente porque a soma $[ADP] + [ATP]$ é constante e o aumento da síntese de ATP acarreta, obrigatoriamente, diminuição da concentração de ADP (por isto, este controle é designado *controle do aceptor*, já que o ADP é o aceptor do grupo fosfato na síntese de ATP). Na verdade, a concentração celular de ATP é normalmente mantida muito mais alta (de 4 a 10 vezes) do que a de ADP. Assim, a síntese de ATP processa-se em velocidade paralela à sua utilização. Vale lembrar que o conteúdo celular total de ATP é muito pequeno e sua utilização celular contínua e intensa. Um indivíduo adulto requer diariamente cerca de 2.000 vezes mais ATP do que seu organismo dispõe. Este dado enfatiza a necessidade da síntese contínua de ATP e o seu alto *turnover*. Por outro lado, explica o tempo diminuto em que uma célula aeróbia pode viver na ausência de oxigênio.

A concentração mitocondrial de ATP está em equilíbrio com sua concentração citossólica através da ação da ADP/ATP translocase, que promove a troca de ATP mitocondrial por ADP citossólico. A atuação desta translocase é decisiva, porque a maior parte da síntese de ATP ocorre na mitocôndria, mas sua utilização é principalmente feita no citossol.

Um eventual aumento da concentração de ATP tem duas conseqüências indiretas. Em primeiro lugar, pelo íntimo acoplamento com a cadeia de transporte de elétrons, este aumento será imediatamente acompanhado por acréscimo da concentração de NADH, que não poderá mais ser oxidado na cadeia de transporte de elétrons. Em segundo lugar, ATP e NADH passam a exercer seus efeitos de efetadores alostéricos em várias enzimas das vias metabólicas degradativas.

20.7 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE TRIACILGLICERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS

A utilização ou a reconstrução do depósito de triacilgliceróis do tecido adiposo — a maior reserva energética dos animais vertebrados — ocorrem em condições de carência ou disponibilidade de nutrientes, respectivamente, que desencadeiam processos reguladores diferentes. Variações das necessidades energéticas, como acontece, por exemplo, entre o esforço físico vigoroso e o estado de repouso, também determinam alteração no sentido do metabolismo dos triacilgliceróis. Os hormônios que participam decisivamente dessas regulações são insulina, glucagon e adrenalina.

A degradação de triacilgliceróis é desencadeada por glucagon e adrenalina e inibida por insulina

A mobilização da reserva de triacilgliceróis depende, primariamente, da atividade da lipase dos adipócitos, uma enzima regulada por modificação covalente e, portanto, submetida à ação hormonal.

Em condições de baixa ingestão calórica, há liberação de glucagon e, em atividade física intensa, de adrenalina, que estimulam a degradação dos triacilgliceróis de maneira análoga à ativação da glicogenólise: a lipase dos adipócitos é ativada por fosforilação pela proteína quinase dependente de cAMP (Fig. 20.10), determinando a hidrólise dos triacilgliceróis e liberando ácidos graxos para a corrente sanguínea, que suprirão a demanda energética de tecidos como o músculo e o fígado. O aumento do nível de ácidos graxos no plasma promove a sua tomada por esses tecidos, aumentando, assim, a oferta de substratos para a β -oxidação. Esta via ocorre dentro da mitocôndria e é exatamente o transporte dos ácidos graxos para o interior dessa organela que define a sua oxidação. Como será visto adiante, no jejum ou exercício vigoroso, o transporte e a oxidação de ácidos graxos estão estimulados.

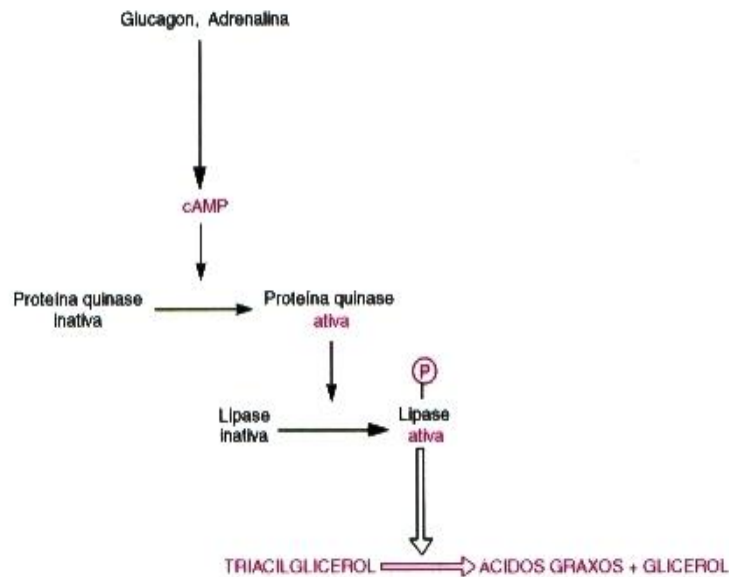


Fig. 20.10 Regulação hormonal da lipase do tecido adiposo. A seqüência da ativação induzida por adrenalina e glucagon, que utilizam cAMP como segundo mensageiro, é semelhante à da ativação da glicogênio fosforilase em músculos e fígado.

A insulina, liberada quando a glicemia é alta, sinalizando abundância de nutrientes, promove a desfosforilação e, portanto, a inibição da lipase dos adipócitos. As atuações da insulina que levam ao predomínio da forma não-fosforilada de enzimas ocorrem através de mecanismos ainda não esclarecidos, podendo estar correlacionadas com a diminuição dos níveis de cAMP (Capítulo 19). Os inibidores da fosfodiesterase de cAMP, como *cafeína* e *teofilina*, que mantêm concentrações altas do nucleotídeo cíclico, provocam um aumento no nível plasmático de ácidos graxos em seres humanos.

A atividade da acetil-CoA carboxilase é crucial para a síntese de ácidos graxos

A síntese de ácidos graxos (e, conseqüentemente, a de triacilgliceróis) pelo fígado e adipócitos tem como ponto principal de regulação a formação de malonil-CoA a partir da acetil-CoA, catalisada pela *acetil-CoA carboxilase*. A enzima de aves e mamíferos é constituída por protômeros cataliticamente inativos que, ao associarem-se, formam a enzima polimérica ativa. A conversão entre as formas ativa e inativa sofre regulação alostérica, que reflete o nível intracelular de efetadores, e regulação hormonal, que sinaliza as necessidades globais do organismo.

A polimerização das subunidades processa-se na presença de *citrato*; *palmitoil-CoA*, o produto da via de síntese, tem efeito oposto, despolimerizando e, portanto, inativando a enzima.

Os níveis citoplasmáticos de citrato elevam-se quando ele não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs, em virtude da inibição da isocitrato desidrogenase e do complexo α -cetogluturato desidrogenase. É o que acontece quando a relação ATP/ADP celular é alta: o controle respiratório determina uma menor velocidade de oxidação de coenzimas pela cadeia de transporte de elétrons, havendo um acúmulo de NADH, o efetador alostérico negativo das duas enzimas citadas. O citrato então acumulado é transportado da mitocôndria para o citossol, onde tem várias atuações:

1. inibe a fosfofrutoquinase 1
2. estimula a acetil-CoA carboxilase
3. origina acetil-CoA citossólica

O acúmulo de citrato sinaliza, portanto, a disponibilidade de energia e de precursores para a síntese de ácidos graxos, obtidos, em mamíferos, a partir de carboidratos da dieta, principalmente (Fig. 20.11).

Palmitoil-CoA, o efetador alostérico negativo da acetil-CoA carboxilase, inibe, ainda, a *citrato liase* e a *tricarboxilato translocase* (responsável pela transferência de citrato para o citossol), exercendo um controle amplo sobre a síntese de ácidos graxos. Inibe também a *piruvato desidrogenase*, limitando o fornecimento de acetil-CoA proveniente de piruvato para a síntese de ácidos graxos.

A acetil-CoA carboxilase também é regulada por modificação covalente: glucagon e adrenalina promovem sua fosforilação, que é acompanhada por dissociação nos protômeros inativos. A insulina tem efeito oposto, determinando a desfosforilação e a ativação da enzima, estimulando, assim, a síntese de ácidos graxos.

Nos vegetais e procaríotos, a acetil-CoA carboxilase não exibe a regulação descrita para os vertebrados. A enzima de vegetais, localizada nos cloroplastos, é ativada pelo aumento do pH e da concentração de Mg^{2+} do estroma, obtidos com a incidência de luz. Nas bactérias, organismos que não armazenam triacilgliceróis, os ácidos graxos são utilizados fundamentalmente como precursores de lipídios estruturais de membrana; sua síntese, portanto, é estimulada quando ocorre divisão celular.

Durante a síntese de ácidos graxos, a sua degradação é impedida

Quando a acetil-CoA carboxilase está ativada, aumenta a concentração de malonil-CoA, que, além de ser substrato da síntese de ácidos graxos, exerce um papel regulador na degradação desses compostos. Malonil-CoA inibe a *carnitina acil transferase I* (Fig. 20.11), a enzima responsável pela introdução de radicais acila na mitocôndria, o compartimento celular onde ocorre a sua degradação. Esta inibição previne a entrada e oxidação na mitocôndria dos ácidos graxos recém-sintetizados, pois, enquanto ocorre a síntese, os níveis citoplasmáticos de malonil-CoA permanecem elevados.

Outras ações da insulina estimulam ainda mais a síntese de ácidos graxos e de triacilgliceróis

A insulina, liberada após ingestão de refeições ricas em carboidratos, atua na síntese de lipídios, desde a entrada de glicose nas células até a transcrição de genes que codificam enzimas da via.

O aumento do transporte de glicose para dentro da célula aumenta não só a disponibilidade de precursores para a síntese de ácidos graxos, como também a de glicerol 3-fosfato, permitindo a esterificação dos ácidos

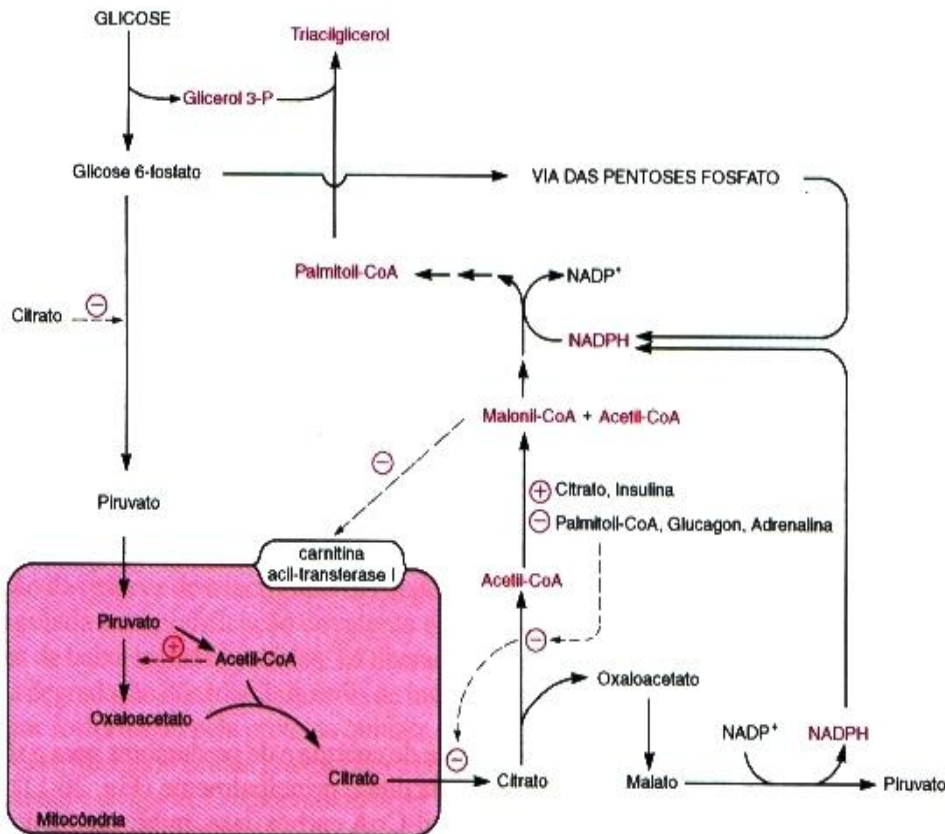


Fig. 20.11 Esquema das regulações alostéricas e hormonais que incidem na síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis a partir de glicose.

graxos sintetizados. O tecido adiposo, responsável pelo armazenamento de triacilgliceróis, não dispõe de glicerol quinase e obtém glicerol 3-fosfato por redução de diidroxiacetona fosfato, proveniente da glicose através da via glicolítica, que também é estimulada por insulina. Só dispondo de glicose, o adipócito pode, portanto, sintetizar e armazenar triacilgliceróis. Com efeito, os carboidratos da dieta são a principal fonte de carbonos para a construção do depósito de triacilgliceróis nos seres humanos. No fígado, o glicerol 3-fosfato pode ser formado por redução de diidroxiacetona fosfato ou por fosforilação de glicerol pela glicerol quinase, enzima restrita praticamente a este órgão.

Adicionalmente à acetil-CoA carboxilase, outras enzimas são estimuladas por insulina, levando a um aumento na síntese de lipídios: *piruvato desidrogenase* e *glicerol 3-fosfato acil transferase*.

A insulina participa, ainda, do controle do nível de enzimas. A concentração de acetil-CoA carboxilase, sintase de ácidos graxos e lipase lipoproteica aumenta consideravelmente alguns dias após ingestão de dieta rica em carboidratos, devido à liberação de insulina. No jejum ou diabetes, essas ações são revertidas por glucagon.

No jejum, o glucagon determina a degradação de triacilgliceróis e ácidos graxos

A regulação da lipase dos adipócitos, descrita no início desta seção, determina a mobilização do depósito de triacilgliceróis em situações de jejum. Simultaneamente, no fígado, a síntese de ácidos graxos, já dificultada pela diminuição da produção de piruvato proveniente da glicólise (que se encontra inibida), é bloqueada pela inativação da acetil-CoA carboxilase. Como consequência, há uma diminuição da concentração de malonil-CoA e ativação da carnitina acil transferase I, o que possibilita o transporte dos grupos acila dos ácidos graxos para o interior da mitocôndria, onde são oxidados.

No jejum, portanto, o ciclo da β -oxidação funciona ativamente, alimentado pelos ácidos graxos liberados do tecido adiposo. Esta via não é submetida a nenhum tipo de regulação. Na realidade, o seu funcionamento depende da disponibilidade de substrato e do suprimento de coenzima A e de coenzimas oxidadas (NAD^+ , FAD) provenientes da cadeia de transporte de elétrons. Como a glicólise e o ciclo de Krebs estão desativados por falta de substrato (e por todos os mecanismos inibitórios então desencadeados), o fornecimento de coenzimas oxidadas destina-se exclusivamente ao ciclo de Lynen. A coenzima A utilizada por este ciclo provém da conversão de acetil-CoA a corpos cetônicos.

A acetil-CoA produzida na β -oxidação é desviada para a formação de corpos cetônicos, já que não pode ser quantitativamente oxidada pelo ciclo de Krebs, uma vez que o oxaloacetato está sendo seqüestrado pela gliconeogênese estimulada por glucagon. Este hormônio, portanto, além de promover a manutenção da glicemia, provê o fornecimento de ácidos graxos e corpos cetônicos para satisfazer as necessidades energéticas dos tecidos que podem oxidá-los.

A síntese de ácidos graxos e de triacilgliceróis, como já assinalado, ficam inibidas no jejum, devido aos efeitos do glucagon — antagônicos aos da insulina — sobre a atividade e a concentração de enzimas.

O controle global do metabolismo de lipídios depende, efetivamente, da relação insulina/glucagon, assunto este que será detalhado no Capítulo 21.

20.8 REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO COLESTEROL

As lipoproteínas plasmáticas encarregam-se da distribuição de colesterol aos tecidos e também da sua remoção

O colesterol presente na maioria das células do organismo humano é obtido por síntese *de novo* (a partir de acetil-CoA) ou é fornecido por lipoproteínas plasmáticas. O colesterol transportado pelas lipoproteínas origina-se dos alimentos ou da síntese, feita principalmente pelo fígado e intestino.

Os lipídios da dieta ganham a circulação sangüínea sob a forma de quilomícrons, sintetizados no intestino (Fig. 20.12). Nos tecidos extra-hepáticos, os triacilgliceróis componentes dos quilomícrons são hidrolisados pela lipase lipoproteica, fornecendo ácidos graxos e glicerol. Os remanescentes dos quilomícrons, então enriquecidos em colesterol, são retirados da circulação pelo fígado. Os quilomícrons são, portanto, responsá-

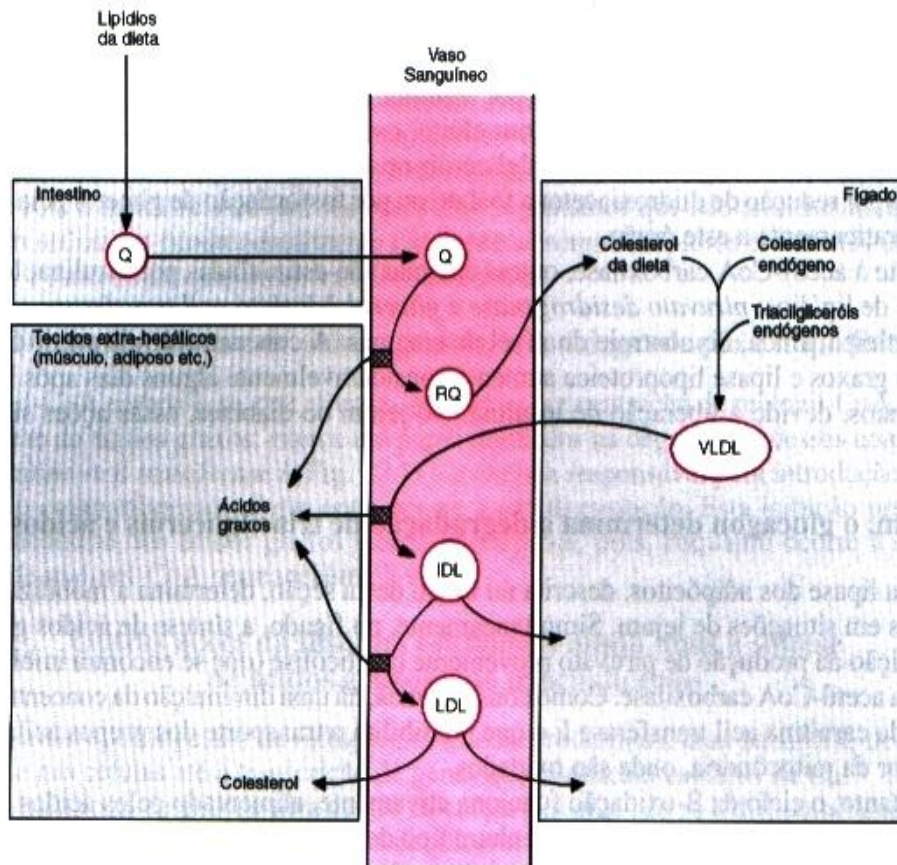


Fig. 20.12 Transporte de lipídios aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas. Os retângulos quadriculados voltados para o lúmen do vaso sanguíneo representam a lipase lipoproteica. Q = quilomícron; RQ = remanescente de quilomícron.

veis pela distribuição de triacilgliceróis aos tecidos extra-hepáticos e de colesterol, principalmente, ao fígado.

Vale lembrar que, na situação pós-prandial, o fígado sintetiza ativamente triacilgliceróis e colesterol, que se somam àqueles provenientes dos quilomícrons. Os triacilgliceróis e o colesterol que excedem as necessidades dos próprios hepatócitos são utilizados para a síntese das VLDL, que são, então, exportadas. À medida que estas lipoproteínas circulam pelos capilares que irrigam os tecidos extra-hepáticos, os triacilgliceróis delas componentes são hidrolisados pela lipase lipoproteica. Deste processo, resultam as IDL, enriquecidas em colesterol. Uma fração das IDL retorna ao fígado e o restante, após outro ciclo de remoção de triacilgliceróis pelos tecidos periféricos, origina as LDL, as lipoproteínas plasmáticas que apresentam o maior teor de colesterol. De fato, as LDL constituem o principal veículo de colesterol no sangue: os tecidos (exceto fígado e intestino) obtêm a maior parte de seu colesterol exógeno a partir da endocitose de LDL.

As HDL atuam no sentido inverso ao das LDL, ou seja, efetuam a remoção de colesterol dos tecidos (Fig. 20.13). As HDL são sintetizadas no fígado e intestino como uma lipoproteína rica em proteína e contendo um teor relativamente baixo de colesterol: são as chamadas HDL nascentes. Elas ligam-se à superfície dos tecidos periféricos e o excesso de colesterol intracelular é translocado para a membrana plasmática e, em seguida, para o interior das HDL, como ésteres de colesterol. As HDL enriquecidas em colesterol — HDL maduras — podem ser diretamente absorvidas pelo fígado (seta 1 da Fig. 20.13), onde o colesterol pode ser transformado em sais biliares que são, então, excretados. Adicionalmente, elas podem transferir colesterol para outras lipoproteínas plasmáticas (VLDL e LDL, principalmente), que também são absorvidas pelo fígado (seta 2 da Fig. 20.13). Em resumo, as HDL fazem um transporte reverso de colesterol, dos tecidos para o fígado, o único órgão do organismo capaz de eliminar colesterol.

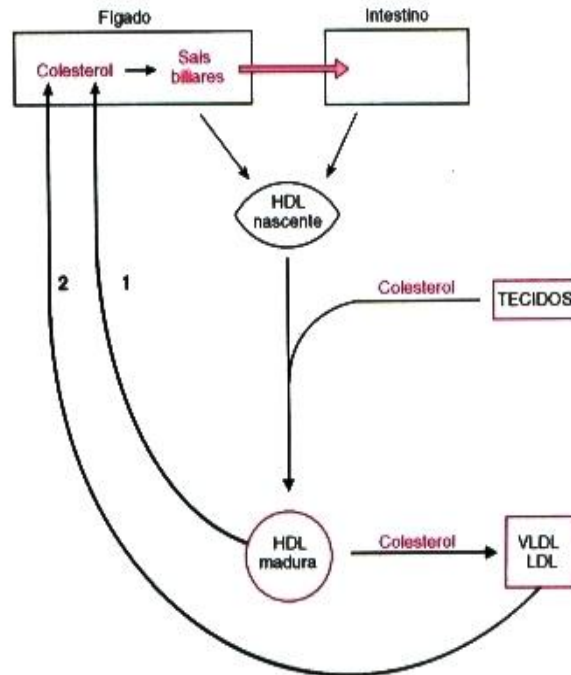


Fig. 20.13 Esquema simplificado da remoção de colesterol dos tecidos por HDL. As HDL são sintetizadas pelo fígado e intestinos como uma partícula discóide — HDL nascente — que, após incorporação de colesterol no seu interior, converte-se em uma partícula esférica — HDL madura. O colesterol origina-se do colesterol em excesso nos tecidos. As HDL maduras podem transferir colesterol para outras lipoproteínas (VLDL e LDL), através de reações pouco conhecidas. As partículas contendo alto teor de colesterol são transportadas para o fígado (setas 1 e 2), onde o colesterol excedente pode ser convertido em sais biliares e excretado.

A concentração intracelular de colesterol regula a sua síntese

A regulação da síntese de colesterol incide principalmente sobre a reação catalisada pela *HMG-CoA redutase*, através de alterações na atividade e na concentração da enzima. Sua atividade é modulada por fosforilação/desfosforilação: a forma desfosforilada é ativa e a forma fosforilada, inativa. Como acontece com outras enzimas reguladoras de vias de síntese, glucagon e adrenalina promovem a fosforilação e, portanto, a inativação da enzima; a insulina determina a estimulação da enzima, por desfosforilação, sinalizando a abundância de precursores e de energia. A concentração da HMG-CoA redutase é regulada por variação da expressão gênica e da velocidade de degradação da enzima. Colesterol e mevalonato inibem a síntese e a tradução do mRNA da HMG-CoA redutase e aumentam a velocidade de degradação da enzima.

A síntese de *receptores de LDL* também é inibida por níveis elevados de colesterol intracelular. As LDL penetram nas células por endocitose adsorptiva, que se inicia pela ligação da lipoproteína ao seu receptor presente na membrana plasmática. Sendo assim, uma diminuição do número de receptores de LDL propicia uma redução no aporte de colesterol para as células. A consequência da menor incorporação celular de LDL-colesterol é o aumento da sua concentração no plasma.

A importância do número de receptores de LDL no controle do nível plasmático de colesterol é evidenciada por uma doença hereditária, a *hipercolesterolemia familiar*, caracterizada pela ausência de receptores funcionais e, também, por concentrações muito elevadas de colesterol plasmático. As consequências do aumento do nível de colesterol e os procedimentos terapêuticos utilizados para obter a sua redução serão descritos a seguir.

A aterosclerose correlaciona-se com níveis aumentados de colesterol plasmático

A regulação do metabolismo do colesterol vem sendo extensivamente estudada, especialmente depois que foi estabelecida com clareza a relação entre níveis plasmáticos altos de colesterol e incidência de *ateroscle-*

rose. Esta doença caracteriza-se pela deposição de lipídios — especialmente colesterol e ésteres de colesterol — na parede interna de artérias, formando placas, denominadas *ateromas*¹. A consistência inicial dos ateromas é pastosa, podendo evoluir para placas fibrosas e calcificadas. Estas lesões determinam um estreitamento de artérias e desencadeiam a formação de coágulos, que podem levar à sua oclusão. Resulta o bloqueio da irrigação do tecido em questão e a sua morte, devido à interrupção do aporte de oxigênio e, conseqüentemente, da produção de energia, obtida através da oxidação aeróbia de nutrientes, na grande maioria das células. Isto é o que acontece nos casos de enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, embolia pulmonar etc. A aterosclerose é o tipo mais freqüente de *arteriosclerose* (esclerose de artérias); as doenças cardiovasculares dela resultantes são a principal causa de morte nos países desenvolvidos.

A ocorrência de aterosclerose não depende diretamente do nível total de colesterol plasmático, mas sim do nível de colesterol presente nas LDL (LDL-colesterol). Por outro lado, há uma correlação inversa com o nível de HDL, que tem um efeito protetor contra a aterosclerose. Estas constatações são coerentes com as funções exercidas pelos dois tipos de lipoproteínas plasmáticas: LDL fornece colesterol aos tecidos e HDL remove o excesso de colesterol das células, que, depois de transportado para o fígado, pode ser excretado. O LDL-colesterol e o HDL-colesterol costumam ser chamados de “mau” e “bom” colesterol, respectivamente. Esta denominação refere-se, é óbvio, ao papel desempenhado pelos dois tipos de lipoproteínas, já que a molécula de colesterol é sempre a mesma. Doenças caracterizadas por níveis elevados e crônicos de LDL, como o diabetes, costumam estar associadas a aterosclerose. O exemplo mais dramático, porém, refere-se à hipercolesterolemia familiar; os homocigotos apresentam concentração plasmática de LDL cerca de cinco vezes maior que o normal, e a maioria morre de enfarte do miocárdio na infância.

A predisposição genética tem influência decisiva na concentração do LDL-colesterol

Atualmente, acredita-se que o patrimônio genético de um indivíduo é o principal responsável pelo seu perfil de lipoproteínas plasmáticas e, portanto, pela possibilidade de desenvolver aterosclerose. Afora os portadores de defeitos genéticos relativamente raros — a hipercolesterolemia familiar, por exemplo — uma parcela significativa da população dos países desenvolvidos apresenta uma predisposição genética para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares. Todavia, diversos outros fatores, que poderiam ser chamados de “ambientais”, interferem no nível de colesterol plasmático.

A composição da dieta tem influência fundamental sobre a concentração de LDL-colesterol. A *hipercolesterolemia* pode ser desencadeada por ingestão excessiva de lipídios. A redução do teor de colesterol da dieta tem um efeito parcial, devido à estimulação concomitante da sua síntese endógena. A ingestão de gorduras saturadas (gorduras de origem animal) tem, reconhecidamente, um efeito hipercolesterolêmico, e a sua substituição por gorduras contendo ácidos graxos mono ou poliinsaturados (gorduras de origem vegetal) é extremamente benéfica na redução do colesterol do organismo (os alimentos ricos em um ou outro tipo de ácido graxo estão alistados no Capítulo 18). Diversas hipóteses têm sido aventadas para explicar esse efeito dos ácidos graxos insaturados, tais como: estimulação da excreção de colesterol como sais biliares, aumento da síntese de receptores de LDL etc. Deste modo, para a manutenção de níveis recomendados de colesterol plasmático, acredita-se ser mais importante reduzir o teor de ácidos graxos saturados da dieta do que o teor de colesterol.

Quando alterações na dieta não são suficientes para a normalização do colesterol plasmático, utilizam-se terapias medicamentosas, que visam reduzir a síntese endógena de colesterol ou aumentar a sua excreção como sais biliares. No primeiro caso, empregam-se metabólitos de fungos, que atuam como inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, como a lovastatina; no segundo caso, resinas positivamente carregadas, que, por ligarem-se aos sais biliares (negativamente carregados), impedem a sua reabsorção intestinal, estimulando a conversão de colesterol em sais biliares, ou seja, a sua excreção. Os dois tipos de terapia acarretam um aumento do número de receptores de LDL e, conseqüentemente, uma maior tomada destas partículas.

A qualidade de vida do indivíduo é, ainda, decisiva na prevenção da aterosclerose, que tem sido freqüentemente associada ao estresse emocional, sedentarismo, obesidade etc.

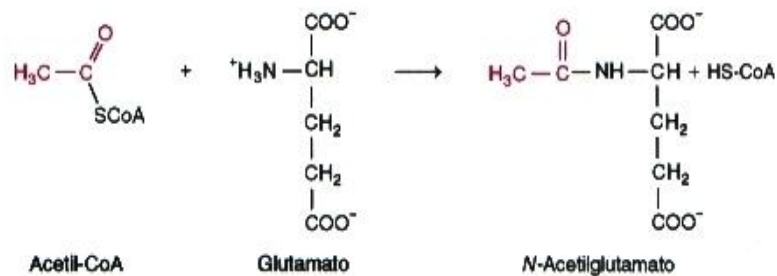
¹A denominação *ateroma* deriva da palavra grega “*athere*”, que significa pastoso, seguida do sufixo “*oma*”, porque, quando as placas foram descobertas, acreditava-se serem formações tumorais.

A aterosclerose é uma condição patológica extremamente complexa, afetada por um número muito grande de variáveis. A descoberta recente de novos tipos de lipoproteínas, cujo nível plasmático é determinado geneticamente, sem ser afetado por fatores ambientais, vem dificultar ainda mais a elaboração de esquemas terapêuticos para a sua prevenção.

20.9 REGULAÇÃO DO CICLO DA URÉIA

A quantidade de uréia excretada por um indivíduo aumenta significativamente em duas situações pouco usuais: ingestão de uma dieta com alto teor de proteína (Capítulo 18) e jejum prolongado (Capítulo 21). No primeiro caso, os aminoácidos excedentes são oxidados, originando os respectivos cetoácidos, que são convertidos em triacilgliceróis, e os grupos amino, que resultam em aumento da produção de uréia. No jejum prolongado, intensifica-se a degradação de proteínas do músculo e as cadeias carbônicas dos aminoácidos são utilizadas como precursores da gliconeogênese; a eliminação dos grupos amino resultantes determina, novamente, excreção aumentada de uréia. Nessas duas situações, o que ocorre é um acréscimo na velocidade de síntese das enzimas do ciclo da uréia e da carbamoilfosfato sintetase (p. 221).

A síntese de uréia também é submetida a regulação alostérica: a carbamoilfosfato sintetase é estimulada por *N*-acetilglutamato, um composto produzido a partir de glutamato — cuja concentração se eleva quando há uma maior degradação de aminoácidos — e acetil-CoA.



Esta reação é catalisada pela *N*-acetilglutamato sintetase, que é ativada por *arginina*, um intermediário do ciclo da uréia. Se a produção de uréia não ocorrer em velocidade adequada para eliminar a amônia produzida pelo catabolismo de aminoácidos, acumula-se *arginina*. Graças à sua atuação como efetador alostérico, este aminoácido provoca um aumento da concentração de *N*-acetilglutamato, que, por sua vez, estimula a carbamoilfosfato sintetase, a enzima que fornece um dos substratos do ciclo da uréia. Deste modo, a *arginina* permite adequar a velocidade de formação de amônia à sua conversão em uréia.

21

REGULAÇÃO INTEGRADA DO METABOLISMO

As respostas do organismo a duas situações distintas — abundância e escassez de nutrientes — ilustram a integração dos processos que compõem a regulação metabólica. Dentre estes processos, os mais relevantes são: compartimentalização celular, variação da concentração de coenzimas, mudança na atividade de enzimas alostéricas, modificação covalente de proteínas, variação da concentração de enzimas (alteração da expressão gênica) e intervenção hormonal. A integração metabólica ocorre, portanto, em dois níveis: o celular, que compreende os mecanismos reguladores intracelulares, e o nível do organismo como um todo, coordenado pela ação hormonal.

A concentração das enzimas varia com a oferta de nutrientes

Várias seções deste livro referem-se à importância da modulação do nível de enzimas como um mecanismo de regulação. Este Capítulo trata de reunir as enzimas mais relevantes para a adaptação metabólica à disponibilidade de nutrientes e salientar os aspectos gerais deste controle.

Quando há abundância de nutrientes, os próprios substratos ou os hormônios que aumentam de concentração nessas condições — insulina, principalmente — induzem a síntese de enzimas de vias biossintéticas, resultando no preenchimento das reservas energéticas e em diversas outras sínteses. Nos intervalos entre as refeições, a concentração dessas enzimas decresce devido à queda do nível dos hormônios que promoveram a sua produção ou pela liberação de outros hormônios — glucagon, principalmente, e cortisol — que passam a inibir a sua formação. Concomitantemente, há a estimulação da síntese de outras enzimas que aceleram a mobilização dos depósitos de energia e a gliconeogênese, capacitando o fígado para fornecer glicose, indispensável a diversas células.

Em resumo, as flutuações na oferta de nutrientes determinam proporções diferentes entre os hormônios que provocam a indução ou a repressão da transcrição de genes estruturais de enzimas, que terão, então, suas concentrações modificadas. Particularmente notável é a alteração da relação insulina/glucagon e sua repercussão na concentração de enzimas hepáticas (Quadro 21.1).

A integração metabólica será analisada nos períodos subsequentes à ingestão de uma refeição: o período absorptivo, o pós-absorptivo e o jejum.

Quadro 21.1 Enzimas hepáticas cuja concentração aumenta com a disponibilidade de nutrientes e com a relação insulina/glucagon

Alimentação farta (insulina/glucagon alta)	Jejum (insulina/glucagon baixa)
Glicoquinase	Piruvato carboxilase
Fosfofrutoquinase	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Piruvato quinase	Frutose 1,6-bisfosfatase
Glicogênio sintase	Glicose 6-fosfatase
Citrato liase	
Enzima málica	
Glicose 6-fosfato desidrogenase	
Acetil-CoA carboxilase	
Sintase de ácidos graxos	
HMG-CoA redutase	
Lipase lipoproteica	

21.1 PERÍODO ABSORTIVO

A alta relação insulina/glucagon induz sínteses no período absorptivo

O período absorptivo (Fig. 21.1), que se segue à ingestão de alimentos, caracteriza-se, naturalmente, pela ocorrência de processos biossintéticos que incluem a recomposição das reservas energéticas (Quadro 21.2), diminuídas pelo jejum precedente.

Após uma refeição, os nutrientes absorvidos no intestino são conduzidos diretamente ao fígado. Cerca de dois terços da glicose que chega ao fígado é por ele captada. De fato, este órgão retém 5% do seu peso como glicogênio (80 g) e, após uma refeição rica em carboidratos, esse percentual é elevado ao dobro, acumulando cerca de 150 g do polissacarídeo. O excedente de glicose é mantido em circulação, provocando um aumento da glicemia, a que o pâncreas responde aumentando a liberação de insulina e diminuindo a de glucagon (Quadro 21.3). A elevação da relação insulina/glucagon determina profundas e amplas alterações metabólicas.

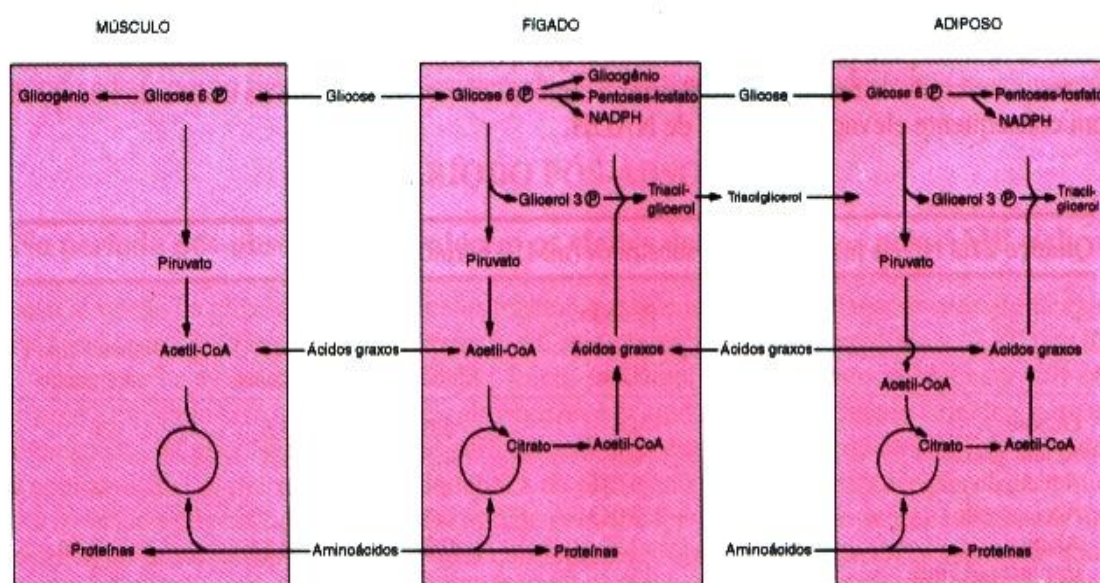


Fig. 21.1 Período absorptivo: esquema da distribuição dos nutrientes absorvidos e do seu destino no fígado, músculos e tecido adiposo. O transporte de ácidos graxos e triacilgliceróis pelas lipoproteínas plasmáticas não está mostrado. A alta relação insulina/glucagon determina a predominância dos processos de síntese.

Quadro 21.2 Distribuição das reservas energéticas de um homem adulto

Órgão	Composto armazenado	Massa (kg)	Energia disponível	
			(kcal)	(kJ)
Fígado ¹	Glicogênio	0,150	600	2.510
Músculo	Glicogênio	0,300	1.200	5.020
Músculo	Proteína ¹	6	24.000	100.410
Adiposo	Triacilglicerol	15	135.000	564.840

¹Embora proteína não constitua material de reserva, em jejum extremo, 50% do seu total chegam a ser consumidos.

A diminuição dos níveis de glucagon e o aumento dos níveis de insulina desativam o sistema adenilato ciclase nas células-alvo destes hormônios, como os hepatócitos. Neles, a queda do nível de cAMP inativa a proteína quinase, que deixa de fosforilar a proteína inibidora das fosfoproteína fosfatases. Estas enzimas, agora ativas, provocam a desfosforilação da fosforilase quinase, da glicogênio fosforilase e da glicogênio sintase, inativando as duas primeiras e ativando a enzima de síntese.

A glicose recebida pelo fígado é fosforilada pela glicocinase, cuja síntese é induzida por insulina. A glicose 6-fosfato, além de ser metabolizada pela glicólise, origina glicose 1-fosfato para a síntese de glicogênio.

A via glicolítica tem suas enzimas reguladoras na forma ativa. De fato, com a razão insulina/glucagon alta, a desfosforilação faz prevalecer a atividade de fosfofrutoquinase 2 sobre a de frutose 2,6-bisfosfatase. Resultam níveis altos de frutose 2,6-bisfosfato, o ativador alostérico da fosfofrutoquinase 1. A frutose 1,6-bisfosfato, produzida na reação catalisada por esta última enzima, estimula a piruvato quinase. A insulina também provoca a desfosforilação de piruvato desidrogenase, aumentando a sua atividade.

A estimulação destas três enzimas-chave — fosfofrutoquinase 1, piruvato quinase e piruvato desidrogenase — determina um aumento da produção de acetil-CoA a partir de carboidratos. A acetil-CoA é também produzida pela oxidação de ácidos graxos e aminoácidos provenientes da dieta. A piruvato carboxilase é ativada pela acetil-CoA, desviando parte do piruvato para produção de oxaloacetato. O esqueleto de carbono de vários aminoácidos vem enriquecer a concentração de intermediários do ciclo de Krebs, potencialmente capazes de se transformar em oxaloacetato. Esse substancial aumento dos dois substratos da citrato sintase — acetil-CoA e oxaloacetato — faz acelerar o ciclo de Krebs e, portanto, a produção de NADH e FADH₂, também originados na β -oxidação. Dispondo de tantas coenzimas reduzidas, a cadeia de transporte de elétrons fica estimulada, levando à grande produção de ATP. A alta atividade desses processos mantém-se enquanto houver ADP suficiente para promovê-los. À medida que a concentração de ADP diminui, a fosforilação oxidativa decresce e o controle respiratório determina também menor velocidade da cadeia de transporte de elétrons, com conseqüente elevação do nível de NADH.

Quadro 21.3 Níveis plasmáticos de substratos (mM) e hormônios

	Período absorptivo	Período pós-absortivo (12 h)	Jejum		Diabetes tipo I não tratado
			3 dias	5 semanas	
Glicose	6,7	4,4	3,6	3,6	28
Ácidos graxos	0,3	0,6	1,5	1,4	2,5
β -hidroxibutirato	0,010	0,016	1,4	6	16
Acetoacetato	0,010	0,013	0,4	1,3	4
Alanina	0,8	0,34	0,32	0,14	0,30
Insulina (μ U/ml)	100	15	7	6	< 5
Glucagon (pg/ml)	80	100	150	120	500
Insulina/glucagon	1,25	0,15	0,05	0,05	< 0,01
Bicarbonato	25	25	16		5

A concentração intramitocondrial aumentada de NADH exerce efeito inibitório sobre o ciclo de Krebs, especialmente através da inibição alostérica da isocitrato desidrogenase e do complexo α -cetoglutarato desidrogenase. A consequência imediata destas inibições é o *acúmulo de citrato*, que continua a ser produzido pela citrato sintase, mas não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs. Transportado para o citossol, o citrato estimula a acetil-CoA carboxilase, que é também ativada e induzida por influência da insulina. Esta enzima transforma a acetil-CoA citossólica, produzida pela citrato liase (igualmente induzida por insulina) a partir de citrato, em malonil-CoA. Malonil-CoA, além de ser substrato da síntese de ácidos graxos (precursores de triacilgliceróis), inibe alostericamente a carnitina-acil transferase I, impedindo que os ácidos graxos recém-sintetizados sejam degradados.

A síntese de ácidos graxos faz cair a relação NADPH/NADP⁺ citoplasmática, desinibindo as desidrogenases da via das pentoses-fosfato. Além de ser produzido pela via das pentoses-fosfato, o NADPH também é formado na conversão de malato (originado do oxaloacetato citossólico) a piruvato, catalisada pela enzima málica, cuja concentração está aumentada por insulina. A atividade da via das pentoses-fosfato é ainda mais favorecida pela indução da síntese de glicose 6-fosfato desidrogenase por insulina e pela elevação da concentração de glicose 6-fosfato que não pode ser metabolizada pela glicólise, que encontra-se inibida.

Realmente, as altas concentrações de ATP e de citrato inibem a fosfofrutoquinase 1. A atividade desta enzima está ainda mais prejudicada pela falta de frutose 2,6-bisfosfato, seu principal efetador alostérico positivo, devido à inibição da fosfofrutoquinase 2 por citrato. A piruvato quinase também está inibida por ATP.

Estabelece-se, portanto, um equilíbrio dinâmico, em que a produção de NADPH, acetil-CoA extramitocondrial e ATP é contrabalançada pelo consumo destes compostos na síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis. Essa situação é mantida enquanto prevalecerem as condições que a determinaram: grande oferta de nutrientes, glicose em particular, acarretando liberação de insulina e níveis altos de ATP. Enquanto durar este equilíbrio, haverá, portanto, produção de ácidos graxos e triacilgliceróis.

A insulina favorece a entrada de aminoácidos nos tecidos e a síntese de proteínas, de modo que apenas os aminoácidos excedentes estarão sendo oxidados e transformados em intermediários do ciclo de Krebs.

Os produtos das sínteses hepáticas, com exceção do glicogênio, são destinados à exportação. Por exemplo, os ácidos graxos, triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol e apoproteínas formam as lipoproteínas, que são secretadas na circulação.

A insulina promove ainda a utilização de glicose pelos tecidos periféricos. No músculo, a glicose é polimerizada a glicogênio, devido à desfosforilação e ativação da glicogênio sintase, induzida pela queda do nível de cAMP e pela própria insulina. No tecido adiposo, a glicose é utilizada para a síntese de ácidos graxos (a regulação é semelhante à dos hepatócitos) e para formar glicerol 3-fosfato, utilizado na esterificação dos ácidos graxos. Estes são também liberados das lipoproteínas plasmáticas por ação da lipase lipoproteica, cuja concentração está aumentada por ação da insulina.

A lipase do tecido adiposo está desfosforilada pelo nível baixo de cAMP, e, portanto, os ácidos graxos produzidos no próprio adipócito, no fígado e os provenientes da dieta podem ser depositados como triacilgliceróis.

21.2 PERÍODO PÓS-ABSORTIVO

No período pós-absortivo prevalecem os efeitos desencadeados pelo AMP cíclico

A intensa remoção da glicose circulante pelos tecidos, permitida pela alta relação insulina/glucagon do período absorptivo, reduz gradativamente a glicemia, até serem atingidos os valores basais — 80 mg/100 ml ou 4,4 mM — cerca de 3 a 4 horas após uma refeição. Inicia-se, assim, um outro período, chamado *pós-absortivo*, durante o qual a glicemia será mantida principalmente pela degradação do glicogênio hepático, com uma contribuição crescente da gliconeogênese. Este período terá uma duração aproximada de 12 horas; além deste tempo, a contribuição da gliconeogênese suplanta a da glicogenólise para a manutenção da glicemia.

Durante o período pós-absortivo, o decréscimo da concentração de glicose é acompanhado por uma *diminuição da relação insulina/glucagon*, com duas consequências diretas: restrição do consumo de glicose apenas aos tecidos insulino-independentes e estímulo da adenilato ciclase das células-alvo. O sentido das vias metabólicas é alterado, pois desaparecem as ativações induzidas pela insulina e passam a prevalecer os efeitos desencadeados por glucagon e cAMP. Até nova ingestão de alimentos, inverte-se o sentido do metabolismo, que passa a ser preponderantemente oxidativo.

No fígado, inicia-se a degradação de glicogênio como consequência da estimulação do sistema adenilato ciclase por glucagon, resultando na produção de glicose 6-fosfato. Entretanto, quantidades cada vez menores de glicose 6-fosfato são degradadas pela via glicolítica, em virtude da desativação da fosfofrutoquinase 1, devido à queda do nível de frutose 2,6-bisfosfato. A outra via de utilização da glicose 6-fosfato, a via das pentoses-fosfato, também tem sua atividade reduzida, por inibição de suas desidrogenases por NADPH. De fato, a relação citossólica NADPH/NADP⁺ eleva-se, pois a síntese de ácidos graxos está restringida pela escassez de substratos e por inibição da acetil-CoA carboxilase. Portanto, das vias de utilização de glicose 6-fosfato, somente sua conversão a glicose é possível. A glicose, liberada pelo hepatócito, mantém a glicemia (Fig. 21.2).

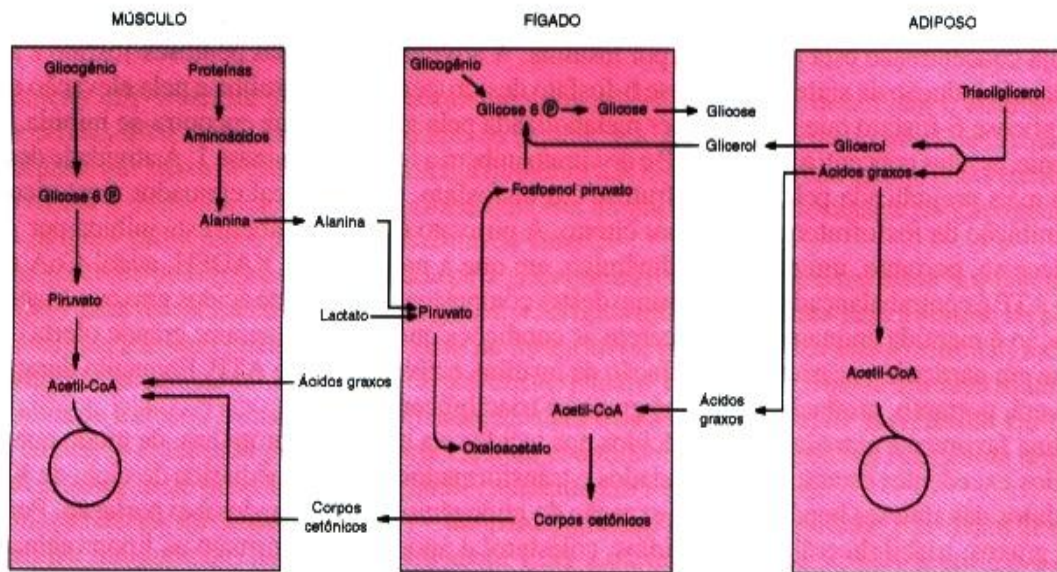


Fig. 21.2 Jejum: esquema das principais adaptações metabólicas induzidas pela baixa relação insulina/glucagon. A manutenção dos processos vitais é possibilitada pela gliconeogênese e cetogênese hepáticas e pela lipólise no tecido adiposo. Os ácidos graxos são transportados ligados à albumina plasmática.

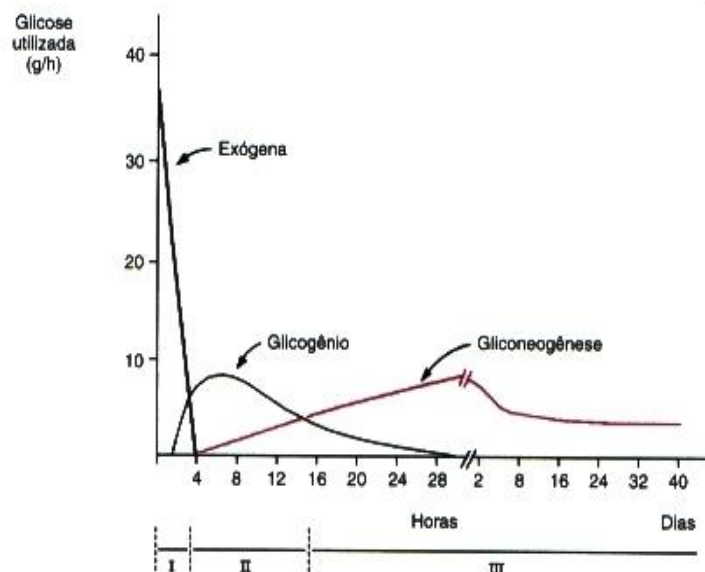


Fig. 21.3 Origem da glicose utilizada ao longo do tempo, após a ingestão de 100 g de glicose (tempo zero). I. período absorptivo; II. período pós-absortivo; III. jejum. Notar que, após 16 horas, a gliconeogênese já contribui com 50% do total da glicose utilizada.

A reserva hepática de glicogênio é, entretanto, insuficiente para a manutenção da glicemia normal por tempos longos. Está praticamente esgotada após 24 horas de jejum e, mesmo em tempos menores, como durante o jejum noturno, a sua importância vai sendo substituída pela crescente produção de glicose pela gliconeogênese. De fato, após 16 horas de jejum, a gliconeogênese já é responsável por 50% da glicose circulante (Fig. 21.3).

21.3 JEJUM

No jejum, intensificam-se os processos degradativos

No jejum, o glucagon atua sem o antagonismo da insulina e coadjuvado pelo cortisol, adaptando o organismo a sobreviver sem a ingestão de nutrientes.

Se o jejum prolongar-se além de 24 horas, a gliconeogênese será a única via capaz de manter a glicemia. Nesta situação, aumenta a contribuição percentual da gliconeogênese feita pelo córtex renal. O substrato da gliconeogênese é, principalmente, alanina, proveniente dos músculos esqueléticos. De fato, as proteínas musculares sofrem um *turnover* contínuo, mas, no jejum, sua síntese está prejudicada, pois há níveis baixos de insulina e sua degradação está estimulada por cortisol. O resultado líquido da descompensação entre síntese e degradação é o aumento da concentração de aminoácidos livres nas fibras musculares. Nestas células, duas enzimas do metabolismo de aminoácidos são muito ativas: a transaminase específica para os aminoácidos ramificados (Ile, Leu e Val) e a alanina aminotransferase. A atuação das duas enzimas resulta na transferência do grupo amino dos aminoácidos ramificados para piruvato; a alanina assim produzida é liberada pelo músculo e captada pelo fígado.

No hepatócito, a gliconeogênese está estimulada: a proteína quinase dependente de cAMP fosforila a fosfofrutoquinase 2 e a frutose 2,6-bisfosfatase, inativando a primeira e ativando a segunda; caem, conseqüentemente, os níveis de frutose 2,6-bisfosfato, o principal ativador da fosfofrutoquinase 1 e inibidor da frutose 1,6-bisfosfatase. À medida que aumenta a duração do jejum, a gliconeogênese torna-se mais intensa, devido à regulação alostérica favorável e ao aumento da concentração das enzimas gliconeogênicas, induzido por glucagon e cortisol.

A utilização dos esqueletos de carbono dos aminoácidos para a produção de glicose é acompanhada da excreção de seu grupo amino como uréia. Como a excreção de nitrogênio não é acompanhada de ingestão, estabelece-se um *balanço nitrogenado negativo*.

A estimulação da lipase do tecido adiposo por cAMP promove a mobilização de ácidos graxos das reservas lipídicas, usados como fonte de energia por músculos, fígado e outros tecidos (Quadro 14.1). A degradação de ácidos graxos, não acompanhada de degradação proporcional de carboidratos, leva ao acúmulo de acetil-CoA no fígado: a deficiência de oxaloacetato, continuamente retirado pela gliconeogênese, impede a oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs. A acetil-CoA acumulada condensa-se, formando os *corpos cetônicos*. Nesta situação, o fígado obtém energia da oxidação de ácidos graxos a acetil-CoA; os tecidos muscular e adiposo, não engajados na gliconeogênese, dispõem de oxaloacetato suficiente para oxidar ácidos graxos e corpos cetônicos a CO₂ e H₂O. O consumo de ácidos graxos e corpos cetônicos por estes tecidos coopera para a economia de glicose, que passa a ser utilizada praticamente apenas pelo cérebro e hemácias.

Se o jejum prolongar-se por algumas semanas, estes processos são, naturalmente, intensificados. Instala-se uma situação permanente de relação insulina/glucagon muito baixa, que determina um metabolismo eminentemente degradativo.

A maior parte da reserva energética do organismo está sob a forma de triacilgliceróis (Quadro 21.2). Os ácidos graxos não podem originar glicose, e o glicerol presente nesta reserva, embora seja gliconeogênico, contribui com uma parcela pouco significativa para o total de glicose necessário à manutenção da glicemia. A grande fonte potencial de glicose são os aminoácidos. Um indivíduo adulto tem na sua massa muscular cerca de 6 kg de proteína e não pode perder mais de 50% deste total sem risco de vida. Como cerca de 200 g de proteína devem ser degradados para produzir os 120 g diários de glicose consumidos pelo cérebro, o conteúdo proteico proveria glicose por 2 semanas apenas. No entanto, indivíduos chegam a sobreviver a 1-2 meses de jejum. Uma adaptação decisiva para permitir esta longa sobrevivência é o desenvolvimento, pelo cérebro, da capacidade de oxidar corpos cetônicos, além de glicose. De fato, depois de 5 a 6 semanas

de jejum, os corpos cetônicos perfazem quase 60% do suprimento energético do cérebro. A utilização desta nova fonte permite grande economia de glicose e reduz, portanto, a espoliação proteica, aumentando a sobrevivência.

A enorme produção de corpos cetônicos pelo fígado ultrapassa muito sua captação pelos tecidos extra-hepáticos. Como estes compostos têm caráter ácido, o poder tamponante do plasma é sobrepujado e instala-se uma acidose, com significativa redução do nível de bicarbonato plasmático (Quadro 21.3).

21.4 DIABETES

No diabetes, o organismo comporta-se como no jejum

Um quadro metabólico muito semelhante ao descrito para o jejum prolongado é encontrado nos casos de diabetes insulino-dependente (tipo I) não tratado. A deficiência na produção de insulina impede o aproveitamento de glicose pelos tecidos insulino-dependentes, levando a uma hiperglicemia. Fica, então, imposta ao organismo uma relação insulina/glucagon permanentemente baixa, mimetizando uma situação de carência nutricional, apesar dos altos níveis plasmáticos de glicose (Quadro 21.3). Desta forma, prevalece o metabolismo degradativo: gliconeogênese acentuada, levando a intensa proteólise; lipólise acelerada, com alta produção de corpos cetônicos e balanço nitrogenado negativo. Além disso, os níveis glicêmicos altos mantêm as células em hiperosmolaridade e acarretam uma sobrecarga renal. A eliminação urinária elevada de glicose é acompanhada da perda de grandes volumes líquidos, levando à depleção de eletrólitos. Este quadro pode ser revertido com a administração do hormônio deficitário. Todavia, injeções periódicas de insulina não são capazes de reproduzir o controle extremamente sofisticado do metabolismo, resultando em uma expectativa de vida reduzida, devido à instalação de processos degenerativos; muitas destas complicações parecem estar associadas à glicosilação de proteínas, acelerada pela alta concentração de glicose circulante. Atualmente, existem novos sistemas de administração contínua de insulina que respondem com precisão a variações da glicemia; uma outra abordagem em estudo é o transplante de células pancreáticas normais.

ADAPTAÇÕES METABÓLICAS AO EXERCÍCIO

Nos vertebrados, há três tipos de músculos: esquelético, cardíaco e liso. Os músculos esqueléticos sofrem contração voluntária, ou seja, desencadeada por impulsos nervosos motores, ao passo que os músculos lisos e cardíaco sofrem contração involuntária. De um modo geral, o mecanismo de contração e a organização estrutural dos músculos esqueléticos e do miocárdio são semelhantes; ambos têm aspecto estriado quando observados ao microscópio óptico. Os músculos lisos são assim chamados por não apresentarem o padrão estriado observado nos outros dois tipos de músculos; distinguem-se, também, por contraírem-se relativamente devagar, mas manterem a tensão por períodos mais longos que os músculos estriados. São encontrados, por exemplo, nas paredes do estômago, útero, intestino e dos vasos sanguíneos. Em um homem adulto, 40% da massa corpórea (cerca de 30 kg) são constituídos por músculos esqueléticos, que serão descritos a seguir.

22.1 ESTRUTURA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Os músculos esqueléticos são formados por feixes paralelos (fascículos musculares) de numerosas células muito longas, as *fibras musculares*, cuja membrana plasmática é chamada *sarcolema* (*sarkos*, em grego, significa carne). O citoplasma (*sarcoplasma*) destas células contém centenas de filamentos contráteis organizados em paralelo, as *miofibrilas*. As miofibrilas são constituídas por dois tipos de filamentos proteicos, *filamentos grossos* e *filamentos finos*, e sua disposição resulta no padrão de bandas de diferentes refingências, que conferem uma aparência estriada à fibra muscular observada ao microscópio óptico. Ao microscópio eletrônico, é possível observar zonas claras (*bandas I*) e escuras (*bandas A*) alternadas. A unidade funcional é o *sarcômero*, região compreendida entre duas *linhas Z* que, por sua vez, aparecem na região média da banda I (Fig. 22.1). Durante a contração, o comprimento do sarcômero diminui de até 50%, como resultado do deslizamento dos filamentos finos entre os grossos.

22.1.1 FILAMENTOS GROSSOS: MIOSINA

Os filamentos grossos são constituídos por *miosina*, uma proteína cujas cadeias polipeptídicas organizam-se em uma porção fibrosa — a *cauda da miosina* e duas porções globulares iguais — as *cabeças da miosina* (Fig. 22.2). A cauda é um longo bastão em dupla hélice, resultante da associação de duas α -hélices, que se enrolam uma sobre a outra (ver Fig. 22.5). Em uma das extremidades desse bastão, as hélices dobram-se separadamente, formando as cabeças da miosina. As cabeças da miosina apresentam atividade ATPásica e contêm o sítio de ligação aos filamentos finos.

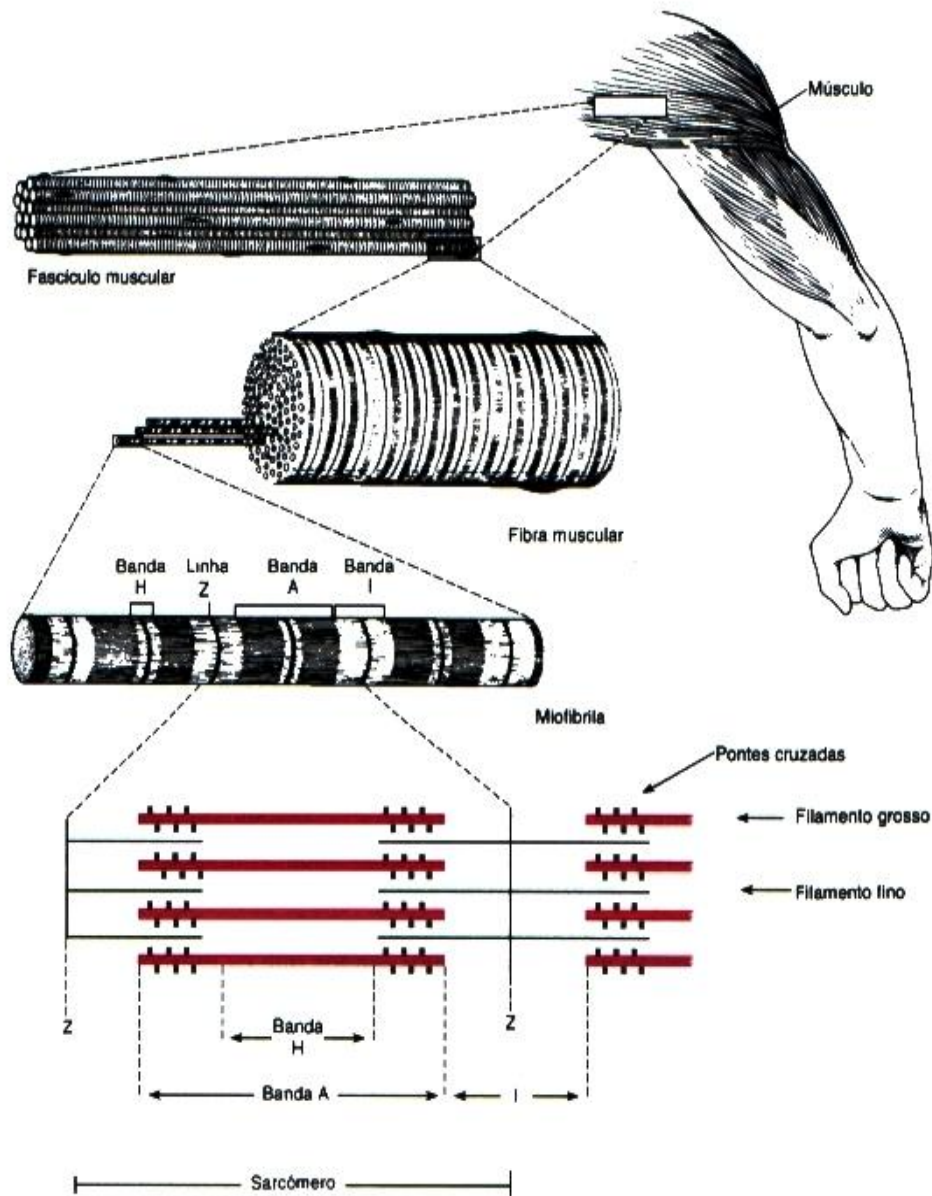


Fig. 22.1 Diagrama ilustrando a estrutura do sarcômero e a relação desta unidade com a miofibrila, a fibra muscular e o músculo. (Reproduzida com permissão de Junqueira & Carneiro. *Histologia Básica*, 5.^a edição, Guanabara Koogan.)

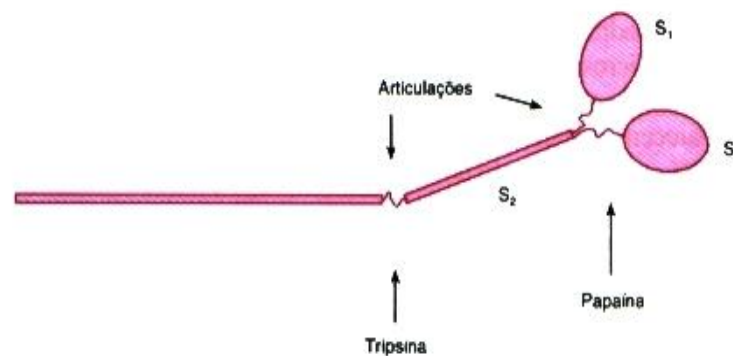


Fig. 22.2 Esquema da miosina, mostrando os pontos de articulação da molécula, que coincidem com sítios de hidrólise por enzimas proteolíticas (tripsina e papaína). As porções globulares (S₁) têm atividade ATPásica e ligam-se aos filamentos finos durante a contração.

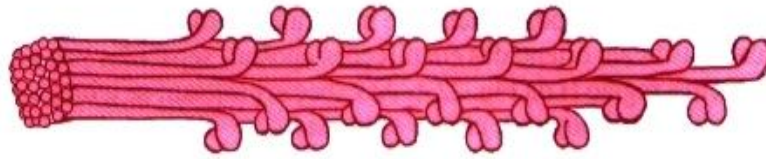


Fig. 22.3 Esquema mostrando a posição relativa de moléculas de miosina compondo parte de um filamento grosso (a extremidade do lado direito, na banda A da Fig. 22.1).

A molécula de miosina apresenta dois pontos de articulação: um deles situado entre a cabeça e a cauda, e o outro, na cauda. Estes são também pontos vulneráveis ao ataque por enzimas proteolíticas, que fragmentam a molécula em duas porções globulares — as cabeças da miosina, também chamadas de S_1 (de *subfragmento 1*) — e duas porções em bastão. Os pontos de articulação são funcionalmente importantes, pois permitem mudanças de orientação da molécula de miosina em relação ao filamento fino, durante o ciclo de contração.

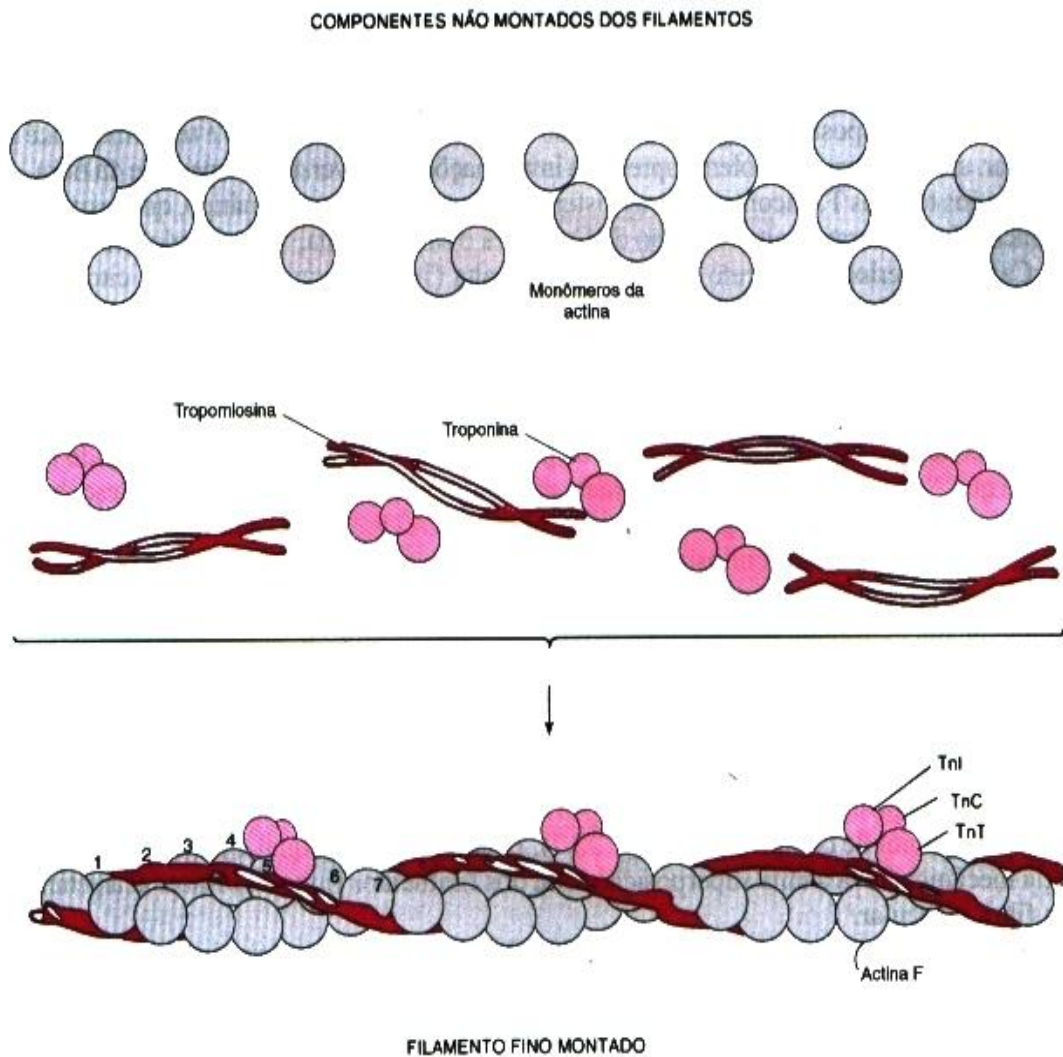


Fig. 22.4 Estrutura do filamento fino. O diagrama mostra os componentes isolados e depois de organizados, formando parte do filamento.

Os filamentos grossos são formados por centenas de moléculas de miosina, associadas cauda a cauda (Fig. 22.3). Deste modo, as cabeças ficam orientadas em direções opostas, separadas pelos longos segmentos lineares (caudas) que constituem a região H da Fig. 22.1. As cabeças projetam-se a intervalos regulares, podendo ligar-se aos filamentos finos, constituindo as *pontes cruzadas*.

22.1.2 FILAMENTOS FINOS: ACTINA, TROPOMIOSINA E TROPONINA

A principal proteína do filamento fino (Fig. 22.4) é a *actina*, que pode existir na forma globular ou fibrosa, dependendo da força iônica do meio. Nas condições celulares, os monômeros globulares de actina (actina G) polimerizam-se formando uma fita helicoidal com aspecto de um colar de contas aberto (actina F). Cada filamento fino contém duas destas fitas enroladas em dupla hélice. Ao longo do sulco destas duas hélices, situam-se as tropomiosinas. A molécula de *tropomiosina* é formada por duas cadeias enroladas em α -hélice, cobrindo sete actinas. A ligação de várias moléculas de tropomiosina pelas extremidades origina um filamento que se estende por toda a superfície da fita de actina F. A intervalos regulares, ligada à tropomiosina, encontra-se *troponina*, uma proteína composta de três subunidades: *TnC*, capaz de ligar-se a Ca^{2+} ; *TnI*, que se liga à actina; e *TnT*, ligada à tropomiosina.

22.2 MECANISMO DA CONTRAÇÃO MUSCULAR

Ca^{2+} é o intermediário entre o impulso nervoso e a contração muscular

A contração muscular é desencadeada por uma onda de despolarização que se propaga pela membrana das fibras musculares em resposta à chegada do impulso nervoso. A despolarização é transmitida até o interior da fibra muscular, uma vez que o sarcolema apresenta invaginações transversais à superfície da fibra — os *túbulos T*. Justapostas aos túbulos T, encontram-se as cisternas do retículo sarcoplasmático, que respondem à mudança do potencial de membrana com liberação de Ca^{2+} para o sarcoplasma. No músculo em repouso, a concentração de Ca^{2+} no interior do retículo é mantida muito alta (10^{-3} M) em relação à do citoplasma (10^{-7} M), graças à ação de uma bomba de cálcio movida a ATP (Ca^{2+} -ATPase) presente na membrana do retículo. A chegada do impulso nervoso torna a membrana do retículo permeável ao cálcio, e o vazamento deste íon para o citoplasma eleva a sua concentração até 10^{-5} M.

A liberação de Ca^{2+} no sarcoplasma inicia a contração, que ocorre por encurtamento do sarcômero devido ao deslizamento dos filamentos finos entre os grossos. O Ca^{2+} liga-se a TnC, alterando a conformação da troponina que “empurra” a tropomiosina mais para o interior do sulco da actina F, descobrindo assim os sítios das actinas aos quais as cabeças de miosina, contendo ATP em seu centro ativo, são capazes de ligarem-se (Fig. 22.5). A ligação da miosina à actina estimula a atividade ATPásica das cabeças da miosina, com produção de ADP e P_i (a denominação inglesa para actina, *actin*, deriva de “activate”). A hidrólise de ATP, acompanhada pela saída de ADP e P_i , determina uma alteração no ângulo de ligação das cabeças de miosina à actina e provê energia para que as cabeças empurrem o filamento fino: o movimento das cabeças de miosina é semelhante ao de um remo, empurrando o filamento fino (Fig. 22.6). Uma nova molécula de ATP liga-se a S_1 , provocando a separação entre miosina e actina, começando um novo ciclo de contração. Enquanto isso ocorre, estão sendo formadas pontes cruzadas em outros locais, impedindo que o filamento de actina volte à sua posição original. Assim, os filamentos finos são deslocados em direção ao centro do sarcômero que diminui de comprimento (Fig. 22.7). Este processo, no qual a energia química é convertida em energia mecânica, leva a uma superposição total dos filamentos finos e grossos, acarretando o encurtamento da fibra muscular.

Cessada a excitação nervosa, os íons cálcio são bombeados para dentro do retículo, restabelecendo as concentrações características do estado de repouso. A troponina C, agora sem cálcio, não desloca mais a tropomiosina, que passa a impedir novas ligações de cabeças de miosina à actina; as cabeças de miosina, contendo ATP no centro ativo, desligam-se da actina: instala-se o relaxamento do músculo. Quando a concentração de ATP no sarcoplasma é limitante, a Ca^{2+} -ATPase não pode atuar e não há ATP disponível para ligar-se a S_1 : o complexo actina-miosina não se desfaz e permanece o estado de contratura. É o que acontece no *rigor mortis*, a rigidez dos músculos verificada após a morte.

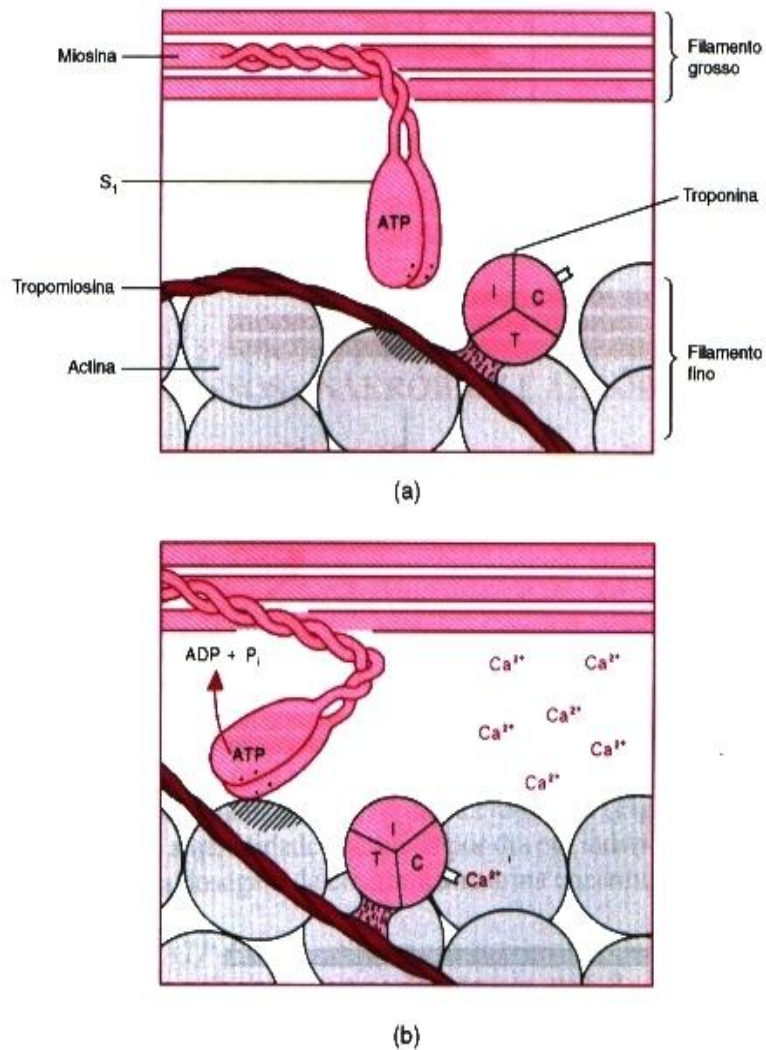


Fig. 22.5 Posição relativa dos componentes dos filamentos grossos e finos: a) no músculo em repouso; b) ao iniciar-se a contração. Esta é desencadeada pela ligação de Ca²⁺ à subunidade TnC da troponina: a tropomiosina desloca-se, S₁ liga-se à actina, ATP é hidrolisado e as cabeças da miosina empurram o filamento fino. C, I e T: subunidades TnC, TnI e TnT da troponina. (Reproduzida com permissão de Junqueira & Carneiro. Histologia Básica, 5.ª edição, Guanabara Koogan.)

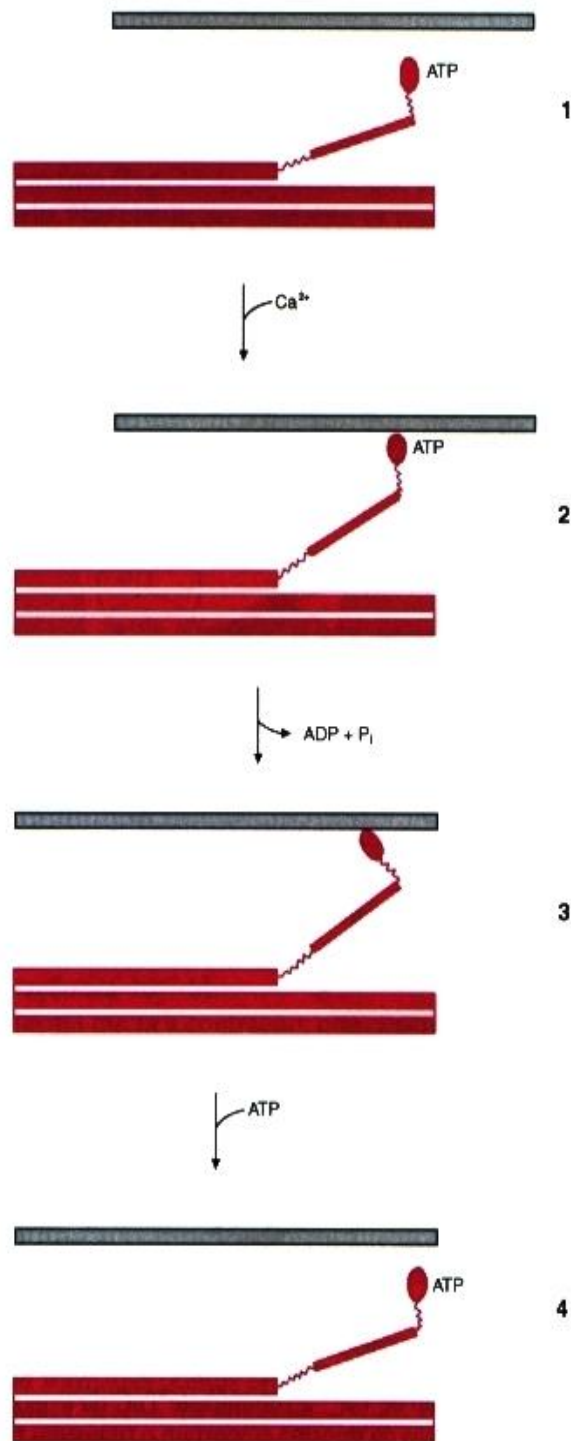


Fig. 22.6 Diagrama mostrando o deslizamento do filamento fino em relação ao filamento grosso durante a contração muscular. (1) Músculo relaxado, ATP posicionado no sítio ativo de S_1 , que está dissociado do filamento fino. (2) O aumento da concentração de Ca^{2+} no sarcoplasma resulta em ligação de S_1 ao filamento fino. (3) A hidrólise de ATP e liberação de ADP e P_i determinam mudança no ângulo de contato de S_1 com o filamento fino, que é empurrado em direção ao centro do sarcômero (à esquerda no esquema). (4) Nova ligação de ATP à cabeça da miosina recompõe os componentes em situação de iniciar um novo ciclo, no qual S_1 fará contato com o filamento fino em um ponto diferente daquele do ciclo anterior, mais à direita do diagrama.

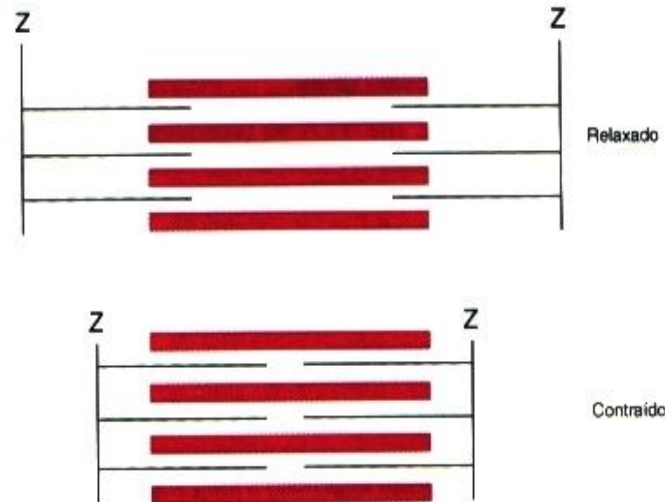


Fig. 22.7 Deslizamento dos filamentos finos entre os filamentos grossos durante a contração, levando ao encurtamento do sarcômero. Esta movimentação é resultante da repetição do ciclo de eventos mostrado nas Figs. 22.5 e 22.6.

22.3 FONTES DE ENERGIA PARA O TRABALHO MUSCULAR: PROCESSOS ANAERÓBIOS E AERÓBIOS

A concentração de ATP nos músculos estriados só é capaz de fornecer energia para 1-2 segundos de atividade muscular intensa. Um reservatório adicional de energia é constituído por *fosfocreatina (FC)*, presente em concentrações 3-5 vezes maiores do que as de ATP. A fosfocreatina é produzida nos períodos de repouso, por fosforilação da creatina à custa de ATP:



A reação é prontamente reversível e, durante a atividade muscular, processa-se no sentido da regeneração de ATP, o doador imediato de energia para a contração.

A fosfocreatina, lenta e espontaneamente, é convertida a *creatinina* (Fig. 22.8), que é liberada na circulação e excretada pela urina. Como a quantidade excretada por dia em indivíduos normais é constante (por ser proporcional à massa muscular), a dosagem de creatinina na urina constitui um indicador sensível da função renal.

ATP e fosfocreatina (*sistema ATP-FC*) constituem um suprimento imediato de energia para o trabalho muscular, suficiente para esforços máximos e pouco duradouros, de 6-8 segundos. Sua utilização é um processo estritamente anaeróbio, fornecendo a maior parte da energia para o desempenho de atividades como: corrida de 100 m rasos, natação por 25 m, levantamento de pesos, saque no tênis, salto em altura, chute no futebol etc.

A continuidade do trabalho muscular exigirá energia derivada de outras fontes. O próximo suprimento é o glicogênio muscular, cuja degradação é estimulada pela mesma liberação de Ca^{2+} que desencadeia a contração (ver adiante, nesta seção) ou por adrenalina, que tem seus níveis aumentados durante o exercício. A degradação do glicogênio é inicialmente anaeróbia, já que a reserva muscular de oxigênio (associado à mioglobina) é pequena e a oferta de oxigênio pela circulação não aumenta de forma imediata e proporcional à demanda muscular de ATP. De fato, quando o músculo passa do repouso para o exercício intenso, o consumo de oxigênio aumenta cerca de 25 vezes, enquanto a quantidade de ATP hidrolisado chega a ser 120 vezes maior. Nenhum outro tecido apresenta variações tão grandes e abruptas no gasto de ATP. Deve-se ressaltar que carboidratos são os únicos substratos que podem ser oxidados anaerobiamente.

A degradação anaeróbia da glicose, originada do glicogênio, leva à produção de lactato (e H^+), que atinge o valor máximo 40-50 segundos após o início de esforço muscular máximo. A *glicólise anaeróbia*, que tem

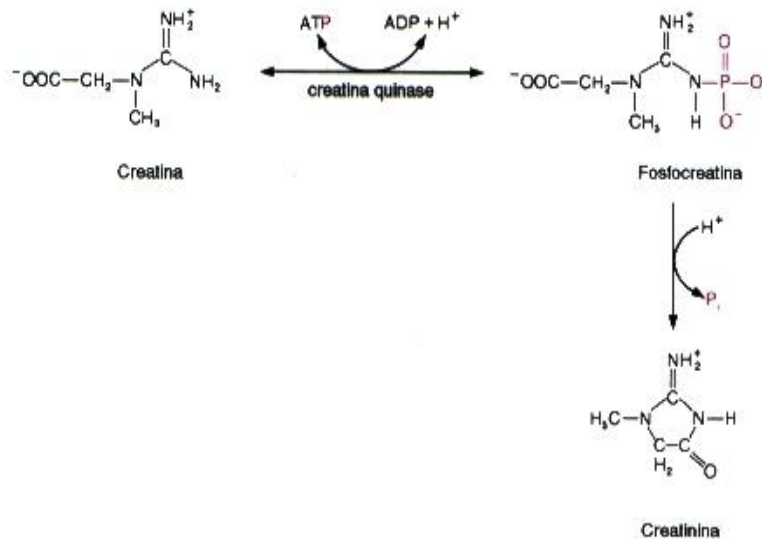


Fig. 22.8 A fosfocreatina resulta da transferência de um grupo fosfato do ATP para a creatina (a creatina é sintetizada a partir de arginina, glicina e S-adenosilmetionina). Durante a contração, a reação processa-se no sentido oposto. A fosfocreatina decompõe-se em creatinina, que não pode ser reaproveitada, sendo excretada na urina.

baixo rendimento em ATP, consome rapidamente o glicogênio muscular e é utilizada para exercícios intensos com duração de 1-2 minutos. É a fonte principal de energia para corridas de 200, 400 ou 1.000 m rasos, natação de 100-200 m, futebol etc.

À medida que os sistemas respiratório e circulatório são ativados, a contribuição da glicólise anaeróbia para o fornecimento de energia para a contração vai sendo substituída pela oxidação aeróbia, completa, da glicose. Paralelamente, o fornecimento de ácidos graxos para o sistema muscular aumenta, em virtude da ação da adrenalina sobre o tecido adiposo. A oxidação dos ácidos graxos assume importância crescente, à medida que a reserva de glicogênio diminui. Após 3 minutos de exercício vigoroso, o trabalho muscular é feito principalmente à custa de ATP obtido por *oxidação aeróbia* dos substratos disponíveis (Fig. 22.9). Incluem-se, aqui, as corridas de 1.500 m ou mais, ciclismo, esqui, maratonas etc.

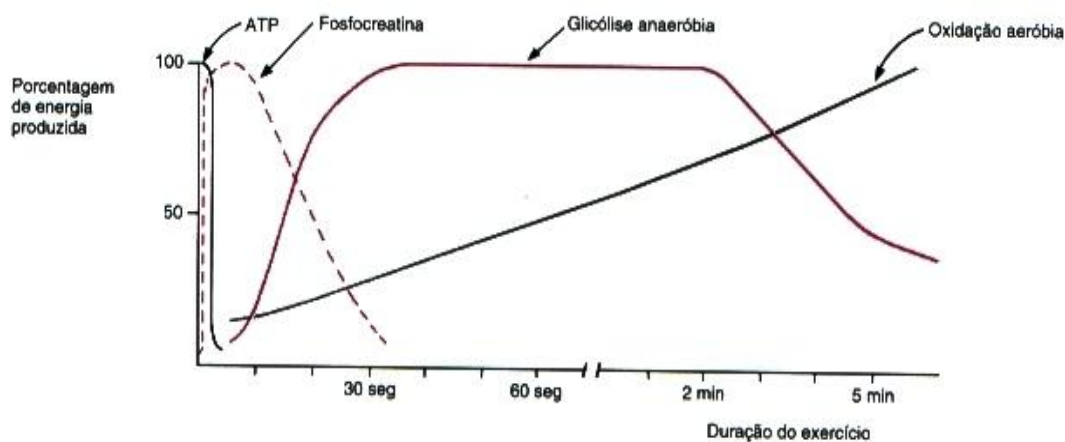


Fig. 22.9 Fontes de energia para o trabalho muscular. O gráfico mostra a contribuição de cada sistema gerador de energia (expressa em porcentagem da sua capacidade máxima) durante exercícios extenuantes. A curva de glicólise anaeróbia refere-se à oxidação de glicose (proveniente da degradação do glicogênio) a lactato. A curva de oxidação aeróbia refere-se à oxidação total da glicose e ácidos graxos.

Os processos geradores de ATP têm velocidades diferentes

Como a quantidade de ATP disponível nos músculos é pequena, o desempenho físico depende da velocidade dos diferentes processos de obtenção de ATP nas fibras musculares. O processo mais rápido é a fosforilação de ADP pela fosfocreatina (Quadro 22.1); todavia, a quantidade de ATP obtido assim é limitada pela concentração também pequena de fosfocreatina. A glicólise anaeróbia, apesar de apresentar baixo rendimento, produz ATP com velocidade maior do que as vias aeróbias. A síntese de ATP pela fosforilação oxidativa é mais lenta, especialmente quando decorrente da oxidação de ácidos graxos; por outro lado, o depósito de triacilgliceróis constitui a maior reserva energética do organismo (ver Quadro 21.2).

Quadro 22.1 Fontes de energia para a contração muscular

Fontes de ATP	Velocidade máxima de produção de ATP (mmol · s ⁻¹)
ATP	—
Fosfocreatina	73,3
Glicogênio muscular a lactato: glicólise anaeróbia	39,1
Glicogênio muscular a CO ₂ e H ₂ O	16,7
Ácidos graxos (do adiposo) a CO ₂ e H ₂ O	6,7

A velocidade alcançada durante uma corrida (Quadro 22.2) é uma função direta do sistema gerador de energia — *ATP-FC, glicólise anaeróbia ou oxidação aeróbia* — acionado para sustentar a contração muscular. A corrida de 100 metros rasos — percorridos em 10 segundos por atletas de elite — utiliza ATP, fosfocreatina e glicólise anaeróbia a partir de glicogênio, ou seja, utiliza os processos anaeróbios, os mais velozes. Essas fontes são insuficientes para corridas mais longas, como a de 1.000 metros, e a fosforilação oxidativa é acionada, utilizando o glicogênio muscular, além de uma participação menor da oxidação de ácidos graxos; como a velocidade de produção de ATP dos processos aeróbios é menor, a velocidade da corrida também é menor. Em uma maratona, a contribuição da oxidação de ácidos graxos aumenta muito, resultando uma velocidade de corrida ainda menor. Neste tipo de exercício, a oxidação mais lenta do glicogênio e a intensa degradação de ácidos graxos compõem um efeito poupador de glicose, de modo a manter a glicemia em níveis próximos do normal até o final da maratona.

É importante ressaltar que os três sistemas geradores de energia são solicitados na maioria das atividades físicas e o que varia, conforme a intensidade e a duração do exercício, é a contribuição relativa de cada sistema para o total de energia necessária (Fig. 22.10). O fornecimento de energia é, portanto, um processo contínuo, em que uma das fontes é acionada antes que a anterior se esgote. Por exemplo, na corrida de 100 m rasos, a glicólise anaeróbia é ativada (aumento da produção de lactato e H⁺), antes de se esgotar o sistema ATP-FC, o que resulta em velocidade menor do que a inicial nos últimos segundos de corrida.

Quadro 22.2 Parâmetros característicos de tipos diferentes de corrida atlética

Distância percorrida (m)	Tempo gasto	Velocidade da corrida (m · s ⁻¹)
100	10 s	10,1
1.000	132 s	7,6
42.200	2 h	5,5

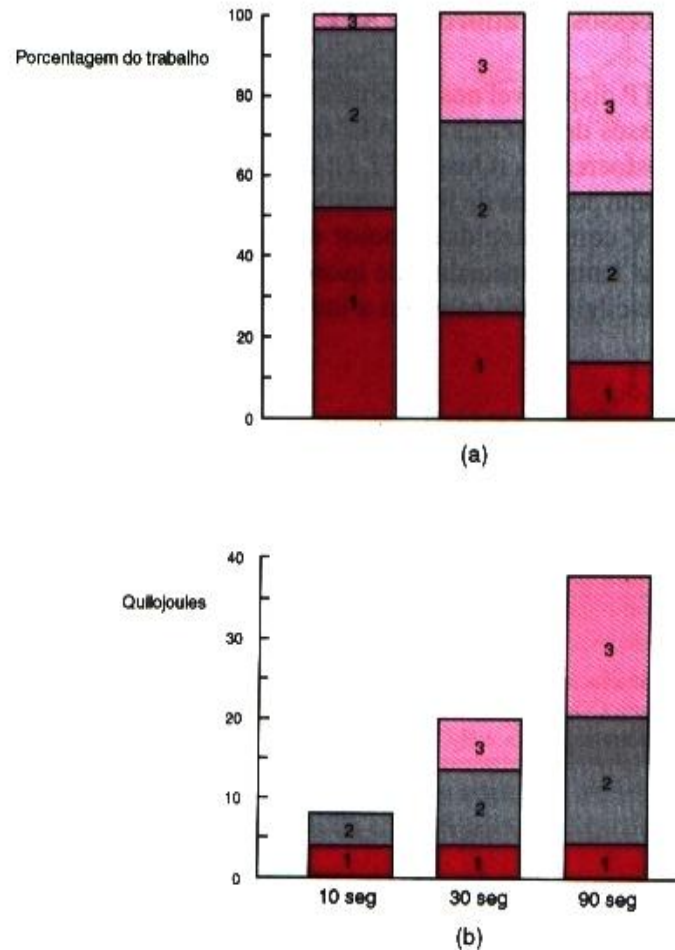


Fig. 22.10 Contribuição dos diferentes sistemas geradores de energia para a realização de exercícios extenuantes de curta duração (10, 30 e 90 segundos), expressa em porcentagem do trabalho físico desempenhado (a) e em energia (b). 1: Sistema ATP-FC; 2: Glicólise anaeróbia; 3: Oxidação aeróbia. (Reproduzida de McArdle, W. D., Katch, F. I. & Katch, V. L.: *Essentials of Exercise Physiology*, Lea & Febiger Publishers, 1994.)

Os íons Ca^{2+} induzem glicogenólise

Os íons Ca^{2+} , liberados em resposta a um estímulo nervoso, além de desencadear a contração muscular, estimulam a degradação de glicogênio e inibem a sua síntese. Estes íons ligam-se à subunidade δ da fosforilase quinase (p. 276), idêntica à calmodulina (p. 269). A fosforilase quinase torna-se ativa, desencadeando a glicogenólise, também induzida por adrenalina. No músculo em repouso, menos de 5% da glicogenólise são funcionais, mas, 0,7 segundo após o início da contração, o percentual de enzima ativa já atinge 50%. O resultado final consiste em um aumento da oferta de substrato para a glicólise e da produção de ATP para sustentar a contração muscular (Fig. 22.11).

A fadiga muscular ainda não é totalmente compreendida

A fadiga muscular é a incapacidade de manter a contração e instala-se após estimulação repetida de um grupo de músculos. Em exercícios extenuantes e de curta duração, a fadiga está fortemente associada à depleção do glicogênio estocado nos músculos ativados durante o exercício. Embora seja crença corrente que o lactato produzido é o responsável pela fadiga muscular, cãibra e sensação de dor após exercícios extremos, isto não é verdade. O lactato gerado na glicólise anaeróbia durante o exercício intenso é drenado dos músculos para a corrente sanguínea, sendo absorvido pelo fígado; a concentração plasmática de lactato volta ao nível basal

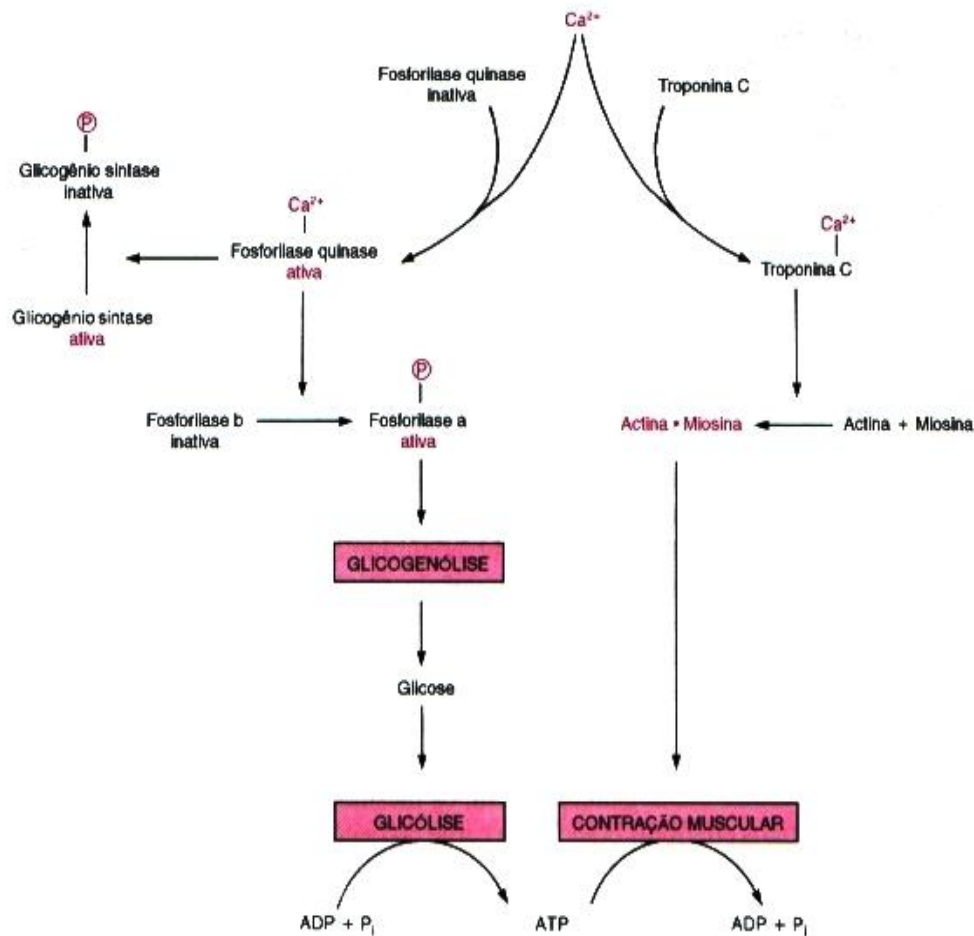


Fig. 22.11 Esquema da ação de Ca^{2+} sobre dois aspectos da contração: o mecânico, promovido pela hidrólise de ATP, e o fornecimento de glicose, de cuja oxidação resulta a produção de ATP.

muito antes que se instale a dor característica na musculatura exercitada em demasia. Acredita-se que a alteração da atividade muscular seja devida à liberação de H^+ , que acompanha a produção de lactato. Após uma corrida de 100 m, o pH arterial cai de 7,4 para 7,0. Após contração exaustiva, o pH de um músculo passa do valor de 7,4, no repouso, para 6,4. Ainda mais, se o músculo é perfundido com altas concentrações de lactato, mas o pH é mantido em 7,4, não ocorre fadiga. Diversas hipóteses têm sido aventadas para explicar os efeitos do aumento da concentração de prótons: inibição da fosfofrutoquinase 1, alteração da transferência de Ca^{2+} entre o sarcoplasma e o retículo, inibição da atividade ATPásica da miosina ou transmissão inadequada do impulso nervoso através dos túbulos T.

Um procedimento que visa tamponar os prótons produzidos durante o exercício é a ingestão prévia de bicarbonato de sódio. Esta prática parece funcionar para atividades como a corrida de 1.000 m, que duram um tempo suficientemente longo para que os H^+ sejam liberados dos músculos para o plasma; não traz nenhum benefício para a corrida de 100 m, porque os prótons produzidos permanecem nos músculos durante esta atividade; também não contribui para a corrida de longa distância, quando a maior parte da energia é obtida a partir do metabolismo aeróbio. Um dos problemas associados com a tomada de bicarbonato é a ocorrência de cólicas intestinais e diarreia.

A atividade física regular induz adaptações fisiológicas importantes

A atividade física sistemática, mas não a esporádica, produz uma série de ajustes favoráveis ao melhor desempenho físico. Primariamente, melhora a capacidade cardiorrespiratória, propiciando um fluxo sanguíneo mais eficiente. A vascularização muscular aumenta, permitindo a melhor captação de oxigênio pelas fibras

musculares. Nas hemácias, cresce a concentração de 2,3-bisfosfoglicerato, acarretando diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio e, portanto, facilitando a sua liberação. Há aumento da concentração das enzimas musculares responsáveis por vias degradativas, como as da β -oxidação e do ciclo de Krebs. Além disto, o depósito de glicogênio nos músculos também se torna maior. O conjunto destas adaptações provê mais oxigênio para a fibra muscular e maior capacidade de sua utilização na oxidação dos substratos. A contribuição do exercício regular para a redução do peso corpóreo foi analisada no Capítulo 18.

22.4 TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES

Os músculos esqueléticos são compostos por fibras lentas e rápidas, também conhecidas como fibras vermelhas ou brancas, respectivamente. As *fibras lentas* ou *vermelhas* devem sua cor a uma grande vascularização, alto conteúdo de mioglobina e de outras hemoproteínas (citocromos etc.), já que são especialmente ricas em mitocôndrias. As *fibras rápidas* ou *brancas* são mais claras por serem praticamente destituídas de mioglobina e conterem poucas mitocôndrias. Naturalmente, as fibras vermelhas são capazes de oxidar aerobiamente carboidratos e ácidos graxos, ao contrário das fibras brancas, que obtêm energia quase exclusivamente por glicólise anaeróbia, usando, então, apenas glicose e glicogênio. Como já foi discutido, a velocidade de produção de ATP por processos aeróbios é bem menor do que a velocidade das vias anaeróbias, e a reserva de substratos para a oxidação aeróbia, os ácidos graxos, é maior. Deste modo, as fibras vermelhas têm contração mais lenta e duradoura do que as brancas, que são de movimento mais brusco e mais potente.

Os músculos do vôo de aves migradoras, como patos e marrecos, que dependem de um suprimento contínuo e prolongado de energia, são constituídos principalmente por fibras vermelhas, que atribuem à carne do peito uma cor escura. Em aves terrestres, como galinha e peru, os mesmos músculos, utilizados apenas para movimentos de curta duração, são ricos em fibras brancas e a carne do peito é clara. Em contraposição, nos músculos das pernas destas aves a distribuição é oposta: as migradoras têm fibras brancas e as terrestres, fibras vermelhas.

Os músculos humanos são compostos por misturas de fibras brancas e vermelhas, com proporções definidas geneticamente. Embora o treinamento físico possa alterar parcialmente a distribuição de fibras vermelhas e brancas, a capacidade atlética máxima está determinada por hereditariedade: mesmo os músculos dos braços de um corredor olímpico de longa distância, apesar de menos treinados que os músculos das pernas, têm uma capacidade excepcionalmente grande de gerar ATP aerobiamente. A tipagem de fibras musculares tem sido um procedimento de rotina para o prognóstico do desempenho máximo possível e a indicação do tipo de esporte adequado para atletas de elite (Quadro 22.3).

As suplementações nutricionais não otimizam o desempenho físico

A ingestão aumentada de suplementos nutricionais (aminoácidos, carnitina etc.), ao contrário do que se imagina, *não* contribui significativamente para aprimorar o desempenho físico. Os fatores decisivos são patrimônio

Quadro 22.3 Distribuição de fibras rápidas (brancas) e lentas (vermelhas) em atletas de algumas modalidades esportivas

	Porcentagem de fibras do quadríceps ¹	
	Fibras rápidas	Fibras lentas
Maratonistas	18	82
Nadadores	26	74
Atletas de jogos esportivos ²	55	45
Halterofilistas	55	45
Corredores (curta distância)	63	37
Saltadores	63	37

¹O quadríceps localiza-se na porção anterior da coxa; ²Vôlei, basquete, handebol.

genético, treinamento e adequação psicológica. Mesmo para a prática de musculação — aumento da massa muscular determinado por exercício localizado — uma dieta balanceada, contendo 10-15% de proteína com valor alto de NPU, fornece a quantidade necessária de aminoácidos. Naturalmente, quando a atividade física é intensa e prolongada, torna-se necessário um aumento da ingestão calórica: por exemplo, um nadador adulto, que pratica 4-5 h por dia, chega a consumir 6.000 kcal/dia. As calorias adicionais devem ser provenientes de carboidratos e lipídios, obedecendo às mesmas proporções recomendadas para a população não-atlética (Capítulo 18). Outro fator a ser considerado no exercício prolongado é a perda de água e eletrólitos pela transpiração, que devem ser repostos adequadamente.

22.5 MÚSCULOS LISOS

Os músculos lisos consistem em células alongadas, contendo filamentos grossos e finos, que não se organizam em miofibrilas e cujos sarcômeros não ficam alinhados como nos músculos estriados e cardíaco. Os filamentos finos têm actina e tropomiosina, mas não contêm troponina. Ainda assim, sua contração é desencadeada por Ca^{2+} , neste caso, ligado à calmodulina. Os filamentos grossos contêm miosina, diferente da encontrada nos outros dois tipos de músculos.

Ca^{2+} e cAMP regulam a contração de músculos lisos

A miosina presente nos músculos lisos apresenta, em relação à miosina dos músculos estriados, atividade ATPásica cerca de 10 vezes menor, é mais diretamente regulada por Ca^{2+} e, adicionalmente, sofre modificação covalente.

A interação da miosina de músculos lisos com filamentos de actina, provocando contração, só ocorre quando suas cadeias menores, as chamadas cadeias leves, estão fosforiladas; quando estão desfosforiladas, a interação fica impedida e o músculo relaxa. A fosforilação é catalisada por uma *miosina quinase*, presente em quantidades relativamente grandes nos músculos lisos. Esta enzima é ativada por ligação com o complexo Ca^{2+} · calmodulina, do qual é estritamente dependente (Fig. 22.12).

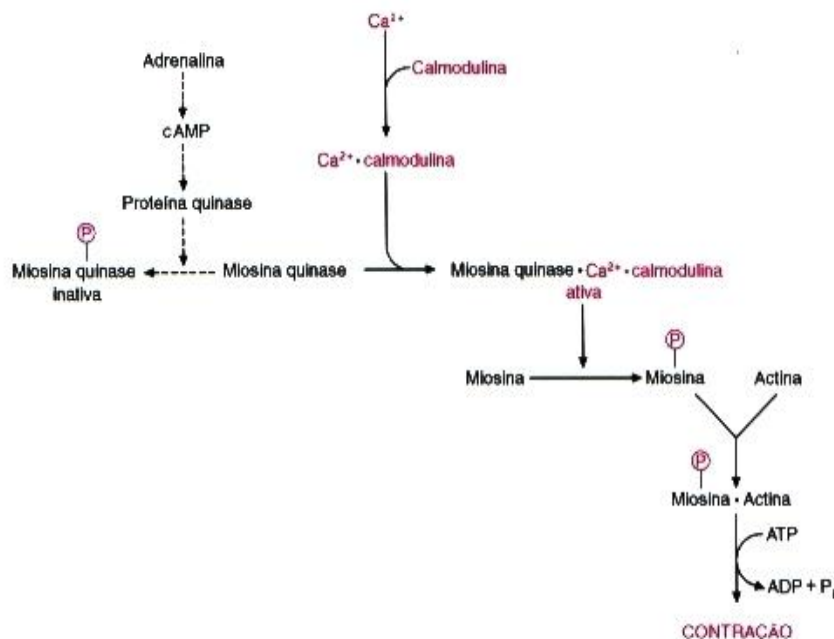


Fig. 22.12 A contração de músculos lisos é desencadeada por cálcio: a miosina quinase liga-se ao complexo Ca^{2+} · calmodulina e catalisa a fosforilação da miosina, que pode, então, interagir com a actina (setas cheias). A contração é inibida por adrenalina: a proteína quinase dependente de cAMP fosforila a miosina quinase, que passa a ter afinidade muito menor por Ca^{2+} · calmodulina e permanece inativa (setas tracejadas).

A contração do músculo liso é, portanto, desencadeada por Ca^{2+} , como acontece com o músculo esquelético — apenas o mecanismo de ação deste íon difere nos dois tipos de músculos. Em músculos esqueléticos e cardíaco, miosina quinase e calmodulina ocorrem em concentrações muito menores, e o Ca^{2+} determina a contração muscular através de ligação com a troponina C. A troponina C pode então ser considerada uma forma especializada de calmodulina, presente em músculos estriados, a qual, por já fazer parte dos filamentos finos, permite um estímulo mais rápido da contração.

A atividade da miosina quinase de músculos lisos é influenciada também pelo nível de cAMP, que, por sua vez, é determinado por estímulo hormonal. A adrenalina liga-se a receptores β presentes na musculatura lisa, induzindo estímulo da adenilato ciclase, aumento da concentração de cAMP e ativação da proteína quinase dependente de cAMP. Um dos substratos desta enzima é a miosina quinase, que, quando fosforilada, tem afinidade muito menor por Ca^{2+} ·calmodulina, permanecendo, portanto, inativa (Fig. 22.12). A fosforilação das cadeias leves da miosina é interrompida e, conseqüentemente, a contração, resultando o relaxamento dos músculos lisos.

A inativação da miosina quinase de músculos lisos, desencadeada por adrenalina via receptores β , tem ampla aplicação médica. Um exemplo é o tratamento de distúrbios respiratórios, como a *asma*, caracterizados por contração da musculatura lisa dos brônquios, levando à sua constrição e, portanto, à dispnéia. Este distúrbio é controlado pela administração de aerossóis contendo agonistas β -adrenérgicos, que, por determinarem o relaxamento da musculatura brônquica, atuam como agentes broncodilatadores. O relaxamento de músculos lisos também é o princípio farmacológico de derivados da nitroglicerina, utilizados como vasodilatadores coronarianos na terapia da *angina pectoris*.

OBJETIVOS PARA ESTUDO

Os objetivos que se seguem constituem um roteiro orientador, que temos utilizado há muito tempo como guia de estudo em nossos cursos. Estes cursos, que seguem uma metodologia participativa, da qual foram abolidas as aulas expositivas, beneficiaram-se muito da subdivisão do conteúdo a ser aprendido em itens, através dos quais os estudantes desenvolvem sua autonomia de aprendizagem. Os *Objetivos para Estudo* foram redigidos de modo a indicar com precisão o conteúdo a ser estudado. Em virtude da necessidade de rigor e clareza na especificação da tarefa a ser cumprida, é freqüente o emprego de termos como: *definir, caracterizar, descrever, esquematizar, indicar* etc. Os objetivos não devem ser utilizados como um questionário a ser respondido, mas como a espinha dorsal do conteúdo a ser estudado, servindo cada um deles como um núcleo, em torno do qual deve ser explorada uma área de conhecimento. Redigidos nesta forma, os objetivos educacionais não contemplam o desenvolvimento de habilidades cognitivas complexas. Este desenvolvimento, a nosso ver essencial na formação do estudante, é estimulado pela parte complementar aos Objetivos para Estudo, ou seja, os *Exercícios e Problemas*. Estes têm a finalidade de permitir a aplicação do conhecimento adquirido com os Objetivos para Estudo, expandindo sua área e provendo articulações entre os diferentes assuntos.

Por outro lado, acreditamos que estes itens possam ser úteis também para os professores que utilizam metodologias convencionais, auxiliando-os na organização de suas aulas.

SISTEMA-TAMPÃO

1. Definir ácido e base segundo Brönsted.
2. Caracterizar um sistema-tampão e indicar os fatores que determinam sua eficiência.
3. Definir pK_a e descrever os procedimentos experimentais para determinar o valor do pK_a do ácido acético.
4. Escrever a equação de Henderson-Hasselbalch e mostrar sua utilidade na análise de um sistema-tampão.
5. Dar exemplos de tampões biológicos.
6. O tampão bicarbonato (HCO_3^-/H_2CO_3), presente no plasma em equilíbrio com CO_2 , apresenta pK_a igual a 6,1. Descrever o funcionamento deste sistema, mostrando o efeito da adição de H^+ e de CO_2 sobre o pH do plasma.

AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

1. Escrever a fórmula de um aminoácido. Dar exemplos de:

- a. aminoácido com um grupo amino e dois grupos carboxílicos;
 - b. aminoácido com um grupo carboxílico e dois grupos amino.
2. Definir ponto isoelétrico (pI) de um aminoácido.
 3. Escrever as formas iônicas predominantes da glicina ($pK_{a1} = 2,35$ e $pK_{a2} = 9,78$) e suas cargas líquidas em pH 1; pH 2,35; pH 7,0; pH 9,78 e pH 12. Calcular o pI.
 4. Analisando o grupo R, classificar os aminoácidos em polares e apolares. Entre os polares, citar aqueles que, em pH 7, apresentam grupo com carga negativa (aminoácidos ácidos), carga positiva (aminoácidos básicos) e carga nula (polares sem carga).
 5. Esquematizar a ligação peptídica.
 6. Definir proteínas globulares e fibrosas. Citar exemplos.
 7. Definir estrutura primária.
 8. Descrever as estruturas regulares — α -hélice e folha β pregueada — que compõem a estrutura secundária das proteínas globulares.
 9. Definir estrutura terciária de proteínas globulares. Esquematizar os tipos de ligações que a mantêm, indicando os aminoácidos que participam dessas ligações.
 10. Definir estrutura quaternária de proteínas globulares. Citar exemplos de proteínas com estrutura quaternária.
 11. Verificar a posição dos radicais polares e apolares de uma proteína em solução aquosa.
 12. Definir ponto isoelétrico (pI) de uma proteína e indicar como pode ser determinado.
 13. Definir desnaturação de uma proteína e descrever a ação de pH extremo e temperatura sobre a estrutura das proteínas.
 14. Citar quatro exemplos de proteínas com função não-enzimática.

HEMOGLOBINA — TRANSPORTE DE OXIGÊNIO E TAMPONAMENTO DO PLASMA

1. Descrever a estrutura quaternária da hemoglobina, indicando:
 - a. as subunidades que se associam mais intensamente;
 - b. as interfaces onde ocorrem alterações significativas durante a oxigenação/desoxigenação da hemoglobina;
 - c. o sítio de ligação com o oxigênio.
2. Citar as alterações estruturais provocadas pela ligação do oxigênio à hemoglobina.
3. Definir cooperatividade e indicar que tipo de proteínas podem exibir esta propriedade.
4. Descrever o efeito do 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) sobre a oxigenação da hemoglobina; indicar o papel do BPG no organismo.
5. Definir efeito Bohr e mostrar a sua importância fisiológica.
6. Determinar as formas predominantes da hemoglobina oxigenada e desoxigenada em pH 7,4, conhecendo os pK_a de alguns grupamentos importantes da hemoglobina, como, por exemplo, o radical imidazólico de His 146:

	pK_a de His 146
HbO ₂	6,5
Hb	8,0

Correlacionar esses dados com o efeito Bohr.

7. Das quatro formas possíveis de hemoglobina — HHb, Hb, HHbO₂ e HbO₂ — indicar a que predomina nas hemácias que saem do pulmão e nas hemácias que deixam os tecidos. Mostrar o efeito do pH e pO₂ sobre a transformação de cada uma das formas nas outras, levando em conta a influência da oxigenação e desoxigenação da hemoglobina sobre valores de pK_a e o seguinte equilíbrio:



8. Comparar HbA e HbF quanto à estrutura e afinidade por oxigênio.
9. Dar exemplos de hemoglobinas anormais, indicando a alteração que apresentam.

ENZIMAS

1. Considerando a reação $A \rightarrow B$, não-catalisada:
 - a. fazer o gráfico da concentração de produto formado em função do tempo ($[P] \times t$);
 - b. definir velocidade de reação;
 - c. fazer o gráfico da velocidade da reação em função do tempo ($V \times t$);
 - d. assinalar, nos gráficos de (a) e (b), os tempos iniciais e finais de reação;
 - e. escrever a equação de velocidade em função da concentração de A. Como proceder para medir esta velocidade? Que tempos (iniciais ou finais) devem ser escolhidos para a medida de velocidade?
 - f. pretende-se fazer o gráfico da velocidade da reação em função da concentração de A. Como seriam obtidos os dados experimentais para construir este gráfico?
2. Definir enzima, substrato e sítio ativo.
3. Escrever as reações de formação do produto a partir de E e S. Escrever a equação de velocidade da formação de P.
4. Fazer o gráfico da velocidade da reação $S \rightarrow P$, catalisada enzimaticamente, em função da concentração de S. Descrever os procedimentos experimentais que levariam à obtenção dos dados para a construção deste gráfico.
5. Analisando o gráfico do item 4, verificar, em cada trecho da curva, as concentrações de enzima livre, substrato e complexo ES.
6. Definir constante de Michaelis-Menten (K_M) e mostrar a relação entre seu valor e a afinidade da enzima pelo seu substrato.
7. Fazer o gráfico da velocidade de uma reação enzimática em função de:
 - a. concentração de enzima;
 - b. temperatura;
 - c. pH.
 Descrever os procedimentos experimentais que levariam à obtenção desses gráficos. Justificar a forma dos gráficos.
8. Fazer o gráfico $v_o \times [S]$ para concentrações de enzima E e 2E.
9. Definir inibidor competitivo e não-competitivo.
10. Fazer o gráfico $v_o \times [S]$ sem inibidor, na presença de inibidor competitivo e na presença de inibidor não-competitivo.
11. Caracterizar enzima alostérica. Definir centro alostérico e efetuator alostérico (positivo e negativo).
12. Definir regulação enzimática por modificação covalente.
13. Fazer o gráfico $v_o \times [S]$ de uma reação catalisada por uma enzima alostérica, sem efetuator, na presença de efetuator positivo e de efetuator negativo.

14. Definir cofator. Dar exemplos de cofatores inorgânicos (ativadores metálicos) e orgânicos (coenzimas).
15. Representar o grupo ativo de NAD^+ e de FAD nas formas reduzida e oxidada.
16. Definir vitaminas, relacionando sua função com atividade enzimática.

ESTRUTURA DE CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS

1. Definir carboidrato, açúcar, monossacarídeo e oligossacarídeo e dar exemplos.
2. Definir polissacarídeo. Citar exemplos de polissacarídeos estruturais e de reserva.
3. Descrever a estrutura do glicogênio e indicar a porção da molécula que sofre alongamento ou encurtamento.
4. Caracterizar estruturalmente os ácidos graxos mais comuns na natureza.
5. Definir triacilglicerol. Descrever as vantagens para os seres vivos do armazenamento de triacilgliceróis.
6. Correlacionar a consistência das gorduras animais e óleos vegetais com a estrutura dos ácidos graxos componentes destas substâncias.
7. Definir glicerofosfolípido e esfingolípido.
8. Classificar os lipídios do item 7 em fosfolipídios e glicolipídios.
9. Citar as funções do colesterol.
10. Indicar a porção hidrofílica e a porção hidrofóbica dos diferentes tipos de lipídios anfipáticos. Mostrar em que fração celular são comumente encontrados os lipídios anfipáticos.
11. Caracterizar as classes principais de lipoproteínas plasmáticas, indicando a sua função.

MEMBRANAS

1. Descrever a organização espacial dos lipídios anfipáticos na bicamada lipídica.
2. Citar os componentes principais das membranas celulares.
3. Indicar os fatores que interferem na fluidez das membranas.
4. Descrever o modelo do mosaico fluido, definindo proteínas integradas e proteínas periféricas.
5. Alistar as funções de glicoproteínas e glicolipídios de membrana.
6. Analisar a permeabilidade das membranas biológicas.
7. Descrever a atuação das permeases.
8. Caracterizar transporte passivo e transporte ativo.
9. Descrever o processo de endocitose adsortiva.

METABOLISMO: VIAS PRINCIPAIS (PARTE 3) E SUA REGULAÇÃO (PARTE 4)

GLICÓLISE, GLICONEOGÊNESE E FORMAÇÃO DE ACETIL-CoA

Os objetivos de números 1 a 12 devem ser respondidos utilizando apenas o mapa da glicólise (p. 124).

1. Quais os passos irreversíveis?

2. Quantas moléculas de piruvato se formam a partir de uma molécula de glicose?
3. Que hexose dá origem a trioses?
4. Indicar as reações de óxido-redução.
5. Sabendo que a concentração celular de NAD^+ é da ordem de 10^{-5} M, é possível estimar a quantidade de glicose que pode ser convertida a lactato?
6. Verificar os compostos que apresentam ligações do tipo:
 - a. fosfoenol;
 - b. anidrido fosfórico;
 - c. éster fosfórico.
7. Indicar os compostos ricos em energia.
8. Identificar as reações catalisadas pelos seguintes tipos de enzimas:
 - a. quinase;
 - b. mutase;
 - c. isomerase;
 - d. aldolase;
 - e. desidrogenase.
9. Considerando o número de moléculas de ATP consumidas e formadas, estabelecer o saldo final de ATP na degradação de uma molécula de glicose pela via glicolítica.
10. Sabendo que:

Glicose \longrightarrow 2 Lactato	$\Delta G^{\circ} = -196 \text{ kJ/mol}$
ATP \longrightarrow ADP + P _i	$\Delta G^{\circ} = -31 \text{ kJ/mol}$

 - a. Qual a quantidade de energia que a célula armazena, a partir de um mol de glicose, pela sua degradação através da via glicolítica?
 - b. Qual a porcentagem de energia armazenada pela célula ao degradar glicose pela via glicolítica?
11. Citar os compostos que devem ser fornecidos à via glicolítica para:
 - a. iniciá-la (haver formação de lactato);
 - b. mantê-la em funcionamento.
12. Indicar a função da via glicolítica.
13. Citar a enzima que catalisa a fosforilação da glicose nos tecidos extra-hepáticos e seu efetuator alostérico. Citar a enzima que catalisa a mesma reação no fígado.
14. Esquematizar as reações de fermentação alcoólica que possibilitam a obtenção de NAD^+ na forma oxidada. Citar exemplos de tecidos ou organismos onde ocorrem fermentação láctica e alcoólica. Em que condições o músculo converte glicose a lactato?
15. Definir gliconeogênese e citar exemplos de compostos gliconeogênicos. Citar o tecido responsável pela gliconeogênese.
16. Indicar a localização celular das enzimas da via glicolítica e da gliconeogênese.
17. Comparar as três reações irreversíveis da glicólise com as reações da gliconeogênese que as substituem, quanto a reagentes, produtos, enzimas e coenzimas.
18. Citar as vitaminas necessárias para as seguintes conversões:
 - a. Glicose \rightarrow Lactato;
 - b. Lactato \rightarrow Glicose.
19. Esquematizar as reações catalisadas por fosfofrutoquinase 2 e frutose 2,6-bisfosfatase.

20. Descrever o controle da atividade das seguintes enzimas: hexoquinase, fosfofrutoquinase 1 e 2, frutose 1,6-bisfosfatase e piruvato quinase.
21. Citar as enzimas da glicólise e gliconeogênese que têm sua concentração alterada por ação hormonal, indicando o hormônio que atua em cada caso.
22. Escrever a reação de formação de acetil-CoA a partir de piruvato e indicar:
 - a. as 5 coenzimas necessárias;
 - b. as vitaminas envolvidas;
 - c. a localização celular.
23. Descrever a regulação alostérica e por modificação covalente do complexo piruvato desidrogenase.

CICLO DE KREBS

1. Na oxidação de uma molécula de acetil-CoA no ciclo de Krebs, indicar a enzima que catalisa a reação onde há produção ou consumo de:
 - a. CO_2
 - b. GTP
 - c. NADH
 - d. FADH_2
 - e. H_2O
2. Indicar o composto rico em energia do ciclo de Krebs e a reação que o produz.
3. Citar os compostos que devem ser fornecidos ao ciclo de Krebs para:
 - a. iniciá-lo (repor o oxaloacetato usado na primeira reação);
 - b. mantê-lo em funcionamento.
4. Citar as vitaminas que participam do ciclo de Krebs.
5. Indicar a localização celular do ciclo de Krebs.
6. Na reação catalisada pela aconitase, indicar o composto predominante no equilíbrio.
7. Descrever a regulação da citrato sintase, da isocitrato desidrogenase e do complexo α -cetoglutarato desidrogenase.
8. Esquematizar a reação catalisada pela piruvato carboxilase e indicar seu efetador alostérico.
9. Alistar as funções do ciclo de Krebs.
10. Analisar as reações do ciclo do glioxilato, verificando a conversão que é por ele viabilizada.
11. Citar os organismos que dispõem do ciclo do glioxilato.

CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

1. Definir potencial de óxido-redução (E) e potencial de óxido-redução padrão (E°).
2. Citar os compostos que fazem parte da cadeia de transporte de elétrons e caracterizá-los quimicamente.
3. Esquematizar a seqüência dos compostos da cadeia de transporte de elétrons, indicando os transportadores de elétrons e os transportadores de prótons e elétrons.
4. Indicar a localização celular da cadeia de transporte de elétrons.
5. Citar três inibidores da cadeia de transporte de elétrons, indicando os transportadores sobre os quais atuam.
6. Verificar se é possível a oxidação de malato e de succinato em presença de rotenona.
7. Qual seria o estado de oxidação (oxidado/reduzido) dos componentes da cadeia de transporte de elétrons em presença de malato e de antimicina A?

8. Definir fosforilação oxidativa.
9. Descrever a hipótese do acoplamento quimiosmótico para a fosforilação oxidativa.
10. Indicar o número de ATP sintetizados para cada NADH e FADH₂ oxidados.
11. Citar exemplos de processos biológicos que utilizam ATP.
12. Definir desacoplador e citar um exemplo.
13. Definir inibidor de fosforilação oxidativa e citar um exemplo.
14. Definir controle respiratório.
15. Definir fosforilação ao nível do substrato e citar as reações onde ocorre esta fosforilação.
16. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a ATP e NADH. Mostrar como:
 - a. o NADH produzido na via glicolítica pode ser oxidado na cadeia respiratória (lançadeiras do malato e do glicerol-fosfato);
 - b. o ATP produzido na mitocôndria pode ser utilizado no citossol.

VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO

1. Esquematizar as duas reações de oxidação da via das pentoses-fosfato, citando as enzimas e as coenzimas envolvidas nestas reações.
2. Citar os tipos de enzimas que convertem ribulose em xilulose ou ribose.
3. Definir transaldolase e transcetolase, mostrando a coenzima envolvida. Dar exemplos de reações catalisadas por estas enzimas.
4. Em relação à via das pentoses-fosfato, indicar:
 - a. a localização celular;
 - b. os tecidos em que ocorre;
 - c. as vitaminas participantes.
5. Mostrar a importância biológica da via das pentoses e citar compostos que apresentam ribose na sua molécula.
6. Citar o inibidor competitivo das desidrogenases da via das pentoses-fosfato.
7. Descrever a atividade da via das pentoses-fosfato em função das relações ATP/ADP e NADPH/NADP⁺.

METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

1. Indicar os substratos e os produtos das reações catalisadas por
 - a. proteína quinase;
 - b. glicogênio fosforilase quinase;
 - c. fosfoproteína fosfatase.
2. Esquematizar as reações de degradação do glicogênio a glicose 1-fosfato.
3. Esquematizar as reações catalisadas por adenilato ciclase e fosfodiesterase.
4. Descrever os processos de ativação e inativação da adenilato ciclase e indicar de que depende a ocorrência de um ou outro processo.
5. Mostrar a relação de AMP cíclico e de íons Ca²⁺ com a degradação do glicogênio a glicose 1-fosfato.

6. Citar os hormônios que estimulam a degradação do glicogênio no fígado e no músculo e mostrar seu modo de ação.
7. Esquematizar as reações de conversão de glicose 1-fosfato a glicose. Citar o tecido onde essas reações ocorrem.
8. Esquematizar as reações de síntese de glicogênio a partir de glicose.
9. Mostrar a relação entre AMP cíclico e a síntese de glicogênio.
10. Descrever a ação da insulina sobre o metabolismo de carboidratos quanto à:
 - a. permeabilidade da célula à glicose;
 - b. síntese de glicogênio;
 - c. síntese de glicocinase (fígado).
11. Citar a função do glicogênio hepático e do glicogênio muscular.

FOTOSSÍNTESE

1. Definir fotossíntese.
2. Descrever a estrutura do cloroplasto.
3. Citar os principais tipos de pigmentos fotossintetizadores.
4. Definir fotossistema e indicar os componentes que absorvem e propagam a energia luminosa.
5. Caracterizar o fotossistema I (PSI) e o fotossistema II (PSII).
6. Citar os compostos que ficam reduzidos ou oxidados como consequência da absorção de luz por:
 - a. PSI;
 - b. PSII.
7. Mostrar o caminho dos elétrons emitidos por PSI e PSII.
8. Citar o composto que reduz P680 e indicar um produto importante da sua oxidação.
9. Escrever a equação geral de óxido-redução da fotossíntese.
10. Comparar o transporte de elétrons na membrana tilacóide com o transporte de elétrons na membrana interna da mitocôndria quanto à:
 - a. orientação dos transportadores de elétrons;
 - b. permeabilidade das membranas a prótons;
 - c. destino da energia de óxido-redução derivada do transporte de elétrons;
 - d. sentido do bombeamento de prótons;
 - e. mecanismo de síntese de ATP.
11. Definir fotofosforilação e fotofosforilação cíclica; indicar as condições celulares em que cada um destes processos ocorre.
12. Mostrar as diferenças genéricas entre a fotossíntese bacteriana e a fotossíntese de algas e plantas.
13. Esquematizar a reação de carboxilação catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco).
14. Escrever as reações que convertem 3-fosfoglicerato em gliceraldeído 3-fosfato.
15. Citar os tipos de enzimas que participam da regeneração de ribulose 1,5-bisfosfato.
16. Escrever a equação geral do ciclo de Calvin.
17. Descrever a regulação das seguintes enzimas: rubisco, sedoheptulose 1,7-bisfosfatase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e ribulose 5-fosfato quinase.

18. Escrever a reação catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase quando esta enzima exibe atividade de oxigenase.
19. Citar os fatores que determinam a predominância de uma das atividades da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase.
20. Definir fotorrespiração e analisar o consumo de coenzimas por esta via.
21. Distinguir plantas C_3 de plantas C_4 .
22. Esquematizar as reações que permitem manter altas concentrações de CO_2 nos cloroplastos de plantas C_4 .
23. Comparar a afinidade por CO_2 das enzimas: fosfoenolpiruvato carboxilase e rubisco.
24. Indicar as vantagens adaptativas decorrentes do esquema de fixação de CO_2 das plantas C_4 .

OXIDAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS

1. Esquematizar a reação catalisada pela lipase do tecido adiposo.
2. Esquematizar as reações de conversão de glicerol a compostos intermediários da via glicolítica.
3. Esquematizar o primeiro passo necessário para a degradação de um ácido graxo (ativação).
4. Citar a localização celular da oxidação dos ácidos graxos e mostrar o papel da carnitina.
5. Citar os compostos formados no fim de cada volta do ciclo de Lynen.
6. Indicar o número de moléculas de ATP necessárias para degradar uma molécula de ácido graxo.
7. Alistar as vitaminas que participam do ciclo de Lynen.
8. Descrever a regulação do ciclo de Lynen.
9. Indicar os tecidos que não oxidam ácidos graxos.
10. Indicar os corpos cetônicos e o órgão onde são sintetizados.
11. Esquematizar as reações que levam à produção de corpos cetônicos.
12. Esquematizar as reações que permitem o aproveitamento dos corpos cetônicos. Citar os tecidos onde ocorrem essas reações.
13. Indicar as condições metabólicas que levam a um aumento na produção de corpos cetônicos.
14. Citar as conseqüências de uma produção excessiva de corpos cetônicos.
15. Esquematizar as reações que permitem a oxidação de etanol a acetil-CoA.

SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS E TRIACILGLICERÓIS

1. Relacionar o nível de citrato com o nível de ATP na mitocôndria.
2. Esquematizar a reação catalisada pela citrato liase.
3. Esquematizar as reações que permitem a transferência de acetil-CoA da mitocôndria para o citossol, mostrando a regeneração do oxaloacetato mitocondrial, com participação da enzima málica.
4. Escrever a reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase. Citar as coenzimas envolvidas na reação. Descrever a regulação desta enzima quanto à atividade e à concentração.
5. Citar as proteínas componentes do complexo multienzimático de síntese de ácidos graxos.
6. Definir ACP e comparar sua função com a da coenzima A.

7. Analisar as reações que levam à formação de um ácido graxo a partir de acetil-CoA e malonil-CoA no complexo multienzimático.
8. Citar o agente redutor na biossíntese de ácidos graxos e as suas fontes.
9. Indicar a localização celular da biossíntese de ácidos graxos e os tecidos onde essa via ocorre.
10. Indicar o composto presente nos depósitos do tecido adiposo e as reações que levam à sua síntese.
11. Esquematizar a via de síntese do glicerol 3-fosfato, precursor de triacilgliceróis.
12. Descrever as ações de glucagon, adrenalina e insulina no metabolismo de triacilgliceróis.
13. Definir ácido graxo essencial. Citar exemplos indicando o número de insaturações.
14. Definir eicosanóides e dar exemplos.
15. Mostrar a atuação de corticosteróides e aspirina como agentes antiinflamatórios.

METABOLISMO DO COLESTEROL

1. Indicar como as células do organismo humano podem obter colesterol.
2. Citar o precursor básico e as coenzimas necessárias para a síntese de colesterol.
3. Descrever o controle da atividade e da concentração de HMG-CoA redutase.
4. Dar exemplos de compostos derivados do colesterol.
5. Descrever a atuação dos diferentes tipos de lipoproteínas plasmáticas no transporte de colesterol.
6. Alistar fatores que interferem na concentração do colesterol plasmático.
7. Definir aterosclerose.

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

1. Em relação aos aminoácidos presentes nas células dos mamíferos, indicar:
 - a. suas procedências;
 - b. seus destinos metabólicos;
 - c. se existe uma reserva de aminoácidos ou proteínas.
2. Esquematizar as reações catalisadas pelas seguintes enzimas: aspartato aminotransferase e alanina transaminase. Citar a coenzima que participa das reações e a vitamina presente na sua estrutura.
3. Esquematizar a reação catalisada pela glutamato desidrogenase.
4. Citar o principal produto de excreção de nitrogênio no homem.
5. Esquematizar a reação de formação de carbamoil-fosfato catalisada por carbamoil-fosfato sintetase.
6. No ciclo da uréia:
 - a. indicar a procedência dos átomos de nitrogênio da molécula de uréia;
 - b. calcular o balanço de ATP;
 - c. qual o aminoácido proteico sintetizado?
7. Descrever a regulação alostérica da carbamoil-fosfato sintetase.
8. Citar o órgão responsável pela produção de uréia.
9. A amônia é um composto tóxico para o organismo animal. Mostrar como a amônia produzida nos tecidos extra-hepáticos é transportada para o fígado.

10. Verificar o destino dos esqueletos de carbono dos aminoácidos em seu catabolismo e indicar aqueles que podem originar glicose.
11. Citar as doenças genéticas provenientes de alterações do metabolismo da tirosina e fenilalanina.
12. Descrever o caminho do nitrogênio desde a atmosfera até ser incorporado nos aminoácidos das células animais.
13. Definir aminoácido essencial e citar os aminoácidos essenciais para o organismo humano.
14. Descrever a atuação da insulina sobre o metabolismo de aminoácidos e proteínas.

OS SUBSTRATOS DAS VIAS METABÓLICAS: NUTRIÇÃO

1. Alistar os fatores que tornam obrigatória a ingestão de aminoácidos (proteínas).
2. Definir balanço de nitrogênio.
3. Citar as condições que levam a um balanço positivo ou negativo de nitrogênio.
4. Comparar a qualidade nutricional de proteínas de origem animal com a qualidade de proteínas de origem vegetal.
5. Indicar o valor recomendado de ingestão proteica para indivíduos adultos de países em desenvolvimento.
6. Citar o fator principal que interfere no teor das necessidades energéticas.
7. Descrever as conseqüências de um balanço energético negativo e de um balanço energético positivo.
8. Justificar a necessidade de ingerir uma quantidade mínima de carboidratos.
9. Comparar o valor nutricional de lipídios de origem vegetal com o valor daqueles de origem animal.
10. Mostrar a relação entre os lipídios presentes na dieta e os níveis plasmáticos de LDL-colesterol e HDL-colesterol.
11. Caracterizar as síndromes de desnutrição mais comuns.

ADAPTAÇÕES METABÓLICAS AO EXERCÍCIO

Os objetivos de n.º 1 a 11 referem-se a músculos esqueléticos.

1. Mostrar a disposição dos filamentos grossos e filamentos finos nas miofibrilas. Definir sarcômero.
2. Em relação aos filamentos grossos:
 - a. descrever a estrutura da molécula de miosina;
 - b. o modo de associação das moléculas de miosina;
 - c. definir pontes cruzadas.
3. Descrever a estrutura dos filamentos finos e indicar a que se liga cada uma das subunidades da troponina.
4. Descrever as alterações intracelulares determinadas pela chegada do impulso nervoso.
5. Indicar o evento que inicia a contração da miofibrila e descrever as etapas que compreendem um ciclo de contração.
6. Mostrar a mudança da posição relativa dos filamentos grossos e finos durante a contração e a conseqüência sobre o comprimento dos sarcômeros e, portanto, da fibra muscular.
7. Citar a seqüência de eventos que restabelecem as condições do músculo em repouso.
8. Caracterizar os processos anaeróbios e aeróbios de síntese de ATP para a contração muscular, comparando as suas velocidades. Citar exemplos de atividades físicas sustentadas principalmente por cada um destes sistemas.

9. Mostrar como os íons Ca^{2+} aumentam a disponibilidade de ATP para as fibras musculares.
10. Definir fadiga muscular e citar suas causas prováveis.
11. Diferenciar fibras rápidas de fibras lentas, estrutural e funcionalmente.
12. Definir calmodulina e dar exemplos de proteínas que se ligam ao complexo Ca^{2+} · calmodulina.
13. Comparar a estrutura de músculos lisos com a estrutura de músculos estriados; indicar as diferenças apresentadas pela miosina presente nesses tipos de músculos.
14. Citar os substratos e produtos da reação catalisada por miosina quinase.
15. Descrever a regulação da atividade da miosina quinase por cálcio e cAMP.
16. Comparar o papel do cálcio na contração de músculos lisos e estriados.

EXERCÍCIOS E PROBLEMAS

SISTEMA-TAMPÃO

1. Ordenar, do mais forte para o mais fraco, os ácidos de Brønsted listados a seguir:

	K_a	pK_a
Ácido acético	$1,8 \times 10^{-5}$	4,7
Ácido carbônico	$7,9 \times 10^{-7}$ $6,0 \times 10^{-11}$	6,1 10,4
Ácido fosfórico	$7,6 \times 10^{-3}$ $6,3 \times 10^{-8}$ $5,0 \times 10^{-13}$	2,1 7,2 12,3
Íon amônio	$5,5 \times 10^{-10}$	9,3
Íon metilamônio	$2,5 \times 10^{-11}$	10,6

2. Água e soluções de mesma concentração de NaCl, ácido acético ($H_3C-COOH$) e metilamina ($H_3C-NH_3^+$), foram ajustadas para pH = 2 e para pH = 9 pelas adições apropriadas (HCl ou NaOH). A um mesmo volume de cada solução foi adicionado um volume fixo de NaOH. Os valores de pH obtidos após a adição do álcali foram:

	pH inicial	pH final		pH inicial	pH final
H ₂ O	2	7,5	H ₂ O	9	11,5
NaCl	2	7,5	NaCl	9	11,5
Ácido acético	2	4,5	Ácido acético	9	11,5
Metilamina	2	7,5	Metilamina	9	9,5

- Comparar o comportamento das soluções frente à adição de álcali.
 - Qual seria a variação de pH esperada no caso de ser adicionado HCl às mesmas soluções?
3. Determinar o pH de uma solução 0,1 M de um ácido fraco ($K_a = 10^{-5}$) quando em
- solução aquosa
 - solução aquosa contendo seu sal em concentração 0,1 M
- Comparar os resultados com os que seriam obtidos para HCl 0,1 M nas condições a e b.
4. Dispõe-se de soluções de mesma concentração de ácido acético, acetato de sódio, HCl e NaOH. Propor três maneiras diferentes de preparar um tampão acetato com pH igual ao pK_a do ácido acético.
5. Deseja-se determinar os valores de pK_a do ácido láctico e de metilamina a partir de soluções destes compostos com pH igual a 7. A determinação deve ser feita através da adição de ácido ou álcali?

6. Uma solução de ácido acético ($pK_a = 4,7$) foi ajustada para $pH = 3$ por adição de HCl e, a seguir, titulada com NaOH até $pH = 12$. Uma solução de metilamina ($pK_a = 10,6$) foi submetida aos mesmos procedimentos.
- Construir as curvas aproximadas destas titulações, estabelecendo valores de pH em ordenadas e volumes adicionados de NaOH em abscissas.
 - Que forma molecular do ácido acético predomina em cada região da curva? E da metilamina?
 - Construir uma curva aproximada de titulação de uma mistura de ácido acético e metilamina.
7. Uma reação produz 0,01 moles de H^+ . Calcular o pH final quando esta reação se processa:
- em 1 L de H_2O
 - em 1 L de uma solução 0,11 M de histidina, $pH 7,04$ (os valores de pK_a de histidina são 1,80; 6,04 e 9,33).
8. Comparar a eficiência dos seguintes tampões:
- acetato 0,2 M $pH 4,7$
 - acetato 0,2 M $pH 5,7$
 - acetato 0,02 M $pH 4,7$
- Calcular as concentrações de acetato e ácido acético nos três tampões.
9. Deseja-se preparar uma solução-tampão para ser utilizada em experiências com uma enzima que tem atividade máxima e constante de $pH 4,2$ a $6,0$. Dispõe-se das seguintes soluções de mesma molaridade: HCl, NaOH, cloreto de amônio ($pK_a 9,3$), ácido fórmico ($pK_a 3,7$), ácido láctico ($pK_a 3,9$), ácido propiônico ($pK_a 4,8$) e ácido fosfórico ($pK_a 2,1; 7,2; 12,3$).
- Qual o melhor tampão que pode ser preparado?
 - Quais das soluções acima seriam utilizadas para prepará-lo, e em que proporções?
 - Se 1 L deste tampão, de concentração 0,22 M, for utilizado em uma experiência em que há produção de 0,09 mol de H^+ , qual será o pH final da solução?
10. O meio de cultura para uma determinada bactéria apresenta em sua composição KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 . O pH inicial da cultura era igual a 7,0 e o pH final, após o crescimento bacteriano, era 5,8. Para impedir uma queda tão acentuada de pH , foram sugeridas duas alterações do meio de cultura:
- dobrar a concentração dos sais de fosfato.
 - substituir os fosfatos de sódio e potássio por acetato dos mesmos cátions (o valor do pK_a do ácido $H_2PO_4^-$ é 7,2 e do ácido acético é 4,7).
- Dê sua opinião sobre as duas alterações propostas.
11. Pretende-se cultivar uma espécie bacteriana que se desenvolve bem entre $pH 6,5$ e $7,6$. Para isto deve-se preparar um tampão de concentração 0,05 M. Dispõe-se das seguintes soluções:
- KH_2PO_4 1 M
 NaOH 2 M
 HCl 1 M
 K_2HPO_4 1 M
 Ácido acético 2 M
 Acetato de sódio 1 M.
- Qual o melhor tampão a ser preparado? Por quê?
 - Quais dessas soluções deveriam ser usadas e em que proporções?
- São conhecidos os valores de pK_a do ácido acético (4,7) e do ácido fosfórico (2,1; 7,2 e 12,3).

AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

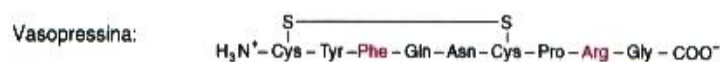
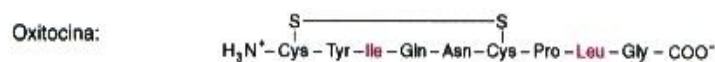
1. Fazer a curva de titulação de serina ($pK_1 = 2,19$ e $pK_2 = 9,21$) a partir de:
- $pH = 1$
 - $pH = 12$.

2. Escrever as formas iônicas predominantes do ácido glutâmico ($pK_1 = 2,10$, $pK_2 = 9,47$ e $pK_R = 4,07$) em:
- $pH = 1$
 - $pH = 4,07$
 - $pH = 7$
 - $pH = 12$
- Calcular o pI.
3. Escrever as formas iônicas predominantes da lisina ($pK_1 = 2,16$, $pK_2 = 9,06$ e $pK_R = 10,54$) em $pH = 1$, $pH = 4$, $pH = 9,06$ e $pH = 13$. Calcular o pI.
4. Qual seria o resultado da eletroforese de uma solução de glicina ($pK_1 = 2,35$ e $pK_2 = 9,78$) feita em $pH = 9,78$? Comparar a velocidade de migração do aminoácido nesta eletroforese com a obtida em eletroforese a $pH = 11,78$.
5. Para o tripeptídeo Ala-Lys-Ser,
- classificar os aminoácidos segundo o grupo R
 - esquematar as ligações que estes aminoácidos poderiam formar na estrutura terciária de uma proteína
 - calcular o pI, sabendo que os pK_a da alanina são 2,35 e 9,87; os da lisina, 2,16; 9,06 e 10,54; e os da serina, 2,19 e 9,21
 - comparar a capacidade tamponante de uma solução 0,1 M deste tripeptídeo com a de uma solução 0,2 M de glicina.
6. Seja o seguinte peptídeo: Glu - His - Leu - Lys
- Em relação aos grupos ionizáveis presentes no peptídeo, preencher o quadro a seguir com o valor de pK_a e a carga (+; -; 0; 0/- ou +/0) que a forma predominante do grupo apresenta nos valores de pH indicados

Grupo ionizável	pK_a	Carga em pH igual a				
		1,0	4,2	6,0	9,7	12

- Determinar o pI do peptídeo.

7. Oxitocina e vasopressina, dois peptídeos com função hormonal, estão representados a seguir.



O quadro adiante mostra a atividade dos dois peptídeos quanto à lactação e à antidiurese. Mostra também a atividade (relativa às atividades de oxitocina e vasopressina) de peptídeos sintéticos, que diferem da oxitocina por substituição da leucina por outros aminoácidos.

- A partir das conseqüências das substituições de aminoácidos e sabendo que o tratamento de oxitocina e vasopressina com agentes redutores fortes acarreta a sua inativação, indicar de que depende a atividade biológica dos peptídeos.

Atividade de lactação e antidiurese (em porcentagem)						
			"Oxitocina" com substituição de leucina por:			
	Oxitocina	Vasopressina	Isoleucina	Valina	Arginina	Lisina
Lactação	100	–	80	70	46	40
Antidiurese	–	100	–	–	56	6

- b. O dipeptídeo aspartame é formado por aspartato e fenilalanina, ambos em configuração L. Se um dos dois (ou os dois) resíduos de aminoácidos estiver na configuração D, o dipeptídeo será insípido ou amargo. Este fato está de acordo com as suposições feitas no item a?
8. Já foram descritos nos seres humanos cerca de 500 tipos de hemoglobinas diferentes da hemoglobina presente em adultos saudáveis (HbA). Essas hemoglobinas anormais apresentam substituição de um aminoácido, como mostra o quadro a seguir. Todas causam doenças, de gravidade variável, com exceção da última, que não tem manifestações clínicas.

Hemoglobina	Aminoácido da HbA	Aminoácido da Hb anormal
Hb Hammersmith	Fenilalanina	Serina
Hb Bristol	Aspartato	Valina
Hb Bibba	Leucina	Prolina
Hb Savannah	Glicina	Valina
Hb Philly	Tirosina	Fenilalanina
Hb E	Glutamato	Lisina

- a. Que suposições podem ser feitas sobre a troca de aminoácidos na molécula proteica?
b. As suposições estão coerentes com as do exercício anterior?
9. Em que diferem as pontes de hidrogênio da estrutura secundária e terciária de proteínas globulares?
10. Discutir a seguinte afirmação: a estrutura primária de uma proteína determina a sua estrutura terciária.
11. Uma mistura contendo citocromo *c* ($pI = 10,6$) e mioglobina ($pI = 7,0$) foi submetida a eletroforese, utilizando-se soluções-tampão com os seguintes valores de pH: 3, 7, 10,6 e 12. Mostrar a migração das proteínas em cada caso.
12. A mobilidade eletroforética em $pH = 8,6$ da hemoglobina normal e de hemoglobinas anormais (que diferem da hemoglobina normal por substituição de um aminoácido) está representada a seguir:



Identificar a posição (A, B, C ou D) correspondente a cada uma das seguintes hemoglobinas anormais:

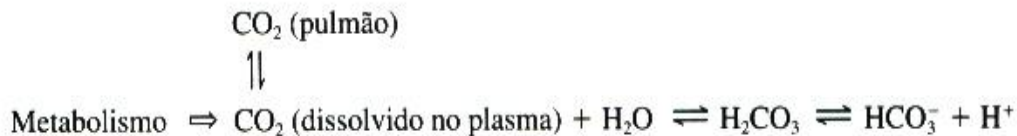
- HbS — valina em lugar de glutamato
HbJ — aspartato em lugar de glicina
HbN — glutamato em lugar de lisina
HbC — lisina em lugar de glutamato

13. Verificar a veracidade das seguintes afirmações:
- a. Em valores extremos de pH, uma proteína apresenta menor número de grupos com carga elétrica do que em pH 7.
b. Uma proteína que apresenta menor solubilidade em pH 9 é rica em aminoácidos básicos.

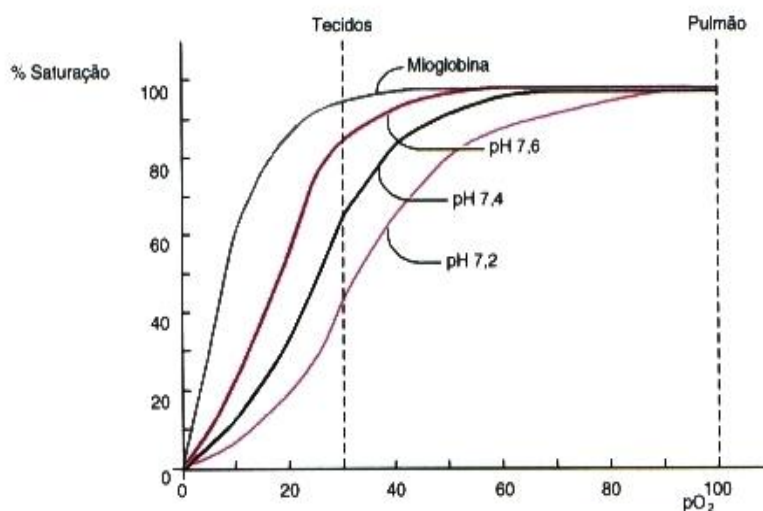
- c. Quanto maior a porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos presentes em uma proteína, tanto maior será a concentração de sal necessária para precipitá-la.
- d. Uma proteína cujo pI é 4,1 tem mais aminoácidos ácidos do que aminoácidos apolares.
- e. Aminoácidos que apresentam três pK_a participam das interações hidrofóbicas presentes na estrutura terciária das proteínas.
- f. As pontes de hidrogênio da estrutura em folha β -pregueada de uma proteína são estabelecidas entre os grupos R dos aminoácidos.
- g. Excluindo os grupos R dos aminoácidos, as regiões em α -hélice de proteínas diferentes são idênticas.
- h. A desnaturação de uma proteína acarreta a perda de sua função.
- i. Proteínas diferentes podem ser separadas por eletroforese, ainda que esta seja feita em pH diferente dos valores de pI das proteínas da mistura.
- j. A hemoglobina que tem um glutamato da cadeia β substituído por lisina apresenta pI maior que o da hemoglobina normal.
- k. Uma proteína contendo três grupos α -carboxila tem estrutura quaternária.
- l. O ponto isoelétrico de um dipeptídeo formado apenas por leucina é igual ao da própria leucina.

HEMOGLOBINA — TRANSPORTE DE OXIGÊNIO E TAMPONAMENTO DO PLASMA

1. Considerando o esquema seguinte, analisar o pH do plasma nas situações:
 - a. pneumonia (redução da eficiência de trocas gasosas)
 - b. hiperventilação
 - c. diabetes (produção aumentada de ácidos orgânicos)



2. O gráfico mostra a curva de saturação por oxigênio da mioglobina e as curvas de saturação da hemoglobina (HbA) em diferentes valores de pH.



- a. Uma solução de hemoglobina, mantida sob pO₂ de 30 torr, apresentava pH = 7,4. Em experimentos separados, foi adicionado HCl ou NaOH à solução, até que os valores de pH fossem, respectivamente, 7,2 e 7,6. Em qual dos experimentos houve liberação de O₂ pela hemoglobina?
- b. Uma solução de hemoglobina a pH 7,4 estava submetida a pO₂ de 100 torr. Que fenômeno deve ocorrer com a hemoglobina se a pO₂ baixar para 40 torr? E com a mioglobina?

- c. O pH plasmático nos alvéolos pulmonares ($pO_2 = 100$ torrs) é 7,4 e nos tecidos ($pO_2 = 40$ torrs) é 7,2. Que fenômeno deve ocorrer com a hemoglobina nos pulmões e nos tecidos? O que aconteceria se, em vez de hemoglobina, houvesse mioglobina no sangue?
- d. A mioglobina, sob uma mesma pO_2 , deve doar ou receber oxigênio da hemoglobina?
- e. Comparar a curva de saturação por oxigênio para a hemoglobina fetal com a curva de HbA.
3. O composto 2,3-bisfosfoglicerato (BPG), presente nas hemácias, diminui acentuadamente a saturação da hemoglobina por oxigênio em torno de $pO_2 = 40$ torrs, mas tem pouco efeito quando a pO_2 é da ordem de 100 torrs. Comparar a concentração de BPG das hemácias de um indivíduo de vida sedentária que vive ao nível do mar, com aquela de um indivíduo
- sedentário, vivendo em La Paz
 - esportista, vivendo ao nível do mar.
4. Descrever o processo de manutenção do pH do sangue através da interação dos sistemas HHb/HbO₂ e CO₂/HCO₃⁻ nos tecidos e pulmões. Considerar o efeito Bohr e as alterações de pK_a de radicais da hemoglobina provocadas pela ligação com oxigênio.

O SENTIDO DAS REAÇÕES

1. A uma solução com concentração 1 M de NAD⁺, NADH, piruvato e lactato, adicionou-se lactato desidrogenase. O potencial de óxido-redução padrão ($E^{0'}$) dos sistemas NAD⁺/NADH e piruvato/lactato é igual a -0,32 V e -0,19 V, respectivamente.
- Em que sentido a reação ocorrerá?
 - Como variam os potenciais de óxido-redução dos dois sistemas à medida que a reação ocorre?
 - Em que condições a reação atingirá o equilíbrio? Qual o valor do potencial de óxido-redução dos dois sistemas nesta situação?
 - Qual o valor de $\Delta G^{0'}$ da reação?

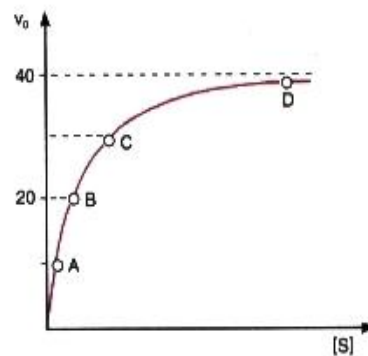
ENZIMAS

1. Sabendo que a uréia (H₂N-CO-NH₂) pode ser decomposta em CO₂ e NH₃, um estudante interessado em obter NH₃ rapidamente, a partir de uréia, preparou uma série de tubos e incubou-os a 30°C por 10 minutos. Após este tempo, dosou amônia nos tubos. A composição dos tubos (com volume de 1 ml) e os resultados de suas dosagens foram:

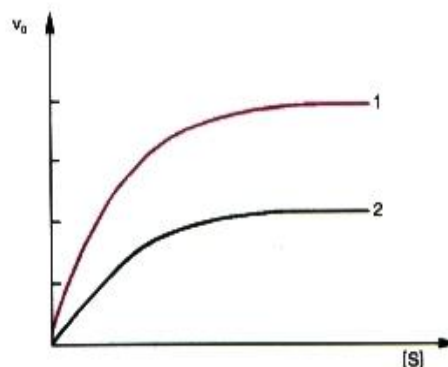
Tubo nº	Uréia (mM)	Urease (µg)	NH ₃ (µmoles)
1	2,5	0,1	0,21
2	5,0	0,1	0,42
3	10	0,1	0,59
4	15	0,1	0,67
5	25	0,1	0,73
6	50	0,1	0,78
7	100	0,1	0,79
8	200	0,1	0,78
9	200	-	0,00

- Por que não houve formação de NH₃ no tubo 9?
- Qual foi a velocidade de reação nos tubos 5 a 8?
- De que dependeu a velocidade de reação neste experimento?
- Qual seria o resultado se a dosagem de amônia fosse feita após 48 h de incubação?
- Que modificações poderiam ser feitas na composição dos tubos para obter velocidades maiores do que as que foram medidas?

2. Considerando a reação $A \rightarrow B$, não-catalisada, fazer o gráfico da concentração de produto formado em função do tempo ($[P] \times t$) e da velocidade da reação em função do tempo ($V \times t$). Assinalar nos gráficos os tempos iniciais e finais da reação. Por que se utilizam tempos iniciais para medidas de velocidade de reação?
3. Descrever os procedimentos experimentais necessários para a obtenção do gráfico da velocidade da reação enzimática $S \rightarrow P$ em função da concentração do substrato.
4. Fazer os seguintes gráficos:
 - a. Velocidade da reação em função da concentração do complexo enzima-substrato ($v_0 \times [ES]$).
 - b. Concentração de ES em função da concentração do substrato ($[ES] \times [S]$).
 - c. Concentração de ES em função da concentração de enzima ($[ES] \times [E]$).
 - d. Concentração de enzima livre em função do tempo ($[E_{\text{livre}}] \times t$).
 - e. Concentração de E_{livre} em função da concentração de substrato ($[E_{\text{livre}}] \times [S]$).
 - f. Velocidade máxima em função da concentração de inibidor não-competitivo ($V_{\text{máx}} \times [I_{\text{NC}}]$).
 - g. Velocidade máxima em função da concentração de inibidor competitivo ($V_{\text{máx}} \times [I_{\text{C}}]$).
5. Indicar a porcentagem de enzima livre (em relação ao total de enzimas presentes) e de substrato livre (em relação à sua concentração inicial) nos pontos A, B, C e D do seguinte gráfico:



6. A velocidade de uma reação, utilizando-se uma concentração de substrato igual a 10^{-2} M e de enzima igual a 0,01 mg/ml, é igual a 20 nmoles de produto por minuto. Sabendo que o K_M da enzima é 10^{-5} M, indicar a:
 - a. quantidade de produto formado após 5 minutos de reação
 - b. velocidade da reação, usando-se a mesma concentração da enzima e uma concentração de substrato igual a 10^{-5} M
 - c. velocidade da reação, dobrando-se a concentração da enzima.
7. Foram medidas as velocidades de uma reação enzimática em função da concentração de substrato, mantendo-se fixos o pH e a temperatura. Que alterações poderiam ter sido introduzidas na experiência (curva 1) de modo a obter os resultados expressos pela curva 2 do gráfico a seguir?



8. As enzimas A, B, C e D têm as seguintes características:

- A: grande afinidade pelo substrato e alta velocidade de catálise
- B: pequena afinidade pelo substrato e baixa velocidade de catálise
- C: grande afinidade pelo substrato e baixa velocidade de catálise
- D: pequena afinidade pelo substrato e alta velocidade de catálise

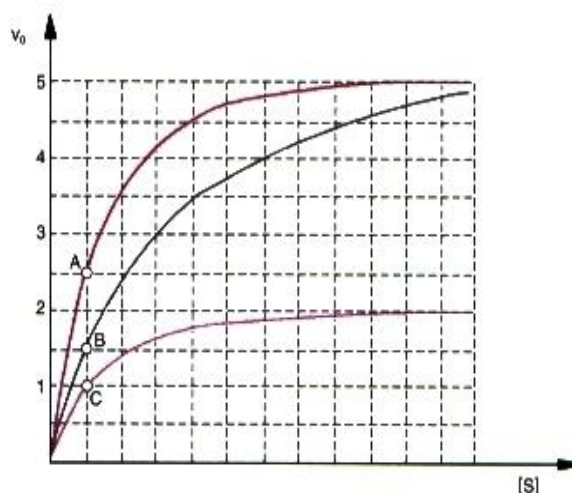
Supondo que os valores das constantes de velocidade k_1 , k_2 e k_3 para a enzima A sejam, respectivamente, 1.000, 100 e 1, estabelecer valores comparativos para as constantes de velocidades das enzimas B, C e D que expliquem as suas características.

9. A reação $\text{Glicose} + \text{ATP} \rightarrow \text{glicose 6-fosfato} + \text{ADP}$ pode ser catalisada por duas enzimas: hexoquinase e glicoquinase. A partir dos resultados apresentados no quadro a seguir, pode-se concluir qual das enzimas tem maior afinidade pela glicose? Justificar por que as velocidades de reação são diferentes.

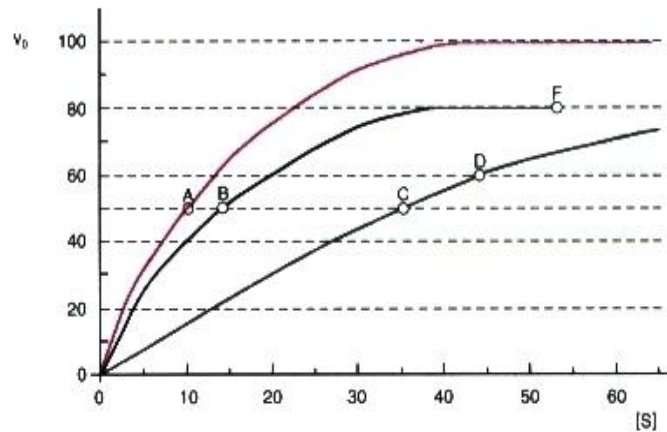
Hexoquinase			Glicoquinase		
Tubo nº	Glicose (mM)	Velocidade da reação ($\mu\text{moles/min}$)	Tubo nº	Glicose (mM)	Velocidade da reação ($\mu\text{moles/min}$)
1	0,01	0,07	1	5	80
2	0,02	0,14	2	10	160
3	0,05	0,36	3	20	250
4	0,10	0,72	4	50	300
5	0,20	1,20	5	100	320
6	0,50	1,45	6	150	310
7	1,00	1,44	7	200	320
8	2,00	1,44	8	500	320

10. O gráfico a seguir representa a cinética de uma reação enzimática na presença de um inibidor competitivo, não-competitivo e sem inibidores. Para que pontos — A e/ou B e/ou C — são válidas as seguintes afirmações:

- a. $v_0 = k_3 [\text{ES}]$
- b. $[\text{S}] = K_M$
- c. $[\text{ES}] > [\text{E}_{\text{livre}}]$
- d. $[\text{S}]$ limitante
- e. $v_0 = V_{\text{máx}}$
- f. $v_0 = k [\text{E}_{\text{total}}]$
- g. $[\text{E}_{\text{total}}] > [\text{ES}] + [\text{E}_{\text{livre}}]$
- h. $[\text{ES}] < [\text{E}_{\text{total}}]$
- i. $[\text{ES}] = [\text{E}_{\text{livre}}]$



11. O gráfico a seguir mostra os resultados obtidos em experiências realizadas com a mesma concentração de enzima, na ausência e presença de inibidores. Indicar as porcentagens, em relação ao total de enzima, de:
- complexo enzima-substrato (ES) correspondente aos pontos A, B, C, D e F
 - enzima livre nos pontos A, B e F.



12. O quadro a seguir refere-se a medidas de velocidades iniciais feitas com a mesma concentração de enzima.

Tubo nº	Substrato (mM)	Inibidor (mM)	Velocidade da reação (nmoles/min)
1	0,02	—	0,1
2	0,1	—	10
3	1,0	—	20
4	2,0	—	20
5	desconhecida	0,1	8
6	desconhecida	0,3	18

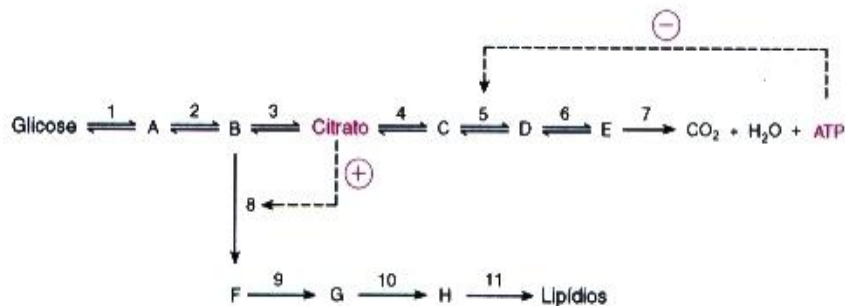
- Nos tubos 1 a 6, qual o percentual de enzima presente no complexo ES durante os tempos em que a velocidade da reação foi medida?
 - Sob que forma apresenta-se a fração de enzima restante?
13. O quadro a seguir mostra os valores de velocidade de uma reação enzimática em presença e ausência de um inibidor I. Planejar a composição do tubo 5, de modo que a velocidade obtida indique o tipo de inibição provocada por I.

Tubo nº	Enzima (µg)	Substrato (mM)	Inibidor (µg)	Velocidade (nmoles/min)
1	1	1	—	18
2	1	2	—	20
3	1	3	—	20
4	1	3	1	15
5				

14. O quadro adiante apresenta valores de velocidade de reação ($\mu\text{moles/min}$) para as enzimas A, B e C.
- Completá-lo, admitindo que as enzimas são estáveis de pH 3 a pH 11, seus substratos não têm grupos ionizáveis e outras variáveis (concentração de enzima e de substrato etc.) são mantidas fixas.
 - Fazer um gráfico relacionando velocidade de reação e pH, para as três enzimas.

Enzima	Grupos do centro ativo essenciais para a catálise	pH									
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	
A	carboxila ($pK_a = 5$) desprotonada			40							
B	amino ($pK_a = 9$) protonado	80									
C	carboxila ($pK_a = 5$) desprotonada e amino ($pK = 9$) protonado					80					

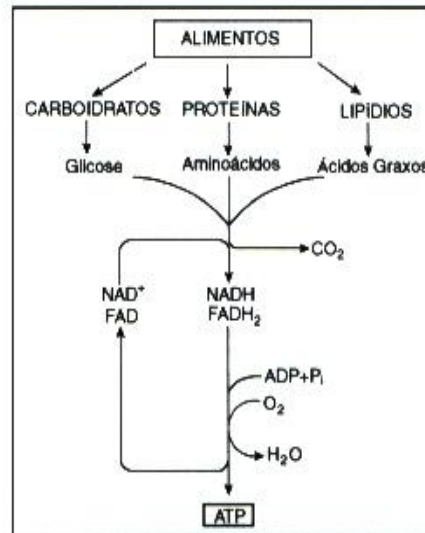
15. Fazer o gráfico de Lineweaver-Burk para uma reação enzimática na presença de duas concentrações de inibidor competitivo e duas de inibidor não-competitivo. Incluir o gráfico da reação na ausência de inibidores.
16. O metanol, por ação da álcool desidrogenase, é convertido a formaldeído, extremamente tóxico. A intoxicação por metanol pode ser tratada por ingestão de doses elevadas de etanol. Como se justifica esta terapia?
17. A glicose pode ser utilizada como fonte de energia (ATP) ou ser convertida em lipídios, como mostra o seguinte esquema simplificado:



- a. Quais são as reações catalisadas por enzimas alostéricas? Quais são seus efetadores?
- b. Por que a síntese de lipídios ocorre apenas quando há grande disponibilidade de glicose?

INTRODUÇÃO AO METABOLISMO

1. Responder as seguintes questões relativas ao mapa metabólico simplificado seguinte sobre a degradação (oxidação) de alimentos:
 - a. Qual a finalidade biológica dos processos descritos no mapa?
 - b. Quais os compostos aceptores de hidrogênio?
 - c. Quais os compostos necessários para a conversão da forma reduzida das coenzimas na forma oxidada?
 - d. Citar a função das coenzimas e do oxigênio na oxidação dos alimentos.



2. Analisar as seguintes afirmações:

- A energia dos alimentos é obtida por oxidação.
- A oxidação biológica consiste na retirada de hidrogênio (H_2) do substrato.
- Os processos celulares que requerem energia utilizam a energia térmica proveniente da oxidação dos alimentos.
- Uma parte da energia derivada da oxidação de alimentos é usada para sintetizar um composto rico em energia (ATP).
- A única função dos alimentos é fornecer energia.
- Os compostos característicos de um dado organismo devem ser supridos pela dieta.

METABOLISMO: VIAS PRINCIPAIS E SUA REGULAÇÃO

GLICÓLISE, GLICONEOGENESE E FORMAÇÃO DE ACETIL-CoA

- Escrever a equação geral da conversão de glicose a lactato.
- Calcular o rendimento energético celular da degradação anaeróbia da glicose, sabendo que



- Dispondo de uma solução contendo glicose e todas as enzimas da via glicolítica, listar os compostos que devem ser adicionados para a conversão do açúcar a lactato.
- Incubando uma suspensão de hemácias com fosfato inorgânico radioativo, é possível obter frutose 1,6-bisfosfato com os dois átomos de fósforo radioativos?
- O lactato produzido pelo músculo pode ser convertido a glicose pelo fígado.
 - Em que condições o músculo produz lactato?
 - Escrever a equação geral da conversão lactato \rightarrow glicose.
 - Por que esta conversão não é feita no músculo?
 - Além do músculo, que outros tecidos (ou células) produzem lactato?
- Descrever as conseqüências metabólicas, em fígado, músculo e hemácias, da falta de atividade de:

- a. triose fosfato isomerase
 - b. frutose 1,6-bisfosfatase.
7. As leveduras fermentam glicose a etanol. A adição de bissulfito de sódio (NaHSO_3) a uma cultura de leveduras interfere no processo, pois este sal complexa-se com acetaldeído, formando um composto estável que não é substrato para as enzimas da levedura.
 - a. Escrever a equação geral do processo e calcular o saldo de ATP, em presença de excesso de NaHSO_3 .
 - b. Mostrar como é possível utilizar uma cultura de leveduras para a obtenção de glicerol a partir de glicose.
 8. Justificar por que os mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* desprovidos de mitocôndria são incapazes de crescer em um meio contendo apenas glicerol ou etanol como fonte de carbono.
 9. A uma solução contendo todas as enzimas da glicólise foram adicionados 100 mmoles de glicose, 20 mmoles de ATP, 20 mmoles de ADP, 1 mmol de NAD^+ e 10 mmoles de fosfato. Qual seria a quantidade máxima de lactato que poderia ser produzida nestas condições? Que outros compostos e em que concentrações apareceriam ao final da reação?
 10. Discutir as conseqüências para o nível glicêmico da substituição do gene de glicocinase pelo gene de hexocinase.
 11. A fosfofrutoquinase pode ser inibida alostericamente por ATP, que é a própria coenzima da reação. Explicar esta aparente incoerência.
 12. Descrever a regulação da glicólise em função da relação ATP/ADP.
 13. Descrever a regulação da glicólise e da gliconeogênese em função da concentração de frutose 2,6-bisfosfato.
 14. O arsenato (HAsO_4^{2-}) pode substituir o P_i (HPO_4^{2-}) na reação catalisada por gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. O composto resultante da incorporação de arsenato não é substrato da fosfoglicerato quinase, sofrendo hidrólise espontânea e imediata, produzindo arsenato e 3-fosfoglicerato. Hemácias e hepatócitos supridos apenas com glicose foram incubados em presença de excesso de arsenato. Verificar que células sobreviverão a este tratamento.
 15. Quando a glicose é metabolizada a acetil-CoA, citar o número de moléculas de ATP, NADH e CO_2 formadas.

CICLO DE KREBS

Os exercícios de números 1 a 4 devem ser respondidos utilizando apenas a Fig. 8.3.

1. Que composto é oxidado no ciclo de Krebs?
2. Simultaneamente que tipo de composto sofre redução?
3. Os seguintes compostos foram adicionados, separadamente, a um sistema *in vitro* que contém mitocôndrias: acetil-CoA, piruvato, glutamato, citrato ou ácidos graxos. Supondo que as enzimas necessárias estejam presentes no sistema, a adição de que compostos fará aumentar a concentração de oxaloacetato?
4. Uma suspensão de mitocôndrias, suplementada com acetil-CoA marcada com C^{14} , produz CO_2 marcado apenas quando suprida de oxigênio. Em condições anaeróbias, a adição de azul de metileno restaura a produção de CO_2 marcado, observando-se também a descoloração do corante (azul de metileno reduzido é incolor). Justifique estes resultados.

5. Escrever a equação da oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs.
6. Mostrar as conseqüências metabólicas da ativação da piruvato carboxilase por acetil-CoA.
7. Descrever a regulação do ciclo de Krebs em função das relações ATP/ADP e NAD^+/NADH .
8. Relacionar a velocidade da via glicolítica com a atividade da isocitrato desidrogenase.
9. A síntese de porfirinas inicia-se com a condensação de succinil-CoA e glicina. Como pode ser mantido o nível dos compostos intermediários do ciclo de Krebs quando esta síntese ocorre?
10. Escrever a equação geral da síntese de α -cetoglutarato a partir de piruvato.
11. Explicar por que dietas ricas em carboidratos e/ou proteínas levam a um acúmulo de citrato.
12. O beribéri é uma moléstia ocasionada por deficiência de tiamina. Nos portadores desta moléstia,
 - a. que compostos aparecem em níveis plasmáticos elevados?
 - b. que metabolismo é mais afetado: o de carboidratos, lipídios ou proteínas?
 - c. que tecidos seriam mais precocemente afetados?
13. Na oxidação completa de glicose, indicar as reações onde há formação de CO_2 .
14. Animais de laboratório foram alimentados com dietas diferentes, cada uma contendo um dos seguintes compostos, marcado com C^{14} . Indicar os casos em que seria possível encontrar glicose radioativa nos animais.
 - a. oxaloacetato
 - b. acetato
 - c. palmitato
 - d. piruvato
 - e. etanol
 - f. glicerol
 - g. citrato.
15. Por que plantas e bactérias são capazes de converter ácidos graxos em glicose e mamíferos não?

CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

1. Os potenciais de óxido-redução dos compostos que participam de uma cadeia de transportadores de elétrons fornecem alguma indicação sobre a seqüência em que eles se encontram localizados em uma membrana celular?
2. Uma suspensão de mitocôndrias foi incubada com excesso de NADH em presença de oxigênio e de compostos (A, B e C), que atuam sobre a cadeia de transporte de elétrons do NADH até o oxigênio. Determinaram-se, em cada caso, os componentes da cadeia que se encontravam reduzidos ou oxidados. Com base nos resultados encontrados (quadro abaixo), seqüencie os componentes da cadeia.

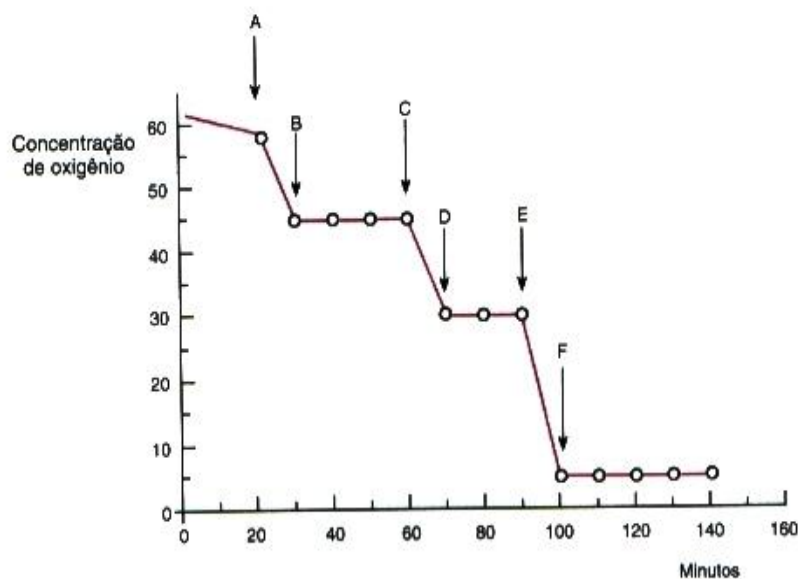
Adição	Componentes oxidados	Componentes reduzidos
—	NAD^+ , FMN, CoQ, cit a-a ₃ , cit b, cit c, cit c ₁	—
A	—	NADH, FMNH ₂ , CoQH ₂ , cit a-a ₃ , cit b, cit c, cit c ₁
B	cit a-a ₃ , cit c, cit c ₁	NADH, FMNH ₂ , CoQH ₂ , cit b
C	CoQ, cit a-a ₃ , cit b, cit c, cit c ₁	NADH, FMNH ₂

3. Uma suspensão de mitocôndrias foi incubada em diferentes condições, medindo-se a formação de NAD^+ , o consumo de oxigênio, a produção de ATP e a diferença de pH entre o interior e o exterior da organela. Os resultados encontrados estão apresentados no quadro abaixo:

Tubo	Condição	NAD^+	Consumo de O_2	Produção de ATP	ΔpH
1	com NADH	+++	+++	+++	1,4
2	com NADH + droga	+++	+++	—	0
3	sem NADH	—	—	—	0
4	com NADH e pH externo mantido constante	+++	+++	—	0
5	sem NADH, mas com ΔpH	—	—	+++	1,4

- Verificar se é possível:
 - oxidação de NADH sem síntese de ATP
 - oxidação de NADH sem consumo de oxigênio
 - consumo de oxigênio sem síntese de ATP
 - consumo de oxigênio sem formação de gradiente de H^+
 - consumo de oxigênio sem oxidação de NADH.
 - Quais dos parâmetros medidos apresentam vinculação indissociável?
- Escrever a equação geral da oxidação de NADH na cadeia de transporte de elétrons. Calcular o rendimento biológico desta oxidação, sabendo que os potenciais de óxido-redução padrão (E°) dos sistemas NAD^+/NADH e $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ são iguais a $-0,32\text{ V}$ e $0,82\text{ V}$, respectivamente.
 - Analisar a velocidade da cadeia de transporte de elétrons em função da razão ATP/ADP.
 - Dinitrofenol acelera o consumo de oxigênio pela cadeia de transporte de elétrons. Justificar.
 - Citar as conseqüências dos seguintes fatores para o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa:
 - presença de CN^- ou CO
 - carência de P_i
 - carência de ADP
 - presença de dinitrofenol (DNP)
 - carência de P_i e/ou ADP em presença de DNP
 - presença de oligomicina
 - presença de oligomicina + DNP.
 - O composto A inibe o consumo de oxigênio e a síntese de ATP por mitocôndrias isoladas. A medida destes parâmetros em presença e ausência de um desacoplador permitiria determinar o modo de ação do composto A?
 - Qual o efeito de atractilosídio sobre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP?
 - Uma suspensão de células hepáticas foi incubada com glicose e butilmalonato (inibidor da lançadeira do malato-aspartato) em presença de oxigênio. Indicar, nesta suspensão de células:
 - o destino dos carbonos da glicose
 - a produção de ATP por glicose consumida
 - a alteração no consumo de oxigênio
 - a atividade do ciclo de Krebs.

11. Calcular o número de moles de ATP formado na transformação de um mol de α -cetoglutarato em fumarato por uma suspensão de mitocôndrias. Fazer o mesmo cálculo após a adição de:
- malonato
 - dinitrofenol
 - oligomicina
 - malonato + dinitrofenol
 - malonato + oligomicina.
12. Uma suspensão de mitocôndrias foi dialisada e incubada com 100 mmoles de acetil-CoA, 2 mmoles de oxaloacetato, 6 mmoles de NAD^+ , 50 mmoles de GDP, 20 mmoles de P_i e excesso de dinitrofenol. Supondo que as mitocôndrias sejam permeáveis a todas estas substâncias, determinar a concentração dos compostos presentes no final da reação.
13. Calcular o saldo de ATP na oxidação total de:
- glicose
 - ácido palmítico (16C)
 - Quais seriam os resultados na presença de dinitrofenol?
 - Qual o destino da energia não armazenada sob a forma de ATP?
14. Explicar por que há redução do consumo de glicose por células mantidas em aerobiose, em relação a células mantidas em anaerobiose. Levar em conta na explicação os mecanismos conhecidos de regulação metabólica.
15. Discutir o funcionamento do ciclo de Krebs, β -oxidação e via glicolítica em uma suspensão de células hepáticas na presença dos seguintes compostos:
- antimicina
 - oligomicina
 - dinitrofenol
 - antimicina + dinitrofenol
 - oligomicina + dinitrofenol.
16. Uma suspensão de mitocôndrias foi incubada em um meio apropriado e, ao longo do tempo, foram feitas sucessivas adições à suspensão. Os compostos, adicionados em excesso, estão representados pelas letras A, B, C, D, E e F. Medindo-se a concentração de oxigênio no meio, obtiveram-se os resultados apresentados no gráfico a seguir. Os compostos adicionados foram: rotenona, succinato, dinitrofenol, malato, oligomicina e antimicina A.



- b. Em experimento semelhante ao anterior, as mitocôndrias foram incubadas com malato e, a seguir, foram adicionados os compostos: ADP, lactato e antimicina, nesta ordem. Desenhar o gráfico aproximado que seria obtido.
- c. Em experimento semelhante aos anteriores, foram adicionados: P_i , DNP e oligomicina, nesta ordem. Desenhar o gráfico aproximado que seria obtido.

VIA DAS PENTOSSES-FOSFATO

1. Citar as funções da via das pentoses-fosfato.
2. Analisar a via das pentoses-fosfato quanto à produção de ATP.
3. Citar os compostos comuns à via das pentoses-fosfato e à via glicolítica.
4. Hemácias, adipócitos, hepatócitos e fibras musculares foram incubados com glicose marcada com carbono C^{14} , na presença e na ausência de altas concentrações de fluoreto (F^-), um potente inibidor de enolase. Mediu-se a produção de $C^{14}O_2$, indicada por (+) e a ausência de produção por (-), encontrando-se os resultados do quadro abaixo:

	Produção de $C^{14}O_2$	
	Sem F^-	Com F^-
Hemácias	+	+
Adipócitos	+++	+
Hepatócitos	+++	+
Fibras musculares	+++	-

- a. Indicar o processo de oxidação de glicose nos diferentes tipos de células.
 - b. Que composto celular sofre redução paralelamente à produção de $C^{14}O_2$?
5. Esquematizar as reações que levam à síntese de ribose 5-fosfato a partir de glicose em fibras musculares.
 6. Indicar que partes (oxidativa/não-oxidativa) da via das pentoses-fosfato seriam utilizadas quando da síntese de:
 - a. nucleotídeos
 - b. ácidos graxos
 - c. nucleotídeos + ácidos graxos.
 7. Discutir as condições em que haverá predomínio de uma das vias de metabolismo da glicose.
 8. Considere as seguintes afirmações, relacionadas ao metabolismo da glicose em hemácias.
 - A. A malária é uma moléstia endêmica na África, Ásia e em áreas mediterrâneas.
 - B. Nestas regiões, a incidência de portadores de um defeito genético caracterizado pela deficiência parcial de glicose 6-fosfato desidrogenase é muito alta.
 - C. A administração de primaquina, uma droga usada contra a malária, a estes indivíduos resulta em anemia hemolítica grave.
 - D. Agentes como a primaquina estimulam a produção de peróxidos.
 - E. Os peróxidos lesam as hemácias, por reagirem prontamente com as duplas ligações presentes em ácidos graxos da membrana celular.
 Indicar:
 - a. como as hemácias eliminam as quantidades normalmente produzidas de peróxidos
 - b. a relação deste processo com a reação catalisada por glicose 6-fosfato desidrogenase
 - c. por que indivíduos com deficiência parcial de glicose 6-fosfato desidrogenase são resistentes à malária.

METABOLISMO DO GLICOGÊNIO

1. Duas preparações de fígado de rato foram submetidas a diferentes tratamentos, para verificar as condições em que há degradação de glicogênio. Uma das preparações (A) continha células inteiras e outra (B), todo o conteúdo celular, com exceção da membrana plasmática. Os resultados encontram-se no quadro abaixo, onde o nível de degradação encontrado está simbolizado por (+) e a ausência de degradação por (-).

Tubo nº	Adições	A	B
1	—	—	—
2	Glucagon	++	—
3	X	—	++
4	Cafeína	—	—
5	Glucagon + cafeína	+++	—
6	X + cafeína	—	+++

Sabendo que a membrana plasmática é impermeável ao composto X, responder:

- a. Por que as duas preparações apresentam resultados diferentes quanto à degradação de glicogênio?
 - b. Sugerir qual é o composto X.
 - c. Qual é o modo de ação da cafeína?
2. Citar as enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio que são substrato da proteína quinase dependente de AMP cíclico. Descrever as conseqüências da fosforilação dessas enzimas.
 3. Descrever o metabolismo do glicogênio hepático e muscular ao longo do período de jejum noturno e após uma refeição rica em carboidratos.
 4. Descrever o metabolismo do glicogênio muscular em condições de exercício intenso.
 5. Indicar as conseqüências para o metabolismo de carboidratos decorrentes da deficiência de:
 - a. glicose 6-fosfatase
 - b. glicogênio fosforilase muscular
 - c. glicogênio fosforilase hepática
 - d. fosfofrutoquinase 1 muscular.
 6. Uma suspensão de células hepáticas e uma de fibras musculares foram tratadas com dibutilil-cAMP. Este composto pode substituir o cAMP em todas as reações e, ao contrário dele, passa facilmente pela membrana celular. Comente as alterações ocorridas em cada uma das preparações, com relação a:
 - a. proteína G, subunidades da proteína quinase e proteína inibidora da proteína fosfatase
 - b. frutose 1,6-bisfosfatase, fosfofrutoquinase 1, glicogênio fosforilase, glicogênio sintase e concentração de frutose 2,6-bisfosfato
 Quais seriam os efeitos do dibutilil-cAMP se, simultaneamente, fosse adicionada cafeína? E insulina?

FOTOSSÍNTESE

1. Analisar as seguintes afirmações:
 - a. A fotossíntese é o processo através do qual a energia luminosa é utilizada para sintetizar glicose a partir do CO₂ atmosférico.
 - b. A fotossíntese permite a produção de ATP e NADPH a partir da energia luminosa.
2. Mostrar por que as reações da chamada fase escura não ocorrem na ausência de luz.
3. Comparar fotossíntese com fotorrespiração.
4. Por que não ocorre fotorrespiração nas plantas tropicais?

OXIDAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS E ÁCIDOS GRAXOS

1. Uma série de experimentos, semelhantes aos realizados por Franz Knoop no início deste século, consistiram em alimentar cães com derivados de ácidos graxos saturados, sem ramificações, substituídos no último átomo de carbono (em relação à carboxila) por um grupo fenil. Na urina dos animais foi investigado o composto resultante do metabolismo dos ácidos graxos substituídos. Os resultados foram os seguintes:

Ácido graxo substituído	Número de átomos de carbono	Ácido presente na urina
Fenilpropiónico	3	benzóico
Fenilbutírico	4	fenilacético
Fenilvalérico	5	benzóico
Fenilpalmítico	16	fenilacético
Fenilsteárico	18	fenilacético
Fenil-lignocérico	24	fenilacético

- a. Por que os mamíferos não degradam (e, portanto, excretam) os ácidos benzóico e fenilacético?
 - b. O que têm em comum os ácidos graxos que originaram ácido benzóico e os que produziram ácido fenilacético?
 - c. Qual o destino dos átomos de carbono dos ácidos graxos que não apareceram na urina?
 - d. Em um sistema *in vitro*, durante a oxidação do ácido fenilvalérico pode-se detectar ácido fenilpropiónico no sistema, mas nunca ácido fenilbutírico. Justificar.
 - e. Relacionar os dados apresentados acima com o processo de oxidação dos ácidos graxos.
2. Uma doença genética que afeta o metabolismo de ácidos graxos provoca desde câibra muscular leve até fraqueza muscular grave e morte. No citossol das fibras musculares dos pacientes portadores desta moléstia são detectados acúmulos de acil-CoA e de ácidos graxos. Muitos casos da moléstia são tratados com êxito pela administração de um composto presente em mitocôndrias. Identificar este composto.
 3. A carnitina é um composto amplamente distribuído pelos diferentes tecidos mas encontrado em concentração elevada nos músculos. O que sugere este dado?
 4. Além de enzimas, que compostos são necessários para a conversão de palmitoil-CoA a 8 acetil-CoA pelo ciclo de Lynen?
 5. Escrever a equação geral da oxidação de ácido esteárico (18 carbonos) a acetil-CoA.
 6. Escrever a equação de conversão de glicerol a glicose. O glicerol pode ser oxidado no hepatócito?
 7. Comparar a oxidação de dois moles de glicose a acetil-CoA com a oxidação de um mol de ácido láurico (12 carbonos) a acetil-CoA quanto a:
 - a. número de moles de acetil-CoA formados
 - b. saldo de ATP
 - c. número de moles de NADH ou FADH₂ formados
 - d. vitaminas envolvidas
 - e. localização celular dos processos.
 8. Quais são as condições fisiológicas que determinam a ativação da lipase do tecido adiposo? Nas situações em que a lipase está ativa, descrever, em hepatócitos, a atividade da glicólise, gliconeogênese, via das pentoses-fosfato, ciclo de Krebs, síntese e degradação do glicogênio e do ciclo de Lynen. Nestas mesmas condições, quais são as principais fontes de energia para o tecido muscular?

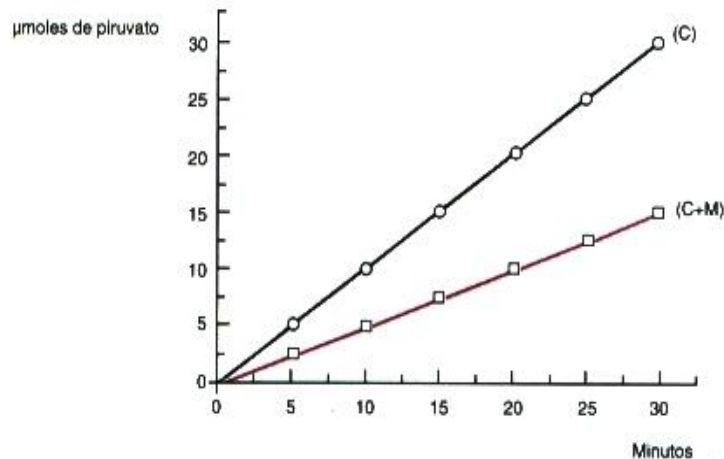
9. Verificar em quais das situações seguintes haverá estímulo da formação de corpos cetônicos:
 - a. dieta rica em carboidratos e normal em lipídios
 - b. jejum
 - c. dieta rica em lipídios e normal em carboidratos
 - d. diabetes.
10. Indicar em que condições fisiológicas o cérebro passa a oxidar, além de glicose, corpos cetônicos, e que enzimas devem ser sintetizadas pelo cérebro nesta adaptação metabólica.
11. Explicar por que a ingestão de doses elevadas de etanol provoca acidose lática.
12. Com base nas informações seguintes, comparar a sensibilidade das populações ocidental e oriental à ingestão de etanol.
 - a. A maior parte dos efeitos da embriaguez é provocada por níveis elevados de acetaldeído.
 - b. A álcool desidrogenase é uma enzima com estrutura quaternária. A subunidade β pode ser de dois tipos: β_1 e β_2 . Quando a subunidade é do tipo β_1 , o pH ótimo da enzima é 10; quando β_2 está presente, o pH ótimo é 8.
 - c. Há duas acetaldeído desidrogenases. Uma delas, presente na mitocôndria, tem baixo K_M ; a outra encontra-se no citossol e tem alto K_M .
 - d. Na população ocidental predomina a álcool desidrogenase com β_1 e na população oriental, com β_2 .
 - e. Grande parte da população oriental é desprovida de acetaldeído desidrogenase mitocondrial.

SÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS, TRIACILGLICERÓIS E COLESTEROL

1. Em 1940, Rittenberg e Bloch alimentaram ratos com acetato marcado com C^{13} e deutério e encontraram ambos os isótopos incorporados em ácidos graxos. Mais tarde, quando os cientistas fracionaram o conteúdo celular, verificaram que a fração capaz de oxidar ácidos graxos era incapaz de sintetizá-los. No final da década de 50, Wakil verificou que a fração celular capaz de sintetizar ácido graxo somente levava a cabo este processo quando era adicionado bicarbonato; entretanto, quando foi utilizado bicarbonato marcado com C^{14} , não apareceu radioatividade nos ácidos graxos sintetizados. Justificar esses resultados.
2. Citar os efeitos do citrato no citossol.
3. Escrever a equação de síntese de ácido palmítico (16 carbonos) a partir de acetil-CoA citoplasmática e de acetil-CoA mitocondrial.
4. Comparar a síntese e a oxidação de ácidos graxos quanto a:
 - a. compartimento celular em que se processam
 - b. coenzimas envolvidas e suas vitaminas
 - c. transportador de grupos acila
 - d. forma em que as unidades de dois carbonos são removidas ou adicionadas
 - e. saldo de ATP.
5. Descrever a regulação alostérica e por modificação covalente da síntese de ácidos graxos.
6. Indicar a atuação de malonil-CoA na degradação de ácidos graxos.
7. Em condições fisiológicas que acarretam a inibição de fosfofrutoquinase 1, como é possível a obtenção de glicerol 3-fosfato, necessário à síntese de triacilgliceróis?
8. Avaliar a eficácia da redução do teor de colesterol na dieta como uma conduta para diminuir o nível plasmático desse composto. Levar em conta a regulação da HMG-CoA redutase.

METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS

1. Citar as funções dos aminoácidos.
2. Esquematizar as reações necessárias para que o grupo amino da alanina seja liberado como NH_4^+ .
3. Esquematizar as reações necessárias para incorporar NH_4^+ como grupo amino do aspartato.
4. Ratos alimentados com dieta desprovida de aspartato e de alanina apresentam crescimento normal; quando a dieta não contém fenilalanina, desenvolvem-se sintomas de carência, que são revertidos pela adição de fenilpiruvato à dieta. Justificar.
5. Escrever as reações que levam à síntese de aspartato a partir de CO_2 , piruvato e NH_4^+ .
6. A partir de fígado de rato foram feitas duas preparações, uma contendo apenas o citossol (C) e outra, contendo o citossol e mitocôndrias (C+M). Ambas foram incubadas com altas concentrações de alanina e α -cetoglutarato, medindo-se o piruvato formado. Os resultados encontram-se no gráfico abaixo:



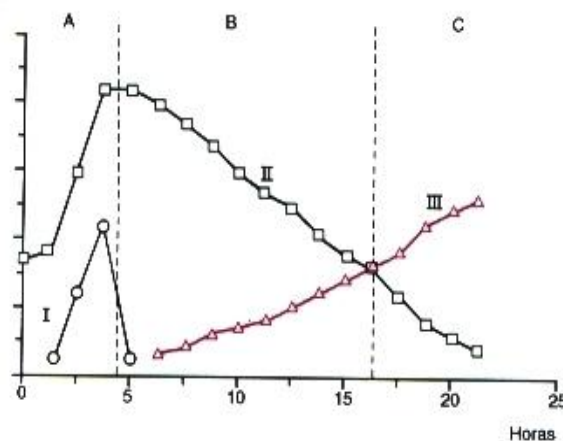
- a. Como podem ser interpretados esses resultados?
- b. Quais seriam os resultados esperados se a ambas as preparações houvesse sido adicionado:
 - b₁. dinitrofenol (desacoplador)?
 - b₂. cianeto (inibidor da cadeia de transporte de elétrons)?
7. Escrever a equação geral do ciclo da uréia.
8. Calcular o saldo de ATP do ciclo da uréia, considerando a regeneração de aspartato a partir de fumarato.
9. Verificar a veracidade da seguinte afirmação: quanto mais proteína for ingerida, maior é a quantidade de uréia que um indivíduo elimina.
10. A degradação dos aminoácidos inicia-se com a remoção do grupo amino, restando os respectivos α -cetoácidos. Indicar os destinos do grupo amino.
11. Analisar o destino da cadeia carbônica dos aminoácidos e o balanço de nitrogênio que ocorrem com as seguintes dietas:
 - a. normal em carboidratos, lipídios e proteínas
 - b. rica em proteínas e normal nos demais componentes
 - c. pobre em carboidratos e normal nos demais componentes

- d. pobre em proteínas e normal nos demais componentes
- e. rica em proteínas deficientes em um aminoácido essencial e normal nos demais componentes.

REGULAÇÃO INTEGRADA DO METABOLISMO; NUTRIÇÃO

1. Citar as vias de produção e de utilização de acetil-CoA pela célula.
2. Fazer um resumo dos efeitos do glucagon, adrenalina e insulina no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas no fígado, músculo e adiposo.
3. Segue-se uma lista de defeitos metabólicos hereditários hipotéticos que levariam à incapacidade de:
 - A. oxidar totalmente glicose e lipídios.
 - B. fazer gliconeogênese a partir de lactato.
 - C. utilizar glicose para obtenção de energia.
 - D. sintetizar diidroxiacetona a partir de lactato.Escolher, entre as enzimas alistadas a seguir, aquela cuja perda de atividade seria responsável por cada um daqueles defeitos:
 - a. fosfofrutoquinase 1
 - b. hidroxiacil-CoA desidrogenase
 - c. isocitrato desidrogenase
 - d. fosfoenolpiruvato carboxiquinase
 - e. glicose 6-fosfatase
 - f. fosfoglicomutase.
4. Descrever, com base em regulações hormonal e alostérica, os processos que levam ao acúmulo de lipídios a partir de uma dieta rica em carboidratos.
5. Um indivíduo adulto e normal, com uma dieta rica em carboidratos e lipídios, tem necessidade de ingestão proteica? Por quê?
6. As dietas vegetarianas são recomendáveis? Por quê?
7. Sabe-se que: o cérebro consome cerca de 120 g de glicose por dia; 100 g de proteína produzem 60 g de glicose; um indivíduo adulto tem cerca de 6 kg de proteína e a perda de metade do nitrogênio proteico é fatal. Em caso de jejum prolongado:
 - a. quantos gramas diários de proteína seriam consumidos para fornecer glicose ao cérebro?
 - b. por quanto tempo esta fonte de energia poderia ser usada?
 - c. como é possível a sobrevivência a um mês de jejum?
8. Descrever as alterações do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas provocadas por jejum prolongado e por diabetes.
9. Planejar a distribuição entre carboidratos, lipídios e proteínas de uma dieta normal e de uma dieta para emagrecimento, tendo em vista que:
 - a. a oxidação total de proteínas e carboidratos fornece 4 kcal/g (17 kJ/g), e a de lipídios, 9 kcal/g (38 kJ/g)
 - b. um adulto com atividade física moderada requer 100 g de proteínas + cerca de 2.500 kcal (10.460 kJ) por dia
 - c. o metabolismo basal de um adulto consome cerca de 1.800 kcal (7.530 kJ) por dia
 - d. é necessária uma ingestão mínima diária de 10 g de lipídios ricos em ácidos graxos poliinsaturados
 - e. é necessária uma ingestão mínima de 5 g de carboidratos para cada 100 kcal (418 kJ) ingeridas
 - f. nove aminoácidos são essenciais para o organismo humano.

10. Descrever as conseqüências metabólicas de uma dieta com valor calórico normal, mas contendo proteínas de baixo valor biológico.
11. Planejar uma dieta para a prevenção da aterosclerose.
12. O gráfico a seguir foi obtido medindo-se alguns parâmetros em tempos subsequentes à ingestão de uma refeição (tempo zero). Os valores de ordenadas são diferentes para cada curva. De **a** até **j**, verificar se a sentença é falsa ou verdadeira.
- A concentração citossólica de citrato é maior em B do que em A.
 - A concentração plasmática de HCO_3^- é maior em B do que em C.
 - Em C, a maior parte da glicose, aminoácidos e corpos cetônicos plasmáticos é originária do fígado.
 - A curva I pode representar a concentração de glicogênio hepático e a curva III, a utilização de corpos cetônicos pelo cérebro.
 - Em B ocorre oxidação de aminoácidos essenciais no fígado.
 - Em B a lipogênese é mais intensa que a lipólise no tecido adiposo.
 - Em C a atividade da proteína fosfatase I é maior do que a da proteína quinase dependente de cAMP.
 - A oxidação dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos pelo fígado é maior em C do que em B.
 - A maior atividade da carnitina acil transferase em hepatócitos é encontrada em A.
 - A curva II pode representar a atividade da via das pentoses.



13. Um indivíduo adulto recebeu, durante várias semanas, uma dieta com quantidades de carboidratos, lipídios e proteínas adequadas para seu peso, sexo, faixa etária e atividade física. Apesar da dieta conter também o suprimento correto de vitaminas e sais minerais, o indivíduo apresentou perda lenta e contínua de peso.
- Faça duas hipóteses explicativas deste quadro.
 - Escolha uma das hipóteses e descreva como estão, no fígado deste indivíduo, o ciclo de Krebs, a concentração de frutose 2,6-bisfosfato, a gliconeogênese, a síntese de glicogênio, a concentração de acetil-CoA e a síntese de ácidos graxos.
 - Para cada hipótese feita, analise o balanço de nitrogênio e a produção de corpos cetônicos.
 - Segundo as hipóteses formuladas, o caso poderia ser normalizado aumentando a ingestão de carboidratos e diminuindo a de lipídios?
14. Um indivíduo normal está ingerindo uma dieta rica em carboidratos e normal nos demais componentes. Comente o que acontece com cada um dos itens seguintes, comparando com uma dieta normal e justificando suas respostas.
- Excreção de uréia e excreção de corpos cetônicos.
 - Atividade de adenilato ciclase e piruvato carboxilase no fígado.
 - Atividade da acetil-CoA carboxilase, da via das pentoses, e intensidade da síntese de glicerol 3-fosfato no tecido adiposo.

ADAPTAÇÕES METABÓLICAS AO EXERCÍCIO

1. Analisar a contribuição das diferentes fontes de energia para sustentar a contração muscular durante uma maratona (42 km percorridos em cerca de 2 h por atletas olímpicos).
2. A dieta de um atleta deve ser diferente da dieta de um indivíduo com atividade física moderada? Por quê?
3. Fazer um resumo dos processos metabólicos regulados por cálcio.
4. Justificar a utilização de agonistas β -adrenérgicos para aliviar os sintomas de patologias relacionadas com contração de musculatura lisa.

ÍNDICE ALFABÉTICO

A

- Absorção de luz: fotossistemas, 181-184
- Ação hormonal, na regulação do metabolismo, 262-270
- Acetaldeído desidrogenase, 203
- Acetato, 203
- Acetil-CoA
 - ACP-transacilase, 207
 - aminoácidos convertidos a, 232, 233
 - carboxilase, 205
 - ciclo de Krebs, 131
 - conversão
 - de piruvato a, 128
 - no fígado, 201
 - degradação
 - da cadeia carbônica dos aminoácidos, 223
 - de aminoácidos, 217
 - e piruvato carboxilase, 287
- Acetoacetato, 201
- Acetaminofen, 210
- Acetona, 201
- Acicloguanosina, 86
- Acidemia isovalérica, 236
- Ácido(s)
 - araquidônico, 209
 - - síntese dos eicosanóides, 209, 210
 - ascórbico (vitamina C), 26
 - base conjugada do, 3
 - biliares, 214
 - bongcréquico, 157
 - definição de Brønsted, 3
 - esteárico, 94
 - fitânico, 200
 - fólico, 225
 - fortes, 3
 - fosfatídico, 97
 - fracos, 3
 - - constante de dissociação dos, 4
 - - variação de força ácida entre os, 6
 - graxos, 94-96
 - armazenamento de, 94
 - ativação dos, 195
 - essenciais, 208-210
 - - ingestão calórica, 250
 - insaturados naturais, 94
 - - oxidação de, 199
 - livres, 94
 - oxidação de, 195, 196
 - exercícios e problemas, 348, 349
 - ramificados ou hidroxilados, oxidação, 200
 - síntese de, 204
 - - atividade da acetil-CoA carboxilase para, 289
 - - temperatura de fusão, 94
 - transporte de, 195
 - lipóico, 129
 - nicotínico, 232
 - oleico, 94, 209
 - palmítico, 96
 - - oxidação do, 197, 198
 - - - rendimento energético, 198
 - - - palmitoleico, 209
- Acidose, 201
- Acil-CoA
 - desidrogenase, 142
 - sintetases, 195
- Aconitase, 86
- ciclo de Krebs, 131
- ACP (*acyl-carrier protein*), 207
- Actina, 306
- Açúcares, 91
- Acúmulo de citrato, 299
- Adaptações metabólicas ao exercício, 303-316
 - estrutura do músculo esquelético, 303-306
 - filamentos
 - finos, 306
 - grossos, 303-306
 - exercícios e problemas, 353
 - fontes de energia para o trabalho muscular, 309-314
 - atividade física regular, 313, 314
 - creatinina, 309
 - fadiga muscular, 312, 313
 - fosfocreatina, 309
 - glicólise anaeróbia, 309
 - íons Ca^{2+} , 312
 - oxidação aeróbia, 310
 - processos geradores de ATP, 311
 - mecanismo da contração muscular, 306-309
 - Ca^{2+} , 306
 - túbulos T, 306
 - músculos lisos, 315, 316
 - Ca^{2+} e cAMP na contração de, 315, 316
 - tipos de fibras musculares, 314, 315
 - suplementações nutricionais, 314, 315
 - Adenilato ciclase, 263
 - Adenina nucleotídeo translocase, 157
 - Adenosina
 - 3',5'-monofosfato, 263
 - difosfato, 114
 - trifosfato, 114
 - - acoplamento do transporte de elétrons à síntese de, 151
 - - mecanismo de síntese de, 150
 - - processo de obtenção de, 178
 - - volta dos prótons à matriz mitocondrial na síntese de, 149, 150
 - ADP (v. Adenosina difosfato)
 - Adrenalina, na regulação do metabolismo, 270, 271
 - Aerobiose, 126
 - Agarose
 - na cromatografia de afinidade, 34
 - na eletroforese em gel, 35
 - Agonistas, 271
 - Água
 - como agente redutor, 179
 - conexão com o NADP⁺, 187
 - metabólica, 146
 - Alanina, 13
 - aminotransferase, 173, 218
 - conversão, 224
 - curva de titulação da, 15
 - isômeros ópticos da, 13
 - inibição da piruvato quinase hepática, 284
 - ionização dos aminoácidos, 15
 - síntese da, 241
 - transaminase, 218
 - transporte de amônia para o fígado, 222
 - Albinismo, 236
 - Álcool desidrogenase, 63, 203
 - Aldolase, 123
 - Aldoses, 91
 - Alfa-hélice, 20
 - Alfa-oxidação, 201
 - de ácidos graxos ramificados ou hidroxilados, 200
 - Alfa-queratinas, 25
 - Alimentos, substâncias orgânicas dos, 115
 - Amido, 92
 - composição, 169
 - sintase, 169
 - síntese de, 169
 - Amilopectina, 169
 - Aminoácidos
 - ácidos, 13
 - apolares, 13
 - básicos, 13
 - componentes de proteínas, 11-14
 - convertidos a acetil-CoA, 232, 233
 - - leucina, 232
 - - lisina, 232
 - - - triptofano, 232
 - convertidos a alfa-cetoglutarato, 231
 - - arginina, 231
 - - glutamato, 231
 - - glutamina, 231
 - - histidina, 231
 - - prolina, 231
 - convertidos a fumarato, 226, 227
 - - aspartato, 227
 - - fenilalanina, 227
 - - tirosina, 227
 - convertidos a oxaloacetato, 226
 - - asparagina, 226
 - - aspartato, 226
 - convertidos a piruvato, 224-226
 - - alanina, 224
 - - cisteína, 224
 - - glicina, 225
 - - serina, 225
 - - treonina, 225
 - - triptofano, 226
 - convertidos a succinil-CoA, 228-230

- isoleucina e valina, 228
- metionina, 228
- treonina, 228
- curva de titulação, 15
- degradação de, 217-234
- grupo amino, 217-219
- desaminados por reações especiais, 219, 220
- dicarboxílicos, 16
- diferenças entre si, 11-13
- doenças hereditárias do metabolismo de, 234-237
- essenciais, 239
- e qualidade nutricional das proteínas, 245
- estrutura e classificação dos, 12
- exercícios e problemas, 332-335
- glicocetogênicos, 223, 232
- glicogênicos, 223
- gliconeogênese, 172
- glutamato e glutamina na síntese dos, 239
- grupo
 - amino, 11
 - carboxila, 11
 - ionização dos, 14-16
 - metabolismo de, 216-242
 - monoamínicos, 16
 - não-essenciais, 239
 - neutralidade em um valor de pH, 15, 16
 - nitrogênio dos, origem, 237, 238
 - pKa dos, 14
 - polares, 13
 - polímeros de, 16-19
 - ponto isoelétrico, 16
 - pool de, 217
 - ramificados, 228
 - resíduos de, 18
 - sem poder tamponante significativo, 16
 - síntese de, 237
 - substituição de, 31
 - utilização para a gliconeogênese, 176
 - variação da carga elétrica dos, 14, 15
- Aminotransferases, 217
- Amônia
 - grupos amino, 218, 219
 - toxicidade da, 222
 - transportadores de, 222, 223
- AMP cíclico (cAMP), 263
- Anabaena, 192
- Anaerobiose, 126
- Anemia falciforme, 31
- Ângina pectoris, 316
- Anidrase carbônica, 9
- Antagonistas, 271
- Antimetabólitos ou análogos de substratos, 86
- Apolipoproteínas, 102
- Arginina, 13
 - conversão, 231
 - do ciclo da uréia, 295
- Arteriosclerose, 294
- Ascorbato (vitamina C), 225
- Asma, 316
- Asparagina, 13
 - conversão, 226
 - síntese de, 240
 - sintetase, 240
- Aspartame, 18
- Aspartato
 - aminotransferase, 218
 - conversão, 226, 227
 - síntese do, 240
 - transaminase, 226
- Aspirina (ácido acetil-salicílico), 80, 210
- Ateromas, 294
- Aterosclerose, 293, 294
 - predisposição genética, 294
- Ativador alostérico, 259
- Atividade das enzimas, alteração da, 258-262
 - coenzimas, 260, 261
 - regulação
 - alostérica, 258-261
 - por modificação covalente, 261, 262
- ATP sintase, 147
 - esquema da, 149
- microesferas da membrana interna da mitocôndria, 148
- ATP/ADP translocase, 157
- Atractilósido, 157
- Azetidina 2-carboxilato, 86
- Azotobacter, 237
- AZT (3'-azido-2'-desoxitimidina), 82

B

- Bactérias
 - fotossíntese em, 192, 193
 - termofílicas, 30
- Bacterioclorofilas, 192
- Balanco de nitrogênio
 - *kwashiorkor*, 252
 - marasmo, 253
 - negativo, 244
 - no jejum, 301
 - positivo, 244
- Balanco energético da gliconeogênese, 175
- Bandas
 - A, 303
 - I, 303
- Beta-hidroxiobutirato, 201
- Beta-queratinas, 25
- Bicamada lipídica, 103
 - compostos polares, 104
 - consistência da, 105
 - grau de interação de proteínas com, 107
 - nas membranas biológicas, 105
- Biotina, 174, 198
 - carboxilação por, 232
 - síntese de ácidos graxos, 205
- Bongrek*, 157
- Brønsted, ácidos e bases de, 3, 4
- Butiril-ACP, 207

C

- Cadeia(s)
 - carbônica dos aminoácidos, degradação da, 223
 - da hemoglobina, 37
 - de transporte de elétrons, 137-146
 - bacterianas, 153, 154
 - citocromos, 143
 - complexos, 138
 - composição, 138
 - exercícios e problemas, 343
 - inibidores da, 151
 - variações quanto aos componentes da, 154
 - lateral ou grupo R, 13
 - polipeptídica, 18
- Caféina, 266
- Calmodulina, 268
- Camada de solvatação, 24
- Canavanina, 86
- Carbamoilfosfato sintetase, 295
- Carboidrato(s), 91
 - estrutura de, 91-94
 - funções dos, 94
 - mais abundantes, 94
- Cardiolipinas, 97
- Carnitina, 195, 290
 - acil-transferase, 195
- Carotenos, 181
- Cascata
 - de proteína quinase, 272
 - enzimática, 276
- Catalisador(es), 60, 62
- Catarata, por acúmulo de galactitol, 171
- Catecolaminas, 263
- Cefalina, 97
- Células
 - alvo, 262
 - da bainha, 191
 - do mesófilo, 191
- Celulose, 92, 250
- Centro(s)
 - ativo, 65
 - de reação, 183
 - ferro-enxofre, 140
 - ou sítio alostérico, 259
- Ceramida, 97
- Cerebrosídeos, 97
- Cetogênese, 201
- Cetonemia, 201
- Cetomúria, 201
- Cetose(s), 91, 201
- Chaperoninas, 31
- Chlorobium*, 192
- Chloroflexus*, 192
- Ciclo
 - da uréia, 220, 221
 - regulação, 295
 - de Calvin, 188, 189
- equação geral do, 188
- regulação do, 189, 190
- de Krebs, 120, 131-135
 - atividade da piruvato carboxilase, 134
 - equação geral do, 133
 - exercícios e problemas, 342, 343
 - função anabólica do, 133, 134
 - intermediários do, 217
 - reações do, 131-133
 - regulação do, 286, 287
 - atividade da citrato sintase, 287
 - destino metabólico do citrato, 287
- de Krebs-Henseleit, 220
- de Lynen, 140, 196, 197
- do glioxilato, 134, 135
- síntese de glicose a partir de acetil-CoA, 134
- do nitrogênio, 238
- Q, 144
- Cisteína, 13
 - síntese da, 241
- Citocromo(s)
 - a, 143
 - b, 143
 - b₂, 209
 - c, 107, 143
 - oxidase, 144
 - transferência de elétrons da coenzima Q, 144
- Citosina arabinosídeo, 86
- Citrato, 283
 - acúmulo de, 299
 - destino metabólico do, 287
 - liase, 204, 289
 - sintase, 131, 287
- Clatrina, 109
- Clorofilas, 181
- Cloroplastos, 181
- Coenzima(s), 87
 - A, 129
 - no ciclo de Krebs, 133
 - oxidação de, 136
 - Q ou ubiquinona, 141
 - regulação alostérica, 260, 261
- Cofatores, 87
- Colágeno, 25
- Colesterol, 99
 - concentração intracelular de, 293
 - distribuição e remoção de, 291, 292
 - e arteriosclerose, 100
 - e aterosclerose, 293, 294
 - ésteres de, 99
 - estrutura do, 100
 - etapas da síntese de, 213
 - função, 99
 - metabolismo do, 212-215
 - regulação, 291-295
 - nas membranas eucarióticas, 106
 - necessidade do, 214
 - transporte de, 99
 - no interior das LDL, 109, 110
- Colina, 97
- Complexo
 - enzima-substrato, 67
 - piruvato desidrogenase, 129
 - regulação do, 286
- Compostos organofosforados, 80
- Concanavalina A, 22
- Concentração
 - de enzimas, alteração, 258
 - de substrato saturante, 70
- Constante
 - de dissociação ou de ionização, 4
 - de Michaelis-Menten, 71
- Controle respiratório ou controle do aceptor, 288
- Cooperatividade, 40
- Corpos cetônicos, 201, 202
 - e jejum, 301
 - metabolismo do colesterol, 212
- Corticosteróides, 215
 - inibição da fosfolipase, 210
- Cortisol, 270
 - na síntese de eicosanóides, 215
- Creatinina, 309
- Cromatóforos, 192
- Cromatografia
 - de exclusão (filtração em gel), 32, 33
 - em coluna, 32
- Curva
 - hiperbólica, 258
 - sigmóide, 258

D

- Deficiência genética de glicose 6-fosfato desidrogenase, 163
- vantagem, 163
- Degradação
 - de ácidos graxos, 195-201
 - de proteínas e gliconeogênese, 176, 177
 - de triacilgliceróis, 194, 195
 - do glicogênio, 164
- Depressões revestidas, 109
- Desacopladores, 152
 - e fosforilação no nível do substrato, 153
- Desidrogenases, 160
- Desnaturação de proteínas, 30, 31
- Desnutrição, 251-253
 - *kwashiorkor*, 252
 - marasmo, 252
 - proteica crônica, 252
- Desoxi-hemoglobina, 39
- Dessaturases, 209
- Dextrana, 32
- Diabetes
 - da maturidade, 274
 - insulino-dependente, 274
 - insulino-independente, 273
 - juvenil, 274
 - *mellitus*, 274
- Diacilglicerol, 211
- Diálise, 33
- Dicarbóxilato translocase, 158
- Dienoil-CoA redutase, 200
- Difosfatidilgliceróis, 97
- Digestibilidade, 245
- Diidrolipol
 - desidrogenase, 129
 - transacetilase, 129
- Diidropteridina redutase, 235
- Diminuição da relação insulina/glucagon, 299
- Dioxigenases, 232
- Dispendio de energia, na ingestão calórica, 248, 249
- Dissacarídeos, 92
- Dissulfeto, ponte, 24
- Doenças hereditárias do metabolismo de aminoácidos, 234-237
- Domínios, 25
- Dosagem de uma enzima, 72-75
 - atividade, 73
 - Unidade Internacional, 73

E

- Efeito
 - Bohr, 46
 - complementar das proteínas, 248
- Efetadores ou moduladores alostéricos
 - negativos, 259
 - positivos, 259
- Eicosanóides, 209
- Eletroforese, 35, 36
 - em gel, 35
 - em papel, 35
- Elétrons
 - absorção de luz resultando em emissão de, 282
 - bloqueio da transferência de, 151
 - cadeia de transporte de, 137-146
 - inibidores, 151
 - ocorrência do transporte de, sem a síntese de ATP, 152
 - transporte de, e a síntese de ATP, 151
- Elevação da relação insulina/glucagon, 297
- Encefalinas, 18
- Endocitose
 - adsorção, 109
 - mediada pelo receptor, 109
 - transporte por, 109
- Endossomos, 109
- Energia de ativação, 60
 - diminuição da, 61
- Enoil
 - ACP redutase, 207
 - CoA isomerase, 200
- Enolase, 125
- Enzimas, 59-88
 - ação catalítica, 60
 - alostéricas, 258
 - antimetabólitos ou análogos de substratos, 86
 - atividade específica, 73
 - atuação das, na cinética das reações, 60-63
 - centro ativo, 65
 - cinética, 67-75
 - complexo enzima-substrato, 67
 - tempo inicial, 70
 - velocidade
 - inicial, 67, 70
 - proporcional, 70
 - classificação e nomenclatura das, 63
 - coenzimas, 87
 - cofatores, 87
 - constante
 - catalítica, 78
 - de Michaelis-Menten, 71
 - de condensação, 207
 - desramificadora, 165
 - dosagem de, 72, 73
 - e perfeição catalítica, 78, 79
 - exercícios e problemas, 336-340
 - fatores que interferem na atividade das, 66, 67
 - características do meio, 66
 - pH ótimo, 66
 - temperatura, 66
 - inibidores, 79-88
 - K_m e afinidade da enzima pelo substrato, 77
 - ligação com o substrato, 65
 - especificidade, 65
 - michaelianas, 68
 - multifuncional, 207
 - número de renovação, 79
 - pesos moleculares, 65
 - propriedades, 63
 - proteolíticas, 65
 - ramificadora, 167
 - regulação da concentração das, 285
 - reguladoras, 258
 - resultados de exames laboratoriais de dosagens enzimáticas no plasma, 74
 - transformação de Lineweaver-Burk, 77, 78
 - Unidade Internacional, 73
 - zimogênicos, 86
 - Epimerase, 160
 - Epinefrina, 270
 - Equação
 - de Henderson-Hasselbalch, 7
 - de Michaelis-Menten, 75
 - na presença do inibidor competitivo, 82
 - Equilíbrio
 - energético, 248
 - nitrogenado, 244
 - Escherichia coli*, 59
 - multiplicação da, 88
 - Escorbuto, 26
 - Esfingolipídios, 97, 99
 - Esfingomielinas, 97
 - Esfingosina, 97
 - Esqualeno, 212
 - Estado de transição, 60
 - Esteróides, 99, 100
 - anabolizantes, 215
 - colesterol, 99
 - Estômatos, 192
 - Estratégias de regulação do metabolismo, 257-274
 - Estrógenos, 215
 - Estroma, 181
 - Estrutura das proteínas, 19-25
 - domínios, 25
 - níveis, 20-24
 - seqüência de aminoácidos, 19
 - Etanol
 - metabolismo do, 203
 - oxidação do, 203
 - Etanolamina, 97
 - ETF-ubiquinona óxido-redutase, 142
 - Excitose, no transporte através de membranas, 109
 - Extrato celular, 31

F

- FAD (v. Flavina adenina dinucleotídico)
- Fadiga muscular, 312
- Fator de acoplamento, 148
- Fenilalanina, 13
 - conversão, 227
 - hidroxilase, 227
 - ausência de, 235
- Fenilbutazona, 210
- Fenilketonúria, 235

- Fenilpiruvato, 235
- Feofitinas, 184
- Fermentação, 127
- Ferredoxina, 186
 - NADP⁺ óxido-redutase, 186
 - tioredoxina redutase, 190
- Fibras musculares, 314, 315
 - lentas ou vermelhas, 314
 - distribuição de, 314
 - rápidas ou brancas, 314
 - distribuição de, 314
- Ficobilinas, 181
- Fígado, na gliconeogênese, 173
- Filamentos
 - finos, 303, 306
 - actina, 306
 - tropomiosina, 306
 - troponina, 306
 - grossos, 303-306
 - miosina, 303-306
- Filoquinona, 186
- Filtração em gel, 33
- Fitol, 200
- Fixação de nitrogênio, 237
- Flavina
 - adenina dinucleotídico, 121, 129
 - mononucleotídico, 139
 - doador de elétrons para a redução de, 140
- Flavoproteína transferidora de elétrons, 142
- Fluoroacetato, 86
- Fontes de energia para o trabalho muscular, 309-314
 - atividade física regular, 313, 314
 - creatinina, 309
 - fadiga muscular, 312, 313
 - fosfocreatina, 309
 - glicólise anaeróbia, 309
 - íons Ca²⁺, 312
 - oxidação aeróbia, 310
 - processos geradores de ATP, 311
 - força próton-motriz, 146
- Fosfatato, 97, 211
- Fosfatidilcolina, 97
- Fosfatidiletanolamina, 97
- Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, 268
- Fosfato
 - inorgânico, 114
 - translocase, 158
- Fosfocreatina, 309
- Fosfodiesterase, 263
- Fosfoenolpiruvato, 283
 - carboxilase, 191
 - carboxiquinase, 173
- Fosfofrutoquinase, 123
 - inibidores alostéricos da, 281
 - regulação da glicólise, 281
 - AMP, 281, 282
 - frutose 2,6-bisfosfato, 282
- Fosfoglicerato
 - desidrogenase, 241
 - mutase, 125
 - quinase, 125
- Fosfoglicoisomerase, 123
- Fosfoglicomutase, 166
- Fosfolipase C, 268
- Fosfolipídios, 97
 - como componentes das membranas, 105, 106
- Fosfopantetina, 207
- Fosfoproteína fosfatase, 262
- Fosforilação
 - no nível do substrato, 153
 - oxidativa, 137, 146
 - energia derivada do transporte de elétrons, 146-148
- Fosforilcolina, 97
- Fosfoserina
 - fosfatase, 241
 - transaminase, 241
- Fotofosforilação, 187
 - cíclica, 187
- Fótons, 182
- Fotorrespiração, 190
 - e plantas C₄, 190-192
 - em contraposição à fotossíntese, 190, 191
- Fotossíntese, 178-193
 - absorção de luz: fotossistemas, 181-184
 - emissão de elétrons, 182, 183
 - pigmentos receptores de luz organizados em fotossistemas, 183, 184
 - carotenos, 181
 - clorofilas, 181

- cloroplastos, 181
- em bactérias, 192, 193
- - produção de ATP, 192
- em vegetais, 184-187
- - fase
- - - clara, 184
- - - escura, 184
- - síntese de ATP, 187
- - transporte de elétrons, 186, 187
- equação geral da, 178
- estroma, 181
- exercícios, 347
- ficobilinas, 181
- fotorrespiração e plantas C_4 , 190-192
- plantas tropicais, 191
- grana, 181
- membrana tilacóide, 181
- não-oxigênica, 187
- - de bactérias púrpuras, fluxo cíclico de elétrons na, 193
- ocorrência em organelas especiais, 181
- oxigênica, 184
- radiação utilizada pela, 183
- regulação do ciclo de Calvin, 189, 190
- síntese de glicose a partir de CO_2 , 188, 189
- - fixação de CO_2 , 188
- *versus* oxidação da glicose, 178-180
- utilização da água como agente redutor, 179, 180
- xantofilas, 181
- Fotossistemas, 183
- organização de pigmentos receptores de luz em, 183, 184
- - centro de reação, 183
- - moléculas-antena, 183
- - par especial, 183
- tipos de, 184
- Fotoróicos, 113
- Fracionamento celular, 32
- Frutose, 170
- 1,6-bisfosfatase, 174
- 2,6-bisfosfato, 282
- - produção de, 282, 283
- Fumarase, 131
- Fumarato, aminoácidos convertidos a, 226, 227

G

- Galactose
- 1-fosfato uridil transferase, deficiência de, 171
- metabolismo anormal da, 171
- Galactosemia, 171
- Gangliosídeos, 97
- GDP, 131 (v. Guanosina difosfato)
- Gelatina, 25
- Glicemia, 27, 164
- Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 123, 188
- Glicerofosfolípidios, 97, 98
- nas membranas celulares, 106
- Glicerol, 172
- 3-fosfato desidrogenase, 142
- - oxidação do NADH citossólico, 155
- quinase, 195
- Glicina, 13
- conversão, 225
- síntese da, 241
- Glicocolato, estrutura do, 214
- Glicogenina, 167
- Glicogênio, 92
- conversão do, 164
- degradação do, 164-166, 168
- - no músculo cardíaco, 283, 284
- doenças hereditárias do metabolismo do, 167, 168
- estrutura do, 93
- extremidade(s)
- - não-redutoras, 94
- - redutora, 94
- fosforilase, 164, 275
- - quinase, 276
- hepático e muscular, semelhança na regulação do metabolismo, 279, 280
- metabolismo do, 164-168
- - regulação, 275-280
- muscular, síntese do, 277, 278
- síntese, 63, 166, 277
- síntese de, 166, 167
- - intervenção da insulina, 279
- Glicolípidios, 97, 108
- Glicólise, 119-127
- anaeróbia, 126, 309, 311

- conversão de piruvato, 126
- fosfofrutoquinase na regulação da, 281
- fosforilação(ões), 122-125
- - da glicose no controle da, 280
- NADH, 126
- oxidação de glicose a piruvato, 121-127
- regulação da, 280
- rendimento da, 127
- Gliconeogênese, 172-177
- balanço energético da, 175, 176
- degradação de proteínas e, 176, 177
- e jejum, 301
- esquema simplificado da, 176
- fonte de energia para diferentes tecidos, 172
- origem da glicose circulante em animais superiores, 172, 173
- reações da, 173-175
- regulação da, 280
- relação entre diferentes órgãos na, 173
- Glicoproteínas, 108
- Glicocinase, 123, 280
- Glicose, 119
- conversão de, 119
- etapas fundamentais da, 123
- fotossíntese *versus* oxidação da, 178
- oxidação completa da, 119, 120
- rendimento da oxidação da, 154
- - quantidade total de ATP, 154
- utilização, 119
- via, 124
- Glicosil transferase, 167
- Glioxilato, ciclo do, 134, 135
- Glioxissomos, 134, 196
- Glucagon
- efeitos metabólicos, 271, 272
- estrutura primária, 271
- liberação de, 271
- no jejum, 291, 301
- síntese, 271
- Glutamato
- conversão, 231
- desidrogenase, 219
- síntese do, 239
- translocase, 158
- Glutamina, 13
- conversão, 231
- síntese da, 240
- sintetase, 222
- transporte de amônia para o fígado, 222
- Glutaminase, 223
- Glutationa, 18, 162
- peroxidase, 163
- redutase, 163
- Gorduras animais, 97
- Gradiente
- de prótons, 137, 146
- elétrico, 146
- Gramicidina, 18
- Grana, 181
- Grupo(s)
- amino, 11
- - aspartato e/ou amônia originados pelo, 218
- - coletado inicialmente como glutamato, 217
- - conversão em uréia, 220
- - remoção do, 217-223
- carboxila, 11
- peptídico, 17
- proatéticos, 26
- R, 13
- GTP (v. Guanosina trifosfato)
- Guanosina
- difosfato, 131
- trifosfato, 131

H

- Hb
- Bibba, 48
- Boston, 48
- Hammersmith, 48
- Kansas, 48
- Kempsey, 48
- Yakima, 48
- HDL (*high density lipoproteins*), 102
- Heat shock protein*, 31
- Hemácias, na ligação do oxigênio a hemoglobina, 43
- Heme, 26, 38
- Hemoglobina(s), 24

- A, 31
- alterações na conformação da, 39
- anormais, 47, 48
- cadeias da, 37, 38
- efeito da, 37
- estrutura da, 37, 38
- exercícios e problemas, 335, 336
- fatores que interferem na ligação com oxigênio, 43-46
- - composto das hemácias, 43, 44
- - dependência do pH: efeito Bohr, 45, 46
- fetal, 46, 47
- glicosilada, 27
- mecanismo da ligação do oxigênio à, 38-43
- - cooperatividade, 40
- - grupo prostético heme, 38, 39
- - mutantes, 48
- na ionização dos aminoácidos, 16
- S, 31
- - na anemia falciforme, 48
- Hemoglobinopatias, 48
- Henderson-Hasselbalch, equação de, 7
- Hexoquinase, 123
- fosforilação da glicose, 280
- Hidrocortisona, 215
- Hidrogênio, pontes de, 20
- Hidroxiacetilglutaril-CoA sintase, 212
- Hiperamonemia, 236
- Hipercolesterolemia familiar, 293
- Hiperoxalúrias, 225
- Hipoglicemia
- crônica, 252
- liberação de glucagon, 271
- Histidina, 13
- conversão, 231
- distal, 39
- proximal, 39
- HMG-CoA redutase, 212
- regulação da síntese de colesterol, 293
- Hormônios
- esteróides, 263
- na regulação do metabolismo, 262-270
- peptídicos, 263
- receptores dos, localização, 263
- sexuais, 215
- tireóideos, 263

I

- IDL (*intermediate density lipoproteins*), 102
- Indometacina, 210
- Ingestão calórica, 248-251
- ácidos graxos essenciais fornecidos pelos lipídios, 250, 251
- contribuição dos alimentos para a, 249
- dispêndio de energia, 248, 249
- quantidade de carboidratos, 250
- Inibição por *feedback* ou retroinibição, 260
- Inibidor(es)
- alostérico, 259
- competitivos, 81
- - emprego dos, 83
- enzimáticos, 79-88
- irreversíveis, 80
- não-competitivos, 82
- reversíveis, 80
- Inositol 1,4,5-trifosfato, 268
- Insulina
- efeitos metabólicos de, 272
- interferência da, 273
- liberação, 271
- na síntese de lipídios, 290
- níveis altos de, 272
- no controle do nível de enzimas, 291
- produção deficiente de, 274
- proteína quinase dependente de, 279
- receptor da, 272
- transporte de glicose pela, 273, 274
- Interação(ões)
- entre lipídios anfipáticos, 103-105
- enzima-substrato, 65
- hidrofóbicas, 24
- Intermediários do ciclo de Krebs, 217
- degradação da cadeia carbônica dos aminoácidos, 223
- Introdução ao metabolismo, 113-118
- exercícios e problemas, 340, 341
- Iodoacetamida, 80
- Ionização dos aminoácidos, 14-16
- Íons metálicos, 87

Isocitrato
 - desidrogenase, 131, 287
 - liase, 134
 Isoleucina, 13, 228
 Isomerase, 160
 Isopentenil-pirofosfato, 212
 Isovaleril-CoA desidrogenase, 236

K

Krebs, ciclo de, 120, 131-135
 Kwashiorkor, 252

L

L-aminosidases, 65
 Lactase, 169
 Lactato, 172
 - desidrogenase, 282
 - origem do, 173
 Lactonase, 160
 Lactose, 92
 - metabolismo de, 169
 Lançadeira
 - do glicerol-fosfato, 155, 156
 - do malato-aspartato, 155, 156
 LDL (v. Lipoproteínas de baixa densidade)
 Lecitina, 97
 Leghemoglobina, 238
 Lei de Planck, 182
 Leucina, 13
 - conversão, 232
 Leucotrienos, 209
 Ligação(ões)
 - anidrido fosfórico, 123
 - eletrostáticas ou iônicas, 24
 - éster fosfato, 125
 - fosfoenol, 125
 - peptídica, 16
 Ligante, na cromatografia de afinidade, 34
 Linhas Z, 303
 Lipase
 - degradação de triacilgliceróis, 194
 - lipoproteica, 195
 Lipídios, 94
 - anfipáticos como componentes estruturais de membranas, 100
 - compostos anfipáticos (ou anfifílicos), 94
 - estrutura de, 94-102
 - ácidos graxos, 94-96
 - esfingolipídios, 97
 - esteróides, 99, 100
 - glicerofosfolipídios, 97, 98
 - triacilgliceróis, 96, 97
 - mais comuns, funções, 100
 - metabolismo de, 194-215
 - transporte de, 100
 Lipoproteínas
 - de baixa densidade, 102
 - plasmáticas, 100
 - composição das, 101
 - distribuição e remoção de colesterol, 291, 292
 - esquema geral das, 101
 Lipossomos, 104
 Lisina, 13
 - conversão, 232
 Lisozima, 23
 Lynen, ciclo de, 140, 196, 197

M

Macronutrientes, 115
 Malária, 48
 Malato
 - desidrogenase, 131, 155, 205
 - sintase, 134
 Malonato, 82
 Malonil-CoA-ACP transacilase, 207
 Maple syrup urine disease, 236
 Marasmo, 252
 Mecanismo da contração muscular, 306-309
 Melanina, 236
 Membrana(s), 103-110
 - bicamada lipídica, 103
 - biológicas, 103
 - estrutura, 105-108
 - fluidez das, 106, 108

- de bactérias, 106
 - interações entre lipídios anfipáticos, 103-105
 - mitocondriais, 106
 - monocamadas, 106
 - plasmática, 103
 - - glicoproteínas e glicolipídios da, 108
 - tilacóide, 181
 - transporte, 109, 110
 - - ativo, 109
 - - facilitado ou passivo, 109
 - - íons e moléculas pequenas, 109
 - - macromoléculas e partículas, 109, 110
 - - permeases ou translocases, 109
 Mesófilo, 191
 Meta-hemoglobina, 48
 Metabolismo, 113-118
 - basal, 248
 - compostos químicos, 115
 - de aminoácidos, 216-242
 - - exercícios e problemas, 350, 351
 - de carboidratos, 116, 119-130
 - de lipídios, 116, 194-215
 - de proteínas, 116
 - de sacarose e lactose, 169-171
 - do colesterol, 212-215
 - do etanol, 203
 - do glicogênio, 164-168
 - - exercícios e problemas, 347
 - estratégias de regulação do, 257-274
 - - ação hormonal, 262-270
 - - adrenalina, glucagon e insulina, 270-274
 - - alteração
 - - - da atividade das enzimas, 258-262
 - - - da concentração de enzimas, 258
 - exercícios e problemas, 341, 342
 - lipídios, 115
 - meio ambiente, 113-115
 - regulação do, 257
 - - steady-state, 113
 Metionina, 13
 - conversão, 228
 Métodos de purificação de proteínas, 32-36
 - cromatografia
 - - de afinidade, 34
 - - de troca iônica, 34
 - - em coluna, 32
 - - por filtração em gel, 32, 33
 - eletroforese, 35, 36
 Mevalonato, 212
 Micelas, 103
 Michaelis-Menten
 - constante de, 71
 - equação de, 75
 Micronutrientes, 253
 Miofibrilas, 303
 Mioglobina, 22
 - curva de oxigenação, 43
 Miosina, 303-306
 - cabeças da, 303, 304
 - cauda da, 303
 - quinase, 315
 Mitchell, teoria quimiosmótica de, 146
 Moléculas-antena, 183
 Moléstia
 - da urina em xarope de bordo, 236
 - de Refsum, 201
 Monocilgliceróis, 96
 Monossacarídeos, 91
 Monooxigenase (ou hidroxilase), 232
 Morfogênese, 108
 Mosaico fluido, 107
 Músculo(s)
 - esquelético, estrutura, 303-306
 - lisos, 315, 316
 - - regulação da contração de, 315, 316

N

N-acetilglutamato, 295
N-etil-maleimida, 158
 NAD⁺ (v. Nicotinamida adenina dinucleotídeo)
 NADH
 - coenzima Q redutase, 139
 - reoxidação do, 126
 NADPH (v. Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato)
 Nicotinamida adenina dinucleotídeo, 121, 129
 - fosfato, 159
 - - como reservatório de poder redutor, 162, 163

- - em associação com a glutatona, 162, 163
Nitrobacter, 238
 Nitrogenase, 237
 Nitrogênio
 - balanço de, 244
 - dos aminoácidos, origem, 237, 238
 - excreção de, 244
Nitrosomonas, 238
 Noradrenalina, 270
 Norepinefrina, 270
 NPU (*Net Protein Utilization*), 247
 - e ingestão proteica mínima, 247, 248
 - valores de, 247
 Nucleosídeo difosfato quinase, 131
 - síntese de glicogênio, 166
 Número de renovação (*turnover number*), 79
 Nutrição proteica, 243-248
 - balanço de nitrogênio, 244
 - quantidades recomendadas de proteína na dieta, 247, 248
 - valor nutricional das proteínas, 244-247
 Nutrientes
 - flutuações na oferta de, 296
 - inorgânicos ou minerais, 253

O

Obesidade, 249
 - níveis altos de insulina, 273
 Objetivos para estudo, 319-330
 - adaptações metabólicas ao exercício, 329, 330
 - aminoácidos e proteínas, 319, 320
 - cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, 324, 325
 - ciclo de Krebs, 324
 - enzimas, 321, 322
 - estrutura de carboidratos e lipídios, 322
 - fotossíntese, 326, 327
 - hemoglobina, 320, 321
 - membranas, 322
 - metabolismo, 322-324
 - - de aminoácidos, 328, 329
 - - do colesterol, 328
 - - do glicogênio, 325, 326
 - oxidação de triacilgliceróis e ácidos graxos, 327
 - síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis, 327, 328
 - sistema-tampão, 319
 - substratos das vias metabólicas, 329
 - via das pentoses-fosfato, 325
 OEC (*oxygen-evolving complex*), 184
 Óleos vegetais, 97
 Oligomícina, 149
 - inibição da síntese de ATP, 152
 Oligossacarídeos, 92
 Organismos
 - autotróficos, 178
 - fototróficos, 113, 178
 - heterotróficos, 178
 - quimiolitotróficos, 113
 - quimiorganotróficos, 113
 - quimiotróficos, 113, 178
 Origem da glicose circulante em animais superiores, 172, 173
 - fonte de energia para diferentes tecidos, 172
Oscillatoria, 192
 Ovalbumina, 245
 Oxaloacetato
 - aminoácidos convertidos a, 226
 - na atividade da citrato sintase, 287
 - no ciclo de Krebs, 134
 Oxi-hemoglobina, 39
 Oxidação
 - aeróbia, 310, 311
 - da glicose, rendimento, 154
 - de coenzimas, 136
 - - liberação de energia, 137
 - do NADH citossólico, 155, 156
 - - lançadeira
 - - - do glicerol fosfato, 155
 - - - do malato-aspartato, 155
 Oxido-redutase, 63
 Oxigenação deficitária dos tecidos, 44
 Oxigênio
 - efeito do pH sobre a saturação da hemoglobina com, 45
 - mecanismo da ligação do, à hemoglobina, 38-43
 - - alterações, 39, 40
 - - cooperatividade, 40
 - - fatores de interferência, 43-46

- grupo prostético heme, 38, 39
- recebimento contínuo de, 37
- Oxitocina, 18

P

- Palmitoil
 - ACP, 207
 - CoA, 289
- Par especial, 183
- Patologia molecular, 48
- Penicilina, 80
- Pepsina, 63
 - na interação enzima-substrato, 65
 - síntese da, 86
- Pepsinogênio, 86
- Peptídios, 18
- Permeases
 - cotransportadoras, 109
 - transporte de, 109
 - uniportadoras, 109
- Peroxisomos, 196
- Piridoxal fosfato, 164
 - degradação de aminoácidos, 217, 218
- Piridoxamina, 217
- Piridoxina, 217
- Pirofosfatase, 166
- Piruvato
 - aminoácidos que são convertidos a, 224
 - carboxilase, 133
 - reações da gliconeogênese, 173
 - regulação do ciclo de Krebs, 134, 287
 - conversão a acetil-CoA, 128
 - degradação
 - de aminoácidos, 217
 - cadeia carbônica, 223
 - descarboxilação do, 120
 - descarboxilase, 127
 - desidrogenase, 129
 - fosfatase, 286
 - quinase, 286
 - fosfato diquinase, 192
 - oxidação do, 119
 - quinase, 125, 173
 - estimulada por frutose 1,6-bisfosfato, 284
 - translocase, 158
 - Planck, lei de, 182
 - Plantas
 - C₃, 191
 - C₄, 191
 - Plasmodium falciparum*, 163
 - Plastocianina, 184, 185
 - Plastoquinona
 - A, 184
 - estrutura da, 185
 - B, 184
 - Poliacrilamida, na eletroforese em gel, 35
 - Polímero(s)
 - dipeptídico, 18
 - oligopeptídico, 18
 - polipeptídico, 18
 - tripeptídico, 18
 - Poliassacarídeos, 92
 - Ponte(s)
 - cruzadas, 306
 - de hidrogênio, 20, 23
 - dissulfeto, 24
 - Ponto isoelétrico, 16, 27
 - Primaquina, 163
 - Processos geradores de ATP, 311
 - Progestinas, 215
 - Prolina, 11, 13
 - conversão, 231
 - síntese da, 240
 - Propionil-CoA, 198
 - Prostacilinas, 209
 - Prostaglandinas, 80, 209
 - Proteína(s)
 - ácidas, 28
 - alimentos de origem animal com alto teor de, 244, 245
 - alterações estruturais das, 30, 31
 - aminoácidos componentes de, 11-14
 - básicas, 28
 - carga elétrica das, 27
 - carregadora de acila, 207
 - com ferro não-hérmico, 140
 - conjugadas, 26
 - degradação de, 176

- desfosforilação de, 273
- desnaturada, 30
- efeito complementar das, 248
- estratégia geral para a purificação de, 31, 32
- estrutura
 - primária, 20
 - quaternária, 24
 - secundária, 20
 - alfa-hélice, 20
 - folha pregueada (configuração beta), 20, 21
 - terciária, 23, 24
 - domínios, 25
 - interações hidrofóbicas, 24
 - ligações eletrostáticas ou iônicas, 24
 - pontes de hidrogênio, 23, 24
 - ferro-enxofre, 140
 - fibrosas, 25
 - formação por L-aminoácidos, 14
 - fosfatases, 262
 - funções das, 11
 - substituição de aminoácidos, 31
- G, 263
 - globulares, 25
 - hsp70, 31
- ingestão proteica mínima e NPU das, 247, 248
- inibidora da fosfoproteína fosfatase 1, 267
- integradas, 107
- meia-vida de, 216
- métodos de purificação de, 32-36
 - cromatografia
 - de afinidade, 34
 - de exclusão, 32
 - de troca iônica, 34
 - em coluna, 32
 - por filtração em gel, 32
 - eletroforese
 - em gel, 35
 - em papel, 35
 - nativa, 30
 - parâmetros para avaliar a qualidade nutricional das, 246
 - periféricas, 107
 - processo de síntese das, 239
 - qualidade nutricional das, 245-247
 - quinase(s), 262
 - C, 268
 - dependente de cAMP, 266
 - dependentes de insulina, 279
 - reciclagem de, 243
 - renaturação, 31
 - solubilidade das, 28-30
 - valor nutricional das, 244-247
 - valores de digestibilidade de, 246

Q

- Quantum*, 182
- Quilomícrons, 102
- Quimiolitotróficos, 113
- Quimioorganotróficos, 113
- Quimiotripsina, síntese da, 86
- Quimiotripsinogênio, 86
- Quimiotróficos, 113
- Quinases, 123

R

- Radiação luminosa, componentes da, 182
- Reação(ões)
 - anaeróbicas, 133
 - atuação das enzimas na cinética das, 60-63
 - da gliconeogênese, 173
 - de primeira ordem, 60
 - de segunda ordem, 60
 - do ciclo de Krebs, 131-133
- Receptores
 - adrenérgicos, 270
 - hormonais, localização, 263
- Refsom, moléstia de, 201
- Regulação
 - alostérica, 258
 - da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, 288
 - da glicólise e gliconeogênese, 280-285
 - da(s) via(s)
 - das pentoses-fosfato, 285, 286
 - metabólicas principais, 275-295
 - do ciclo
 - da uréia, 295

- de Krebs, 286, 287
- do complexo piruvato desidrogenase, 286
- do metabolismo
 - de triacilgliceróis e ácidos graxos, 288-291
 - do colesterol, 291-295
 - do glicogênio, 275-280
 - integrada do metabolismo, 296-302
 - concentração das enzimas, 296
 - diabetes, 302
 - exercícios e problemas, 351, 352
 - jejum, 301, 302
 - processos degradativos, 301, 302
 - período abortivo, 297-299
 - alta relação insulina/glucagon, 297-299
 - período pós-absortivo, 299-301
 - efeitos desencadeados pelo AMP cíclico, 299-301
 - por modificação covalente, 258, 261, 262
- Relação P/O, 148
- Renaturação, 31
- Rendimento da oxidação da glicose, 154
- Resíduos de aminoácidos, 18
- Resinas de troca iônica, 34
- Respiração, 179
 - aeróbia, 154
 - anaeróbia, 154
- Rhizobium*, 237, 238
- Rhodospseudomonas*, 192
- Rhodospirillum*, 192
- Ribose 5-fosfato, 159
- Ribozima, 60
- Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, 188
- Rigor mortis*, 306
- Rubisco, 188

S

- S-adenosilmetionina, 228
- Sacarase, 169
- Sacaropina, 232
- Sacarose, 92
 - metabolismo de, 169
- Sais biliares, 99, 214
- Salting in*, 28
- Salting out*, 29
- Saponificação, 97
- Sarcolema, 303
- Sarcômero, 303
- Sarcoplasma, 303
- Sentido das reações, 49-58
 - exercícios e problemas, 336
 - variação de energia livre, 49-56
- Sephadex*, 32
- Serina, 13
 - conversão, 225
 - desidratase, 225
 - hidrometil transferase, 241
 - síntese da, 241
- Sickle*, 31
- Síntese de ácidos graxos, 207
- Síntese
 - de ácido palmítico, 208
 - de ácidos graxos, 204-208
 - acetil-CoA, 205
 - exercícios e problemas, 349
 - malonil-CoA, 205
 - NADPH, 205
 - primeira etapa, 204
 - de amido, 169
 - de aminoácidos, 237-242
 - de ATP, 136, 137
 - de glicogênio, 166, 167
 - de triacilgliceróis, 210-212
 - exercícios e problemas, 349
- Sistema(s)-tampão, 3-10
 - ácidos e bases de Brønsted, 3, 4
 - definição e propriedades, 4, 5
 - exercícios e problemas, 331, 332
 - fatores que determinam a eficiência de um, 5-9
 - concentração, 8, 9
 - faixa de pH, 5-7
- Sítio ativo, 65
- Solubilidade das proteínas, 28
- Soro, atividade enzimática no, 75
- Steady-state*, 76
- Subfragmento I, 305
- Substrato(s), 63
 - das vias metabólicas, 243-253
- Succinato

- coenzima Q redutase, 141
 - desidrogenase, 82, 131
 Succinil-CoA
 - aminoácidos convertidos a, 228
 - degradação de proteínas, 177
 - metabolismo de lipídios, 198
 - sintetase, 131
 Sulfito oxidase, 224
 Sulfonamidas, nas infecções bacterianas, 79
 Suplementações nutricionais, 314, 315

T

Talassemias, 48
 Tampão, sistema, 3-10
 - ácido(s)
 - - conjugado, 3
 - - fortes, 3
 - - fracos, 3
 - base conjugada, 3
 - bicarbonato, 9
 - constante de dissociação ou de ionização, 4
 - eficiência
 - - concentração, 8, 9
 - - faixa de pH, 5
 - equação de Henderson-Hasselbalch, 7
 - fosfato, 9
 - pK_a , 7
 - proteínas, 9
 - prótons, 4
 Taxa metabólica basal, 248
 Temperatura
 - de transição, 105
 - na atividade enzimática, 66
 Tempo inicial, 70
 Teofilina, 266
 - e nível plasmático de ácidos graxos, 289
 Teoria
 - das colisões, 60
 - quimiosmótica, 146
 - - resultados experimentais, 150
 Termogênese, 152
 Termogenina, 152
 Testosterona, 215
 Tetraidrobiotinina, 235
 Tetraidrofolato, 225
 Tiamina pirofosfato, 127, 129
 Tilacóide, 181
 Tioesterase, 207
 Tiolase, 212
 Tiorredoxina, 190
 Tirosina, 13
 - conversão, 227

- hidroxilase, 236
 - quinase, 272
 - síntese da, 242
 Toxina
 - da cólera, 266
 - da coqueluche, 271
 Transaldolase, 160
 Transaminases, 217
 Transcetolase, 160
 Transdução de sinal, 263
 Transferase, 165
 Transformação de Lineweaver-Burk, na determinação do K_M , 77, 78
 Translocases, 109
 Transporte
 - através de membranas, 109, 110
 - - ativo, 109
 - - endocitose, 109
 - - exocitose, 109
 - - facilitado ou passivo, 109
 - - íons e moléculas pequenas, 109
 - - macromoléculas e partículas, 109
 - - por permeases, 109
 - de fosfato, 158
 - de glutamato, 158
 - de íons Ca^{2+} , 158
 - de metabólitos através da membrana interna da mitocôndria, 156-158
 - de piruvato, 158
 Treonina, 13
 - conversão, 225, 228
 Triacilgliceróis, 96, 97
 - como reservas de energia, 100
 - degradação de, 194, 195
 - - ácidos graxos, 195
 - - glicerol, 195
 - - lipase, 194
 - - - lipoproteica, 195
 - fígado e tecido adiposo no metabolismo de, 212
 - precursores dos, 210, 211
 - síntese de, 210-212
 Tricarboxilato translocase, 158, 289
 Triose fosfato isomerase, 123
 Tripsina, 63
 - na interação enzima-substrato, 65
 Tripsinogênio, 86
 Triptofano, 13
 - conversão, 226
 Tromboxanas, 209
 Tropocolágeno, 25
 Tropomiosina, 306
 Troponina, 306
 Túbulos T, 306

U

UDP-G (v. Uridina difosfato glicose)
 Unidade peptídica, 17
 Uréia
 - ciclo da, 220, 221
 - - doenças hereditárias relacionadas com, 237
 - conversão do grupo amino dos aminoácidos em, 220
 - na degradação de aminoácidos, 217, 220-222
 - síntese da, 220, 221
 Uridina difosfato glicose, 166

V

Valina, 13
 - conversão, 228
 Valor biológico (BV, de *Biological Value*), 246
 Vasopressina, 18
 Velocidade da reação
 - e baixas concentrações de substrato, 77
 - e concentração da enzima, 72, 73
 - inicial, 67, 70
 - máxima, 71
 - proporcional, 70
 Vesículas
 - invertidas, 148
 - revestidas, 109
 Via das pentoses fosfato, 159
 - etapas da, 160
 - - equação geral, 160
 - exercícios e problemas, 346
 - funções da, 159, 160
 - parte
 - - não-oxidativa, 160
 - - oxidativa, 160
 Vitamina(s)
 - antioxidantes, 253
 - C (ácido ascórbico), 88
 - D, 99
 - hidrossolúveis, 88, 253
 - lipossolúveis, 88, 250, 253
 VLDL (*very low density lipoproteins*), 102

X

Xantofilas, 181

Z

Zimogênios, 86