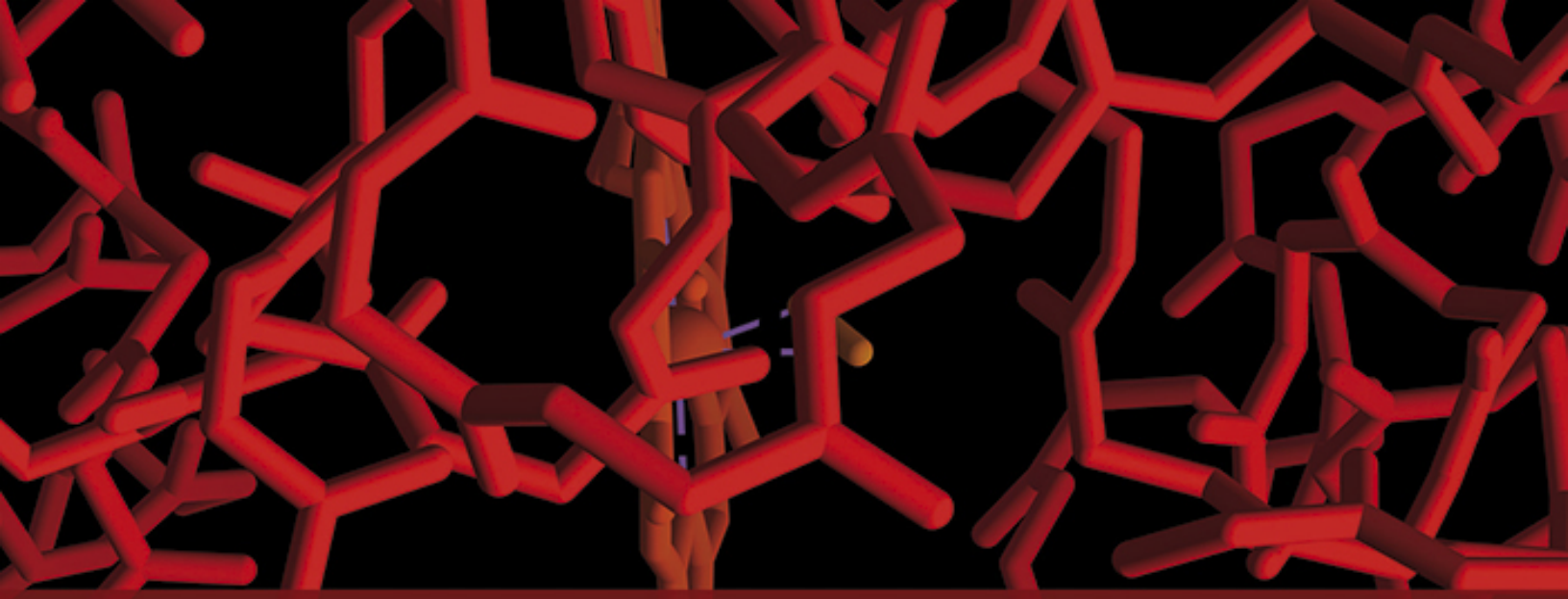
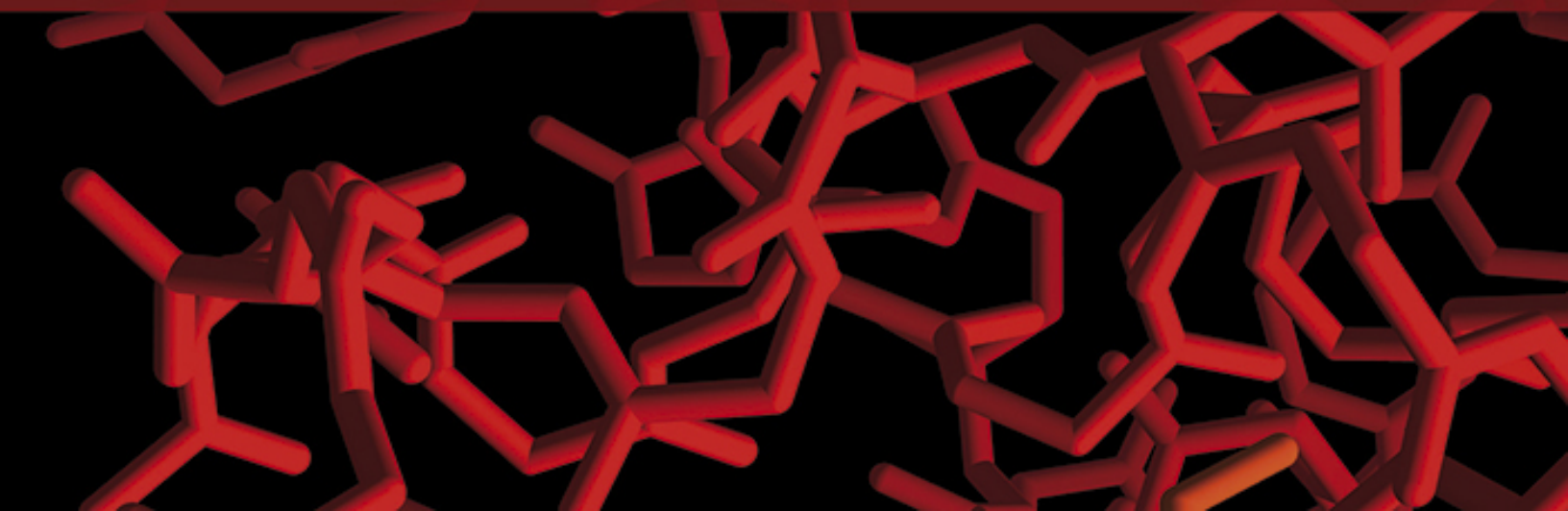


Anita Marzzoco
Bayardo Baptista Torres

Bioquímica Básica

Quarta edição

gen | GUANABARA KOOGAN



Bioquímica Básica

abdr
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE DIREITOS REPROGRÁFICOS
Respeite o direito autoral

OceanofPDF.com

O GEN | Grupo Editorial Nacional – maior plataforma editorial brasileira no segmento científico, técnico e profissional – publica conteúdos nas áreas de ciências da saúde, exatas, humanas, jurídicas e sociais aplicadas, além de prover serviços direcionados à educação continuada e à preparação para concursos.

As editoras que integram o GEN, das mais respeitadas no mercado editorial, construíram catálogos inigualáveis, com obras decisivas para a formação acadêmica e o aperfeiçoamento de várias gerações de profissionais e estudantes, tendo se tornado sinônimo de qualidade e seriedade.

A missão do GEN e dos núcleos de conteúdo que o compõem é prover a melhor informação científica e distribuí-la de maneira flexível e conveniente, a preços justos, gerando benefícios e servindo a autores, docentes, livreiros, funcionários, colaboradores e acionistas.

Nosso comportamento ético incondicional e nossa responsabilidade social e ambiental são reforçados pela natureza educacional de nossa atividade e dão sustentabilidade ao crescimento contínuo e à rentabilidade do grupo.

OceanofPDF.com

Bioquímica Básica

Anita Marzzoco
Bayardo Baptista Torres

Professores Doutores
Departamento de Bioquímica
Universidade de São Paulo (USP)

Quarta edição

gen | GUANABARA KOOGAN

OceanofPDF.com

- Os autores deste livro e a EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA. empenharam seus melhores esforços para assegurar que as informações e os procedimentos apresentados no texto estejam em acordo com os padrões aceitos à época da publicação, *e todos os dados foram atualizados pelos autores até a data da entrega dos originais à editora*. Entretanto, tendo em conta a evolução das ciências da saúde, as mudanças regulamentares governamentais e o constante fluxo de novas informações sobre terapêutica medicamentosa e reações adversas a fármacos, recomendamos enfaticamente que os leitores consultem sempre outras fontes fidedignas, de modo a se certificarem de que as informações contidas neste livro estão corretas e de que não houve alterações nas dosagens recomendadas ou na legislação regulamentadora.

- Os autores e a editora se empenharam para citar adequadamente e dar o devido crédito a todos os detentores de direitos autorais de qualquer material utilizado neste livro, dispondo-se a possíveis acertos posteriores caso, inadvertida e involuntariamente, a identificação de algum deles tenha sido omitida.

- Direitos exclusivos para a língua portuguesa
Copyright © 2015 by
EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.
Uma editora integrante do GEN | Grupo Editorial Nacional
Travessa do Ouvidor, 11
Rio de Janeiro – RJ – CEP 20040-040
Tels.: (21) 3543-0770/(11) 5080-0770 | Fax: (21) 3543-0896
www.editoraguanabara.com.br | www.grupogen.com.br | editorial.saude@grupogen.com.br

Reservados todos os direitos. É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte, em quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação, fotocópia, distribuição pela Internet ou outros), sem permissão, por escrito, da EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA.

- Capa: Guilherme Andrade Marson
Produção digital: Geethik

- Ficha catalográfica

M357b
4. ed.

Marzzoco, Anita

Bioquímica básica/Anita Marzzoco, Bayardo Baptista Torres. – 4. ed. – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

il.

ISBN 978-85-277-2781-5

1. Bioquímica. I. Torres, Bayardo Baptista. II. Título.

15-23107

CDD: 612.015
CDU: 612.015

OceanofPDF.com

Prefácio à 4ª Edição

Nesta nova edição foi mantida a intenção de oferecer um texto conciso para os cursos introdutórios de Bioquímica, privilegiando o entendimento dos conceitos e a atualização das informações. Atendendo à importância que assumiram, alguns conteúdos foram ampliados, e todos os capítulos foram revistos e atualizados, bem como a bibliografia referida.

O projeto gráfico foi totalmente renovado, e, como guia importante para o leitor, foi criado um ícone indicativo das seções que tratam das regulações das vias metabólicas. O primeiro exemplo é encontrado na página 79, Seção 5.7 – Regulação da atividade enzimática:

A interferência hormonal sobre o nível de enzimas-chave do metabolismo e o controle da atividade enzimática por regulação alostérica e modificação covalente são analisados nos Capítulos 19 e 20.

Os Novas ilustrações, criadas pelo Prof. Dr. Guilherme Andrade Marson, são decisivas para a compreensão das vias metabólicas, além de contribuírem para a qualidade visual da obra.

Os *Objetivos para Estudo* foram mantidos como um roteiro de orientação ao estudo e adaptados ao conteúdo revisado; os *Exercícios e Problemas* contam com muitas questões novas e de maior complexidade.

Esperamos ter sido bem-sucedidos nesta contribuição ao estudo da Bioquímica e receber dos estudantes e colegas o mesmo apreço demonstrado nas edições anteriores.

Os Autores

OceanofPDF.com

Prefácio à 1ª 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 ideias contidas neste livro.

OS AUTORES

OceanofPDF.com

Material suplementar

Este livro conta com o seguinte material suplementar:

- Ilustrações da obra em formato de apresentação (restrito a docentes)

O acesso ao material suplementar é gratuito. Basta que o leitor se cadastre e faça seu *login* em nosso *site* (www.grupogen.com.br), clicando em GEN-IO, no menu superior do lado direito.

O acesso ao material suplementar *online* fica disponível até seis meses após a edição do livro ser retirada do mercado.

Caso haja alguma mudança no sistema ou dificuldade de acesso, entre em contato conosco (gendigital@grupogen.com.br).

GEN | Informação Online

GEN-IO (GEN | Informação Online) é o ambiente virtual de aprendizagem do GEN | Grupo Editorial Nacional, maior conglomerado brasileiro de editoras do ramo científico-técnico-profissional, composto por Guanabara Koogan, Santos, Roca, AC Farmacêutica, Forense, Método, Atlas, LTC, E.P.U. e Forense Universitária.

Os materiais suplementares ficam disponíveis para acesso durante a vigência das edições atuais dos livros a que eles correspondem.

OceanofPDF.com

Sumário

Parte 1 Conceitos Básicos, Proteínas e Enzimas

1 Sistema-tampão

1.1 Ácidos e bases de Brönsted
1.2 Sistemas-tampão: definição e propriedades
1.3 Fatores que determinam a eficiência de um sistema-tampão
1.4 Tampões biológicos
Bibliografia

2 Aminoácidos e Proteínas

2.1 Aminoácidos componentes de proteínas
2.2 Ionização dos aminoácidos
2.3 Polímeros de aminoácidos: peptídios e proteínas
2.4 Estrutura das proteínas
2.5 Proteínas fibrosas
2.6 Proteínas conjugadas
2.7 Carga elétrica e solubilidade das proteínas
2.8 Alterações estruturais das proteínas
2.9 Purificação de proteínas — Estratégia geral
2.10 Métodos de purificação de proteínas
2.10.1 Cromatografia em coluna
2.10.2 Eletroforese
Bibliografia

3 Hemoglobina — Transporte de Oxigênio e Tamponamento do Plasma

3.1 Estrutura da hemoglobina

3.2 Ligação do oxigênio à hemoglobina

3.3 Fatores que interferem na ligação com oxigênio

3.3.1 2,3-bisfosfoglicerato (BPG)

3.3.2 pH: efeito Bohr

3.3.3 Hemoglobina e o tamponamento do sangue

3.4 Hemoglobina fetal

3.5 Hemoglobinas anormais

Bibliografia

4 O Sentido das Reações

4.1 Variação de energia livre: critérios de espontaneidade

4.2 Reações de oxidação-redução

Bibliografia

5 Enzimas

5.1 Atuação das enzimas na cinética das reações

5.1.1 Graus de especificidade das enzimas

5.2 Classificação e nomenclatura das enzimas

5.3 Fatores que interferem na atividade enzimática: pH e temperatura

5.4 Cinética da reação enzimática

5.5 A equação de Michaelis-Menten

5.6 Inibidores enzimáticos

5.6.1 Inibidores competitivos

5.6.2 Inibidores não competitivos

5.6.3 Antimetabólitos

5.7 Regulação da atividade enzimática

5.8 Cofatores enzimáticos

Bibliografia

Parte 2 Estrutura de Carboidratos e Lipídios; Membranas

6 Estrutura de Carboidratos e Lipídios

6.1 Estrutura de carboidratos

6.2 Estrutura de lipídios

6.2.1 Ácidos graxos

6.2.2 Triacilgliceróis

6.2.3 Glicerofosfolipídios

6.2.4 Esfingolipídios

6.2.5 Esteroides

6.2.6 Lipídios anfipáticos

6.2.7 Transporte de lipídios — Lipoproteínas plasmáticas

Bibliografia

7 Membranas

7.1 Interações entre lipídios anfipáticos: a bicamada lipídica

7.2 Estrutura das membranas biológicas

7.2.1 Modelo do mosaico fluido

7.3 Funções de componentes da membrana plasmática

7.3.1 Fosfolipídios e colesterol

7.3.2 Glicoproteínas e glicolipídios

7.4 Transporte através de membranas

7.4.1 Transporte de íons e moléculas pequenas

7.4.2 Transporte de macromoléculas e partículas: endocitose e exocitose

Bibliografia

Parte 3 Metabolismo: Vias Principais

8 Introdução ao Metabolismo

8.1 Funções do ATP

8.1.1 Função termodinâmica do ATP

8.1.2 Outras funções do ATP

8.2 Macronutrientes

8.3 Estudo do metabolismo

Bibliografia

9 Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA

9.1 Oxidação de glicose

9.2 Glicólise: oxidação de glicose a piruvato

9.2.1 Glicólise anaeróbia: fermentações

9.3 Conversão de piruvato a acetil-CoA

Bibliografia

10 Ciclo de Krebs

10.1 Reações do ciclo de Krebs

10.2 Função anabólica do ciclo de Krebs

10.3 Ciclo do glioxilato

Bibliografia

11 Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

11.1 Oxidação de coenzimas e síntese de ATP

11.2 Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial

11.2.1 Radicais livres

11.3 Fosforilação oxidativa

11.3.1 Hipótese quimiosmótica

11.3.2 ATP sintase

11.4 Controle respiratório

11.5 Inibidores e desacopladores
11.6 Fosforilação no nível do substrato
11.7 Cadeias de transporte de elétrons bacterianas
11.8 Rendimento da oxidação da glicose
11.9 Oxidação do NADH citosólico, 156 11.10Transporte de metabólitos através da membrana interna da mitocôndria
Bibliografia

12 Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato
12.1 Funções da via das pentoses fosfato
12.2 Etapas da via das pentoses fosfato
12.3 Funções adicionais do NADPH
12.4 Deficiência genética de glicose 6-fosfato desidrogenase
Bibliografia

13 Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose
13.1 Metabolismo do glicogênio
13.2 Síntese de amido
13.3 Metabolismo de sacarose e lactose
Bibliografia

14 Gliconeogênese
14.1 Origem da glicose circulante em animais superiores
14.2 Reações da gliconeogênese
14.3 Balanço energético da gliconeogênese
14.4 Degradação de proteínas e gliconeogênese
Bibliografia

15 Fotossíntese
15.1 Fotossíntese *versus* oxidação da glicose

15.2 Absorção de luz: fotossistemas
15.3 Fotossíntese em vegetais: fase clara
15.4 Síntese de glicose a partir de CO2 (a fase “escura” da fotossíntese)
15.5 Regulação do ciclo de Calvin
15.6 Fotorrespiração e plantas C_4
15.7 Fotossíntese em bactérias
Bibliografia

16 Metabolismo de Lipídios

16.1 Degradação de triacilgliceróis
16.2 Degradação de ácidos graxos: ativação, transporte e oxidação
16.2.1 Ácidos graxos saturados
16.2.2 Ácidos graxos insaturados, com número ímpar de átomos de carbono, ramificados e hidroxilados
16.3 Corpos cetônicos
16.4 Metabolismo do etanol
16.5 Síntese de ácidos graxos
16.6 Alongamento e insaturação de ácidos graxos — Ácidos graxos essenciais
16.6.1 Eicosanoides
16.7 Síntese de triacilgliceróis
16.8 Metabolismo do colesterol
Bibliografia

17 Metabolismo de Aminoácidos

17.1 Degradação intracelular de proteínas
17.2 Degradação de aminoácidos
17.2.1 Remoção do grupo amino dos aminoácidos
17.2.2 Degradação da cadeia carbônica dos aminoácidos
17.3 Doenças hereditárias do metabolismo de aminoácidos

17.4 Origem do nitrogênio dos aminoácidos
17.4.1 Síntese de aminoácidos
Bibliografia

18 Nutrição — Os Substratos das Vias Metabólicas
18.1 Nutrição proteica
18.1.1 Balanço de nitrogênio
18.1.2 Valor nutricional das proteínas
18.1.3 Quantidades recomendadas de proteína na dieta
18.2 Ingestão calórica
18.2.1 Dispêndio de energia
18.2.2 Obesidade
18.2.3 Contribuição dos alimentos para a ingestão calórica
18.2.4 Lipídios da dieta — Ácidos graxos essenciais
18.3 Desnutrição
18.4 Micronutrientes
Bibliografia

Parte 4 Regulação do Metabolismo

19 Estratégias de Regulação do Metabolismo
19.1 Alteração da concentração de enzimas
19.2 Alteração da atividade das enzimas
19.2.1 Regulação alostérica
19.2.2 Regulação por modificação covalente
19.3 Transdução de sinal
19.4 Ação hormonal
19.4.1 AMP cíclico e a via da proteína quinase A
19.4.2 Íons Ca^{2+} e via da fosfolipase C
19.5 Transdução de sinais sensoriais
19.6 Adrenalina, glucagon e insulina
19.6.1 Adrenalina (epinefrina)

19.6.2 Glucagon
19.6.3 Insulina
19.7 Proteína quinase dependente de AMP (AMPK)
Bibliografia

20 Regulação das Vias Metabólicas Principais

20.1 Regulação do metabolismo do glicogênio
20.1.1 Regulação da degradação do glicogênio muscular
20.1.2 Regulação da síntese do glicogênio muscular
20.1.3 Regulação do metabolismo do glicogênio hepático
20.2 Regulação da glicólise e da gliconeogênese
20.2.1 Regulação alostérica e por modificação covalente
20.2.2 Modulação da concentração de enzimas da glicólise e da gliconeogênese
20.3 Regulação da via das pentoses fosfato
20.4 Regulação do complexo piruvato desidrogenase
20.5 Regulação do ciclo de Krebs
20.6 Regulação da cadeia de transporte de elétrons e da síntese de ATP — Controle respiratório
20.7 Regulação do metabolismo de triacilgliceróis e ácidos graxos
20.8 Regulação do metabolismo do colesterol
20.9 Regulação do ciclo da ureia
Bibliografia

21 Regulação Integrada do Metabolismo

21.1 Período absortivo
21.2 Período pós-absortivo
21.3 Jejum
21.4 Diabetes
Bibliografia

22 Contração Muscular

22.1 Estrutura do músculo esquelético

22.1.1 Filamentos grossos: miosina

22.1.2 Filamentos finos: actina, tropomiosina e troponina

22.1.3 Proteínas sarcoméricas acessórias

22.2 Mecanismo da contração muscular

22.3 Regulação da contração muscular

22.4 Fontes de energia para o trabalho muscular: processos anaeróbios e aeróbios

22.5 Tipos de fibras musculares

22.6 Músculos lisos

Bibliografia

Parte 5 Estudo do Conteúdo

Objetivos para Estudo

Capítulo 1 | Sistema-tampão

Capítulo 2 | Aminoácidos e Proteínas

Capítulo 3 | Hemoglobina — Transporte de Oxigênio e Tamponamento do Plasma

Capítulo 4 | O Sentido das Reações

Capítulo 5 | Enzimas

Capítulo 6 | Estrutura de Carboidratos e Lipídios

Capítulo 7 | Membranas

Capítulo 9 | Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA

Capítulo 10 | Ciclo de Krebs

Capítulo 11 | Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

Capítulo 12 | Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato

Capítulo 13 | Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose

Capítulo 14 | Gliconeogênese

Capítulo 15 | Fotossíntese
Capítulo 16 | Metabolismo de Lipídios
Capítulo 17 | Metabolismo de Aminoácidos
Capítulo 18 | Nutrição — Os Substratos das Vias Metabólicas
Capítulo 19 | Estratégias de Regulação do Metabolismo
Capítulo 20 | Regulação das Vias Metabólicas Principais
Capítulo 21 | Regulação Integrada do Metabolismo
Capítulo 22 | Contração Muscular

Exercícios e Problemas

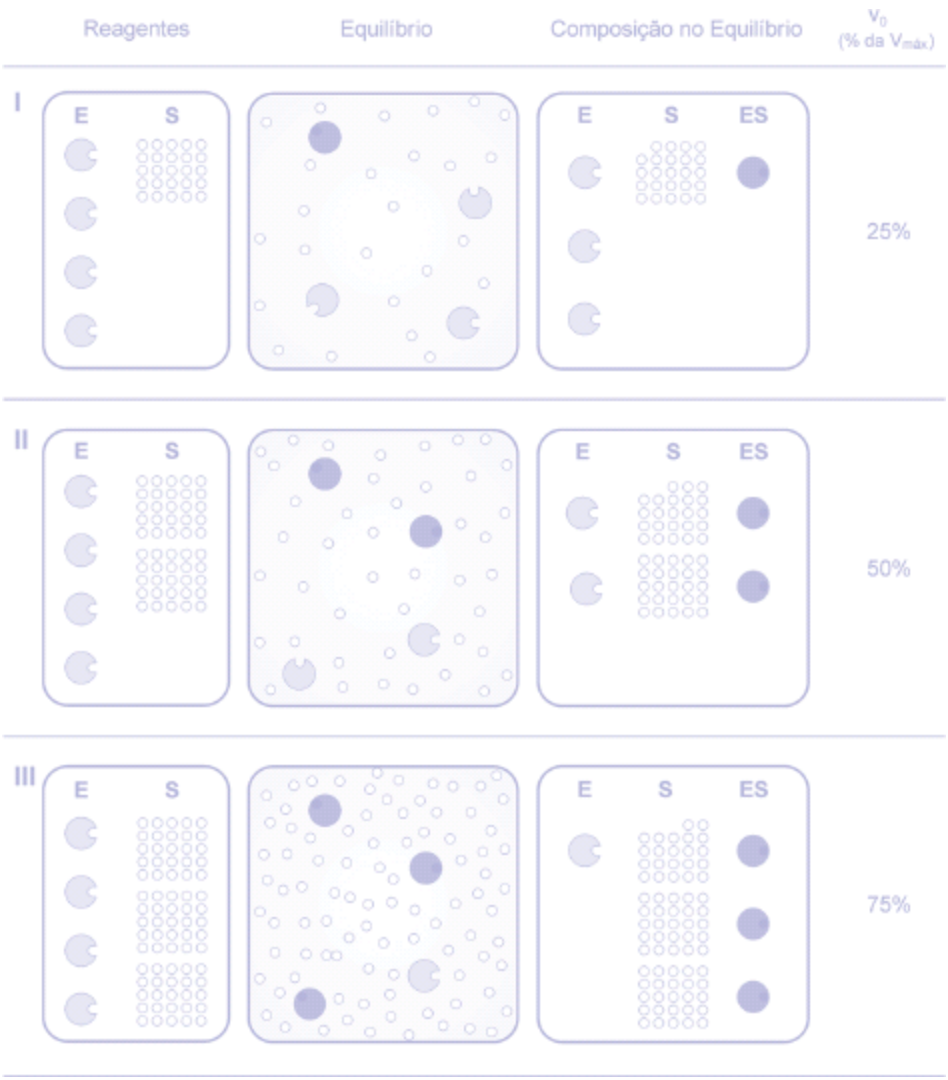
Capítulo 1 | Sistema-tampão
Capítulo 2 | Aminoácidos e Proteínas
Capítulo 3 | Hemoglobina — Transporte de Oxigênio e Tamponamento do Plasma
Capítulo 4 | O Sentido das Reações
Capítulo 5 | Enzimas
Capítulo 8 | Introdução ao Metabolismo
Capítulo 9 | Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA
Capítulo 10 | Ciclo de Krebs
Capítulo 11 | Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa
Capítulo 12 | Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato
Capítulo 13 | Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose
Capítulo 14 | Gliconeogênese
Capítulo 15 | Fotossíntese
Capítulo 16 | Metabolismo de Lipídios
Capítulo 17 | Metabolismo de Aminoácidos
Capítulos 18, 19 e 20 | Vias Metabólicas: Substratos e Regulação
Capítulos 18 e 21 | Nutrição e Regulação Integrada do Metabolismo
Capítulo 22 | Contração Muscular

OceanofPDF.com

Parte 1

Conceitos Básicos,Proteínas e Enzimas

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



OceanofPDF.com

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 de pH.

Nos seres humanos, o pH plasmático deve ser mantido em torno de 7,4 em uma faixa muito estreita de variação — decréscimos a valores próximos de 7,0 têm sérias consequências. 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. Ainda assim, o valor do pH celular ou plasmático é mantido praticamente 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 conveniente 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, H_2SO_4, $H_3C–COOH$, NH_+^1 e $H_3C–NH_3^+$, pois podem dissociar-se, liberando prótons:

$$HCl \rightarrow Cl^- + H^+$$
$$H_2SO_4 \rightarrow HSO_4^- + H^+$$
$$H_3C–COOH \rightarrow H_3C–COO^- + H^1$$

$$NH_4^+ \rightarrow NH_3 + H^+$$
$$H_3C{-}NH_3^+ \rightarrow H_3C{-}NH_2 + H^1$$

Generalizando, a equação de dissociação de um ácido (HA) é:

$$HA \rightarrow A + H^+$$

ou

$$HB^+ \rightarrow B + H^+$$

O íon (Cl^-, HSO_4^- etc.) — ou a molécula (NH_3, $H_3C–NH_2$) — resultante da 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 H_2SO_4. Outros, os chamados *ácidos fracos*, ionizam-se muito pouco. Para estes ácidos, pode-se escrever:

$$HA \rightleftharpoons A + H^+$$

Esta equação 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. A Tabela 1.1 apresenta alguns ácidos fracos e os valores de sua constante de dissociação e de seu pK_a ($pK_a = – \log K_a$). São todos ácidos fracos, mas com forças ácidas variáveis — quanto menor o valor de K_a (ou maior o valor de pK_a) mais fraco será o ácido e mais forte será a sua base conjugada. O significado de pK_a está detalhado na Seção 1.2.

Tabela 1.1 Variação de força ácida entre os ácidos fracos.

Ácido conjugado	Base conjugada	K_a(M)	pK_a
Ácido acético CH_3COOH	Acetato CH_3COO^-	$1,7 \times 10^{-5}$	4,76
Ácido carbônico* H_2CO_3	Íon bicarbonato HCO_3^-	$1,7 \times 10^{-4}$	3,77
Íon bicarbonato HCO_3^-	Carbonato CO_3^{2-}	$6,3 \times 10^{-11}$	10,2
Ácido lático $CH_3CHOHCOOH$	Lactato $CH_3CHOHCOO^-$	$1,4 \times 10^{-4}$	3,86
Ácido fosfórico H_3PO_4	Íon di-hidrogênio fosfato $H_2PO_4^-$	$7,2 \times 10^{-3}$	2,14
Íon di-hidrogênio fosfato$H_2PO_4^-$	Íon mono-hidrogênio fosfatoHPO_4^{2-}	$1,4 \times 10^{-7}$	6,86
Íon mono-hidrogênio fosfato HPO_4^{2-}	Íon fosfato PO_4^{3-}	$3,9 \times 10^{-13}$	12,4
Íon amônio NH_4^+	Amônia NH_3	$5,6 \times 10^{-10}$	9,25

***** Os dados da tabela referem-se a 25°C. A 37°C, o valor da constante de dissociação (K_a) do ácido carbônico é $2,7 \times 10^{-4}$M e o pK_a é 3,57. No plasma humano, nas condições atmosféricas habituais, esses valores mudam para $8,1 \times 10^{-7}$M e 6,1, respectivamente.

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 ácidos ou álcalis. Um sistema-tampão é denominado pela sua base conjugada: tampão acetato, tampão fosfato etc.

Segue-se a descrição do modo pelo qual 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 um meio desprovido da base conjugada de um ácido fraco — água ou 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.

$$OH^- + H^+ \rightleftharpoons H_2O$$

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:

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

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 da adição do álcali à água ou a uma solução de NaCl.

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:

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

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 (HA + 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 apresenta uma concentração de HA muito maior do que de A, como resultado da pequena dissociação que é

característica do ácido fraco. Se esta solução for submetida à adição contínua de álcali, haverá dissociação progressiva do ácido, cuja concentração diminuirá, e um consequente 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 (Figura 1.1).

Deduz-se, do exposto, que a ação tamponante está restrita a uma faixa de pH na qual as concentrações de ácido e base conjugada são suficientes para compensar adições de álcali ou de ácido. Fora do intervalo de tamponamento, como a soma (HA + A) é constante, têm-se as situações seguintes:

	[HA]	[A]
Grande adição de álcali	≅ 0%	≅ 100%
Grande adição de ácido	≅ 100%	≅ 0%

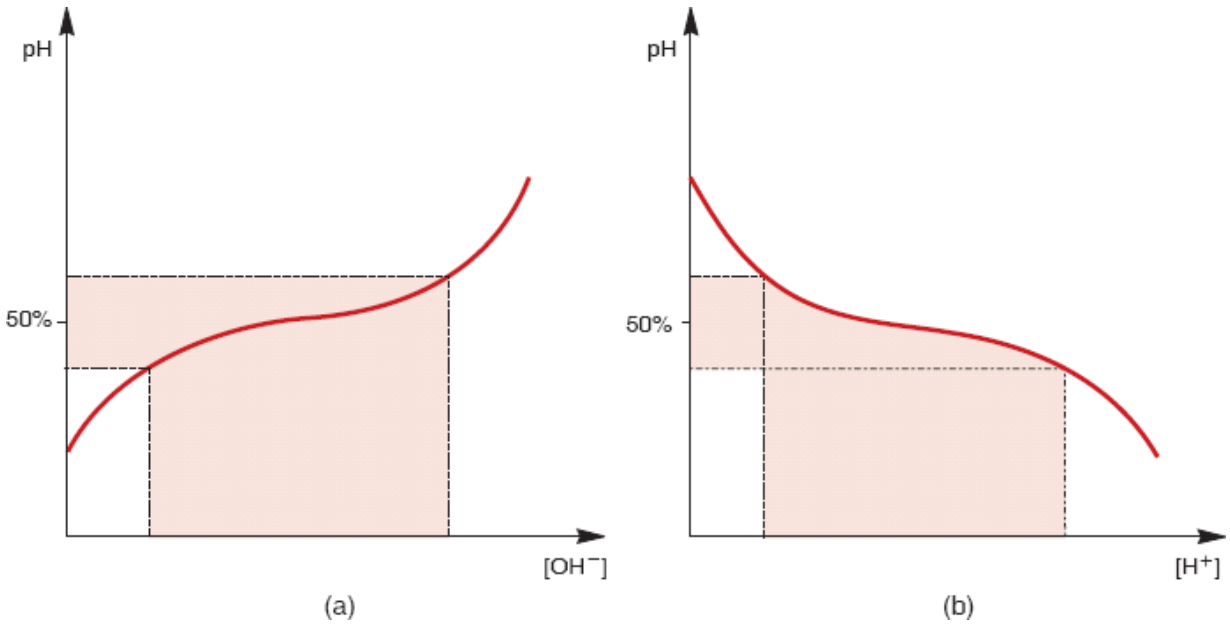


Figura 1.1 Titulação de um ácido fraco com álcali (a) e com ácido (b). Na região assinalada, as adições de álcali ou ácido provocam pequenas variações de pH; fora desta região, a variação é grande. Nas ordenadas, está assinalado o pH em que há 50% de dissociação do ácido.

Uma situação apresenta interesse particular: na faixa de pH em que a ação tamponante é exercida 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. Tal condição será verificada em um valor de pH definido e característico para cada tampão. É nesta situação, ou é neste valor de pH, que o sistema-tampão tem sua eficiência máxima, por existirem, *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 Figura 1.1), o tampão ainda é eficaz; 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 Figura 1.1 a. A curva de titulação apresenta uma região achatada, correspondente à região de tamponamento, onde há 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 em que há 50% de dissociação e [HA] = [A].

Entre os ácidos fracos, existe uma gradação de força ácida, revelada pelo valor de suas constantes de dissociação (Tabela 1.1). 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 mais forte será o ácido fraco.

Suponham-se dois ácidos fracos, HA e HB, sendo a constante de dissociação (K_a) de HA maior do que a de HB. A base conjugada A tem, então, afinidade pelo próton menor do que a base conjugada B e o ácido HA é um ácido fraco mais forte do que HB. Se estes ácidos forem dissolvidos em água, o ácido HA irá dissociar-se mais do que o ácido HB e o pH de sua solução será menor.

Admita-se que ambas as soluções dos ácidos fracos HA e HB estejam em pH igual a 2 (isto pode ser conseguido adicionando-se um ácido forte às duas soluções). Para proceder à titulação dos dois ácidos, a partir de pH 2, acrescenta-se álcali, gradativamente, a estas soluções, o que 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 alturas diferentes em relação à escala de pH (o eixo das ordenadas na Figura 1.1 a).

O valor de pH em que um ácido fraco apresenta-se 50% dissociado equivale ao seu pK_a. O pK_a corresponde ao cologaritmo da constante de dissociação do ácido ($-\log K_a$) e constitui, como esta, uma medida da sua força ácida: quanto maior for o valor do pK_a (ou menor o valor de K_a) mais fraco será o ácido (Tabela 1.1). Ainda mais importante, o valor do pK_a *revela a região de pH em que um ácido fraco apresenta seu maior poder tamponante.*

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

Considere-se a dissociação do ácido fraco HA:

$$HA \rightleftharpoons A + H^+$$

E a constante de equilíbrio (K_a) dessa reação:

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

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

Tomando em logaritmo a equação anterior, tem-se:

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

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

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

Substituindo-se as expressões $- \log [H^+]$ e $- \log K_a$ por pH e pK_a, respectivamente, resulta:

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

Esta é a *equação de Henderson-Hasselbalch*, que nada mais é do que a equação da constante de equilíbrio de dissociação de um ácido fraco tomada sob a forma logarítmica.

Em um determinado valor de pH, o ácido encontra-se 50% dissociado, [HA] = [A] e a razão [A]/[HA] vale 1, obtendo-se:

$$pH = pK_a$$

Verifica-se, pela equação de Henderson-Hasselbalch, que pK_a *é o valor de pH que provoca 50% de dissociação do ácido*. A equação define o pK_a em bases operacionais, à semelhança do pH em relação à concentração de H^+ da solução.

De maneira genérica, esta equação pode ser escrita da seguinte maneira:

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

A equação de Henderson-Hasselbalch permite calcular, em qualquer pH, a razão entre as concentrações das espécies doadoras e aceptoras de prótons para um sistema-tampão, desde que o pK_a do ácido seja conhecido. Por exemplo, para o tampão acetato pode-se calcular a razão das concentrações de ácido acético ($H_3C–COOH$) com $pK_a = 4,7$ e acetato ($H_3C–COO^-$) em pH = 5,7:

$$pH = pK_a + \log \frac{[H_3C–COO^-]}{[H_3C–COOH]}$$

$$5,7 = 4,7 + \log \frac{[H_3C–COO^-]}{[H_3C–COOH]}$$

$$1 = \log \frac{[H_3C–COO^-]}{[H_3C–COOH]}$$

ou

$$\frac{[H_3C–COO^-]}{[H_3C–COOH]} = 10$$

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 tampão acetato, a faixa compreendida entre 3,7 e 5,7 (entre pH = $pK_a - 1$ e pH = $pK_a + 1$) corresponde à região achatada da curva de titulação, isto é, à região de tamponamento (assinalada na Figura 1.2). 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. Assim, em pH 6,7 tem-se:

$$6,7 = 4,7 + \log \frac{[H_3C-COO^-]}{[H_3C-COOH]}$$

e

$$\frac{[H_3C-COO^-]}{[H_3C-COOH]} = 100$$

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 tampão, pois, com tão pequena concentração de ácido, seria incapaz de resistir a adições de álcali.

As afirmativas sobre este exemplo são válidas para a imensa maioria dos sistemas-tampão: a melhor atuação do tampão se dá em valores de pH próximos ao seu pK_a (um caso excepcional encontra-se na Seção 1.4).

O ácido acético ilustra a regra geral para a escolha do ácido fraco com o qual se pretende preparar 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.

A eficiência de um tampão depende de sua concentração

Além da proximidade do pH em que há 50% de dissociação (pK_a), outro fator determinante da eficiência do tampão é a sua concentração, que é a soma das concentrações do ácido e da base conjugada. O tampão mantém

igual 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 a disponibilidade das espécies capazes de doar ou receber prótons: 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 *de seu ácido fraco* (que pode ser medido por titulação). Na prática, o ácido fraco escolhido e um dos seus sais são dissolvidos em concentrações iguais. Para preparar um tampão acetato 0,1 M a pH 4,7, dissolvem-se em 1 L de água 0,05 mols de ácido acético e 0,05 mols de acetato de sódio. O mesmo resultado seria conseguido pela dissolução de 0,1 mols 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 1 L, a composição da solução será idêntica ao caso anterior (50% do ácido e 50% da base conjugada).

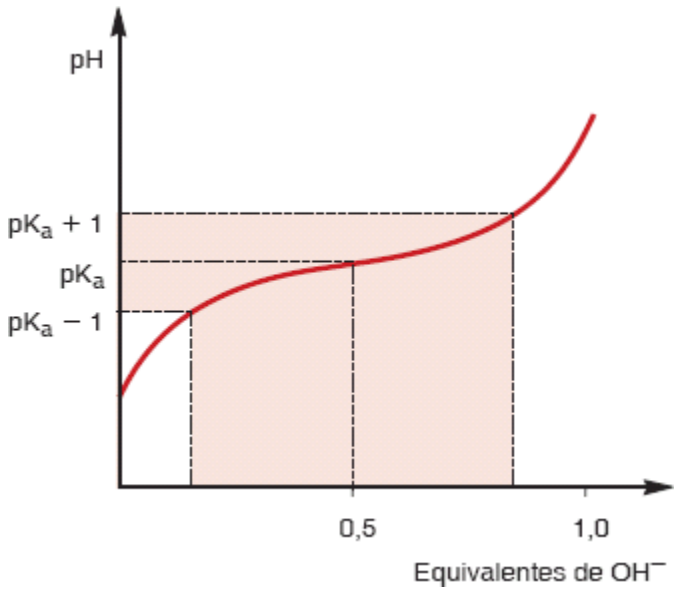


Figura 1.2 Titulação de um ácido fraco — a região de tamponamento estende-se uma unidade abaixo e acima do pK_a.

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, o pH do sangue é mantido muito próximo de 7,4, embora não sejam muitos os ácidos fracos que apresentam valores de pK_a em torno de 7,4. Os principais responsáveis pela manutenção desse valor de pH são as proteínas, o tampão bicarbonato e o tampão fosfato.

O efeito tamponante das proteínas é devido aos grupos ionizáveis dos seus resíduos de aminoácidos, que são ácidos fracos. Entretanto, os valores de pK_a da maioria desses grupos são muito distantes de 7,4 (Tabela 2.1, no Capítulo 2), tornando-os ineficazes como tampões neste pH. Os aminoácidos que apresentam um grupo com pK_a compatível com o tamponamento a pH fisiológico são a histidina e a cisteína. Adicionalmente, as proteínas exercem efeito tamponante muito discreto no plasma, por estarem presentes em baixas concentrações — vale lembrar que a eficiência do tampão depende de sua concentração. Sua importância no tamponamento celular é maior do que no plasmático, porque atingem níveis mais elevados nas células. A exceção é a *hemoglobina* que é a responsável principal pela manutenção do pH plasmático (Seção 3.3.1), juntamente com o tampão bicarbonato.

No caso do tampão bicarbonato, o ácido carbônico dissocia-se em bicarbonato e H^+:

$$H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

O valor de seu pK_a é 3,8, incompatível com o tamponamento fisiológico. O ácido carbônico apresenta, todavia, a característica peculiar de estar em equilíbrio com o CO_2 dissolvido em água segundo a reação:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

No organismo humano, o CO_2 formado nos tecidos, como produto do metabolismo celular, difunde-se para o plasma e para o interior das hemácias. Estas células contêm uma enzima, a *anidrase carbônica*, uma das enzimas mais eficientes que se conhece, capaz de acelerar a reação de

hidratação do CO_2 por cerca de 10^7 vezes — o CO_2 dissolvido é transformado imediatamente em H_2CO_3, que se dissocia em HCO_3^- e H^+:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

A constante de equilíbrio do sistema-tampão bicarbonato, incorporando-se a concentração de H_2O, por ser praticamente constante, é:

$$K_{eq} = \frac{[HCO_3^-]\,[H^+]}{[CO_2]}$$

O CO_2 (o anidrido do ácido carbônico) equivale ao "ácido conjugado" do tampão bicarbonato.

A concentração de CO_2 dissolvido depende da pressão parcial de CO_2 (pCO_2) na atmosfera e, como somente 3% do gás é dissolvido a 37ºC, esta função é expressa por $0{,}03 \bullet pCO_2$. Obtém-se:

$$K_{eq} = \frac{[HCO_3^-]\,[H^+]}{0{,}03 \cdot pCO_2}$$

A constante de equilíbrio do sistema-tampão bicarbonato a 37ºC pode ser calculada a partir da constante de equilíbrio da reação de hidratação do CO_2 (3×10^{-3}M) e da constante de dissociação do ácido carbônico ($2{,}7 \times 10^{-4}$M) — o valor da nova constante é $8{,}1 \times 10^{-7}$M e o do novo pK_a é 6,1. A equação de Henderson-Hasselbalch para este sistema-tampão torna-se:

$$pH = 6{,}1 + \log \frac{[HCO_3^-]}{0{,}03 \cdot pCO_2}$$

O CO_2 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 do que um sistema fechado. Realmente, 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 $[HCO_3^-]/0{,}03 \bullet pCO_2$ ficaria 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, porém muito menos do que no caso do sistema fechado. Em outras palavras, no sistema fechado, a adição de ácido provoca 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 (7,4), a proporção entre as concentrações de HCO_3^- e CO_2 é de 20:1, mostrando que o sistema é mais efetivo para resistir à acidificação do que à alcalinização. O estudo do funcionamento associado deste sistema-tampão com a hemoglobina está descrito na Seção 3.3.3.

O tampão fosfato ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$) tem pK_a igual a 6,8, constituindo um tampão apropriado para valores de pH entre 5,8 e 7,8. No plasma, porém, a concentração deste tampão é muito baixa, tornando sua eficiência muito reduzida. Intracelularmente (pH do citosol ≅ 7), sua concentração é maior e sua eficácia é considerável.

Bibliografia

Atkins PW, Palma J: *Physical Chemistry*, 7th ed. W. H. Freeman, 2001.

Casey JR *et al.*: Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11** (1): 50-61, 2010.

Segel IH: *Biochemical Calculations: How to Solve Mathematical Problems in General Biochemistry*, 2d ed. Wiley, 1976.

Solomons TWG, Fryle CB: *Organic Chemistry*, 8th ed. Wiley, 2003.

Zumdahl SS: *Chemical Principles*, 4th ed. Houghton Mifflin, 2002.

OceanofPDF.com

2 Aminoácidos e Proteínas

As proteínas, além de constituírem o componente celular mais abundante, são as biomoléculas mais diversificadas quanto a forma e função. São o componente principal, ou único, de estruturas tão diferentes quanto a clara dos ovos, os cascos e chifres, a pele e o cabelo, o bico e as penas das aves. As funções que desempenham são estruturais e dinâmicas. Fazem parte de todas as membranas e organelas celulares, do citoesqueleto e da matriz extracelular. Participam de quase todos os processos biológicos, já que incluem as enzimas, catalisadores das milhares de reações químicas que ocorrem nos organismos. Outra função dinâmica das proteínas é o transporte de moléculas (oxigênio, lipídios etc.) e íons pelo plasma e a transferência destes compostos através das membranas. Os mecanismos de defesa do organismo incluem diversas proteínas, como as imunoglobulinas e o interferon, que atuam no combate a infecções bacterianas e virais. Muitas proteínas participam do controle global do metabolismo, devido à sua ação hormonal, como é o caso da insulina e do glucagon. São também responsáveis por mecanismos contráteis, sendo de particular importância a actina e a 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 às extremidades dos genes, sinalizando o início e o término corretos da transcrição. Estas proteínas são capazes de reconhecer, no genoma de mamíferos, o sítio regulador de um determinado gene, dentre dezenas de milhares de genes diferentes.

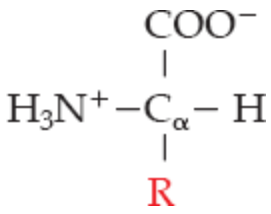
2.1 Aminoácidos componentes de proteínas

As proteínas são polímeros de aminoácidos

Apesar de apresentarem estruturas e funções tão variadas, as proteínas são sintetizadas a partir de apenas 20 aminoácidos diferentes. Ainda que o número dos monômeros precursores pareça pequeno, as possibilidades de existirem proteínas distintas são espantosamente grandes. Considerando-se a formação de proteínas hipotéticas contendo somente 20 aminoácidos, um de cada tipo, poderiam ser obtidas $2{,}4 \times 10^{18}$ moléculas diferentes! Como as proteínas são compostas por centenas de aminoácidos, cada um deles podendo estar representado mais de uma vez, a possibilidade de construção de moléculas diferentes é praticamente infinita.

Os aminoácidos diferem entre si pela cadeia lateral

Aminoácidos são compostos que apresentam, na sua molécula, um *grupo amino* (− NH_2) e um *grupo carboxila* (– COOH). Entre os aminoácidos que compõem as proteínas, a única exceção é a prolina, que contém um grupo imino (– NH –) no lugar do grupo amino, sendo a rigor um *iminoácido*. Em pH fisiológico, esses grupos estão na forma ionizada: – NH_3^+, – COO^- e – NH_2^+. Os aminoácidos têm uma fórmula básica comum, com os grupos amino e carboxila 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 a afinidade pela água — são importantes para a conformação das proteínas e, portanto, para sua função. De acordo com a polaridade do grupo R, os aminoácidos são classificados em duas grandes categorias: aminoácidos apolares (grupo R hidrofóbico) e aminoácidos polares (grupo R hidrofílico) (Figura 2.1).

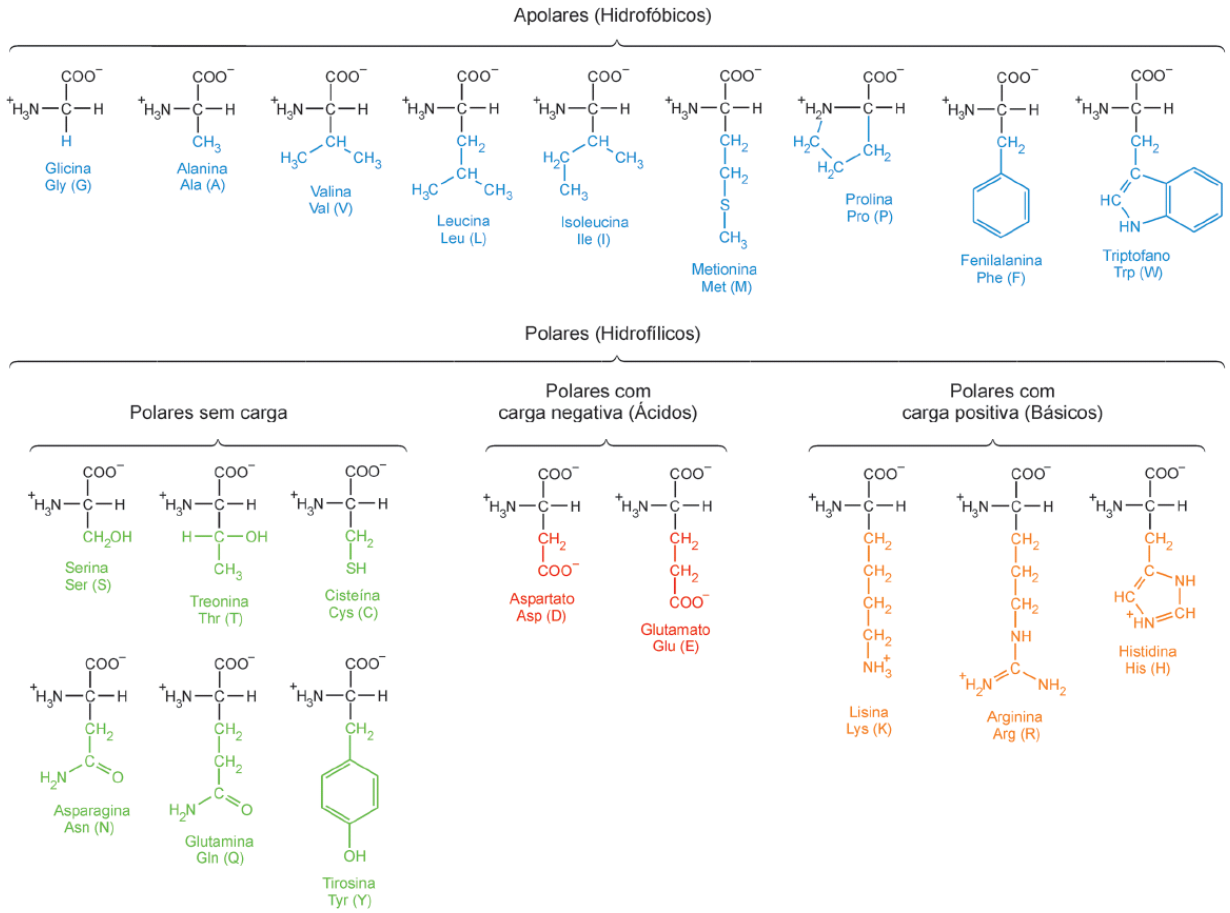


Figura 2.1 Estrutura e classificação dos aminoácidos.

Os aminoácidos *apolares* têm grupos R com caráter de hidrocarboneto, que não interagem com a água; por isso, frequentemente localizam-se no interior da molécula proteica. Pertencem a este grupo: *glicina*, *alanina*, *valina*, *leucina*, *isoleucina*, *metionina*, *prolina*, *fenilalanina* e *triptofano*.

Os aminoácidos *polares* 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 pH 7: *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 da lisina (amino, com pK_a = 10,54) e da arginina (guanidino, com pK_a = 12,48) mostra que, em pH

neutro, esses grupos estão protonados e com carga positiva (Tabela 2.1). A cadeia lateral da histidina (grupo imidazólico, com pK_a = 6,04) está muito menos ionizada em pH 7; como o valor de seu pK_a está uma unidade abaixo deste pH, apenas 10% das moléculas de histidina estarão com o grupo R protonado (ver a equação de Henderson-Hasselbalch, Seção 1.3) e com carga positiva.

Os aminoácidos ácidos são os dicarboxílicos: *aspartato* e *glutamato*. Os valores de pK_a das carboxilas de suas cadeias laterais são 3,90 e 4,07, respectivamente, e em pH neutro, estão desprotonadas e com carga negativa.

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 sulfidrila. Em pH neutro, o grupo sulfidrila da cadeia lateral da cisteína (pK_a = 8,37) está predominantemente protonado, sem carga; assim também se encontra o grupo fenólico da tirosina (pK_a = 10,46).

O valor do pK_a de um grupo ionizável é determinado pela estrutura da molécula da qual faz parte, mas sofre influência de grupos adjacentes. Por isto, um mesmo grupo pode apresentar valores diferentes de pK_a dependendo da região da proteína em que se encontra. A Tabela 2.1 apresenta os valores mais usuais de pK_a que os aminoácidos podem apresentar quando estão unidos, formando proteínas.

Tabela 2.1 Valores de pK_a dos aminoácidos livres (em solução aquosa) ou incorporados em proteínas (carboxila e amino terminais e grupos R).

Aminoácidos livres	pK_1 (α– COO^-)	pK_2 (α– NH_3^+)	pK_R(grupo R)
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		Aminoácidos em proteínas		
Asparagina	2,14	8,72		COO^- terminal	NH_3^+ terminal	Grupos R
Glutamina	2,17	9,13		3,5–4,0	7,6–9,0	
Cisteína	1,92	10,70	8,37			8,0–9,0
Tirosina	2,20	9,21	10,46			9,5–10,5
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

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: – NH_3^+, – 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, os isômeros D e L, que são imagens especulares um do outro (Figura 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.

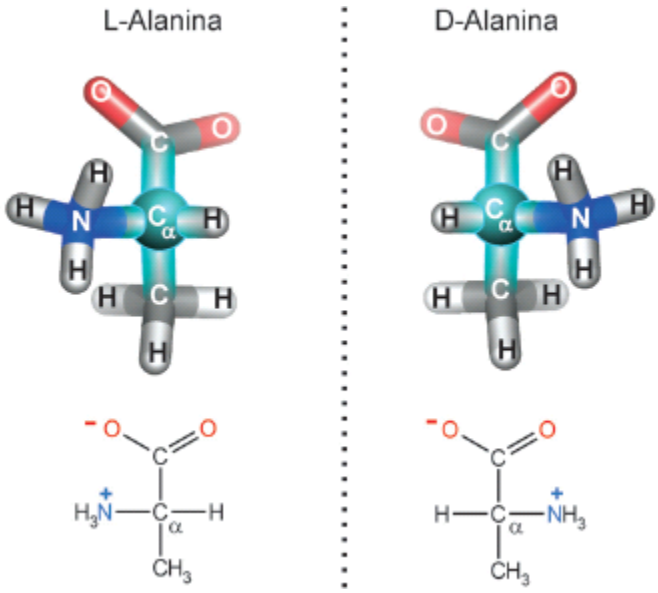
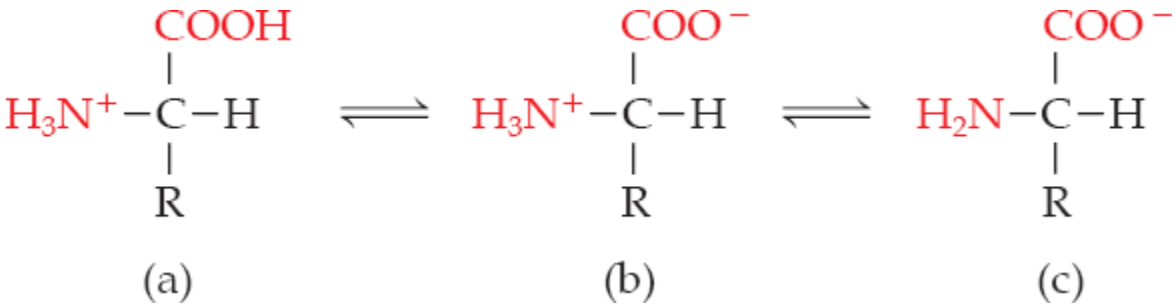


Figura 2.2 Isômeros L e D da alanina, em duas representações moleculares diferentes. A linha pontilhada indica o plano de um espelho.

2.2 Ionização dos aminoácidos

Dependendo do pH do meio, os aminoácidos podem existir nas formas seguintes:



Como se deduz pelos valores de seus pK_a (Tabela 2.1), em soluções muito ácidas, os dois grupos apresentam-se protonados (a); em soluções muito alcalinas, ambos apresentam-se desprotonados (c); e, em soluções neutras 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, a sua curva de titulação (Figura 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 (Seção 1.3). Esta semelhança é resultado da presença do grupo carboxila e do grupo amino na mesma molécula. 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 apresentam 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, correspondente ao seu terceiro pK_a. Isto ocorre com os aminoácidos ácidos, básicos, cisteína e tirosina.

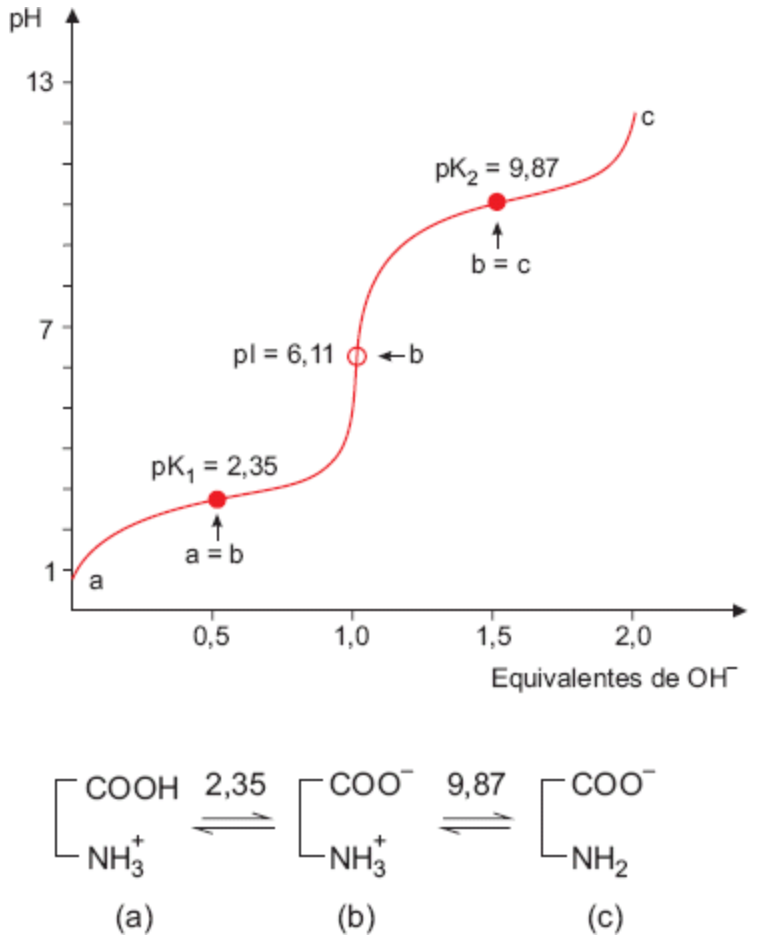


Figura 2.3 Curva de titulação da alanina e esquema de suas formas iônicas *a*, *b*, *c*.

Ponto isoelétrico é um valor de pH

A carga elétrica total da molécula de um aminoácido resulta da soma algébrica das cargas apresentadas pelos seus grupos ionizáveis, as quais, por sua vez, dependem dos valores de seus pK_a e do pH do meio.

A curva de titulação de um aminoácido monoamínico e monocarboxílico, representada na Figura 2.3, inicia-se em pH muito baixo, menor do que o pK_a do grupo carboxila. Nesta situação, 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, consequentemente, a concentração da forma com uma carga negativa e uma positiva, a forma eletricamente neutra

(forma *b*). Prosseguindo a adição de álcali, o valor do pH continua aumentando, promovendo a dissociação do grupo amino e o aumento da concentração da forma com carga negativa (forma *c*).

A forma eletricamente neutra (forma *b*) predomina nos valores de pH acima do pK_a do grupo carboxila e abaixo do pK_a do grupo amino e é mais abundante no pH equidistante dos dois valores de pK_a. Neste pH, há quantidades extremamente pequenas, mas iguais, da forma *a* (com carga positiva) e *c* (com carga negativa), ou seja, há perfeita compensação isoelétrica. Este valor de pH é definido como *ponto isoelétrico* (pI) do aminoácido. No pH equivalente ao pI, os aminoácidos comportam-se como moléculas neutras: não migram quando submetidos a um campo elétrico (Seção 2.10.2).

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): a carga negativa do grupo carboxila desprotonado será compensada pela carga positiva do grupamento amino protonado. O pH em que esta é a situação da enorme maioria das moléculas 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.

Generalizando, o pH em que a forma eletricamente neutra do aminoácido é mais abundante, o ponto isoelétrico (pI) é a média aritmética de dois valores de pK_a:

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

Os valores de pK_{a1} e pK_{a2} a serem considerados no cálculo do pI dependem do aminoácido. Para os que não contêm grupamentos ionizáveis

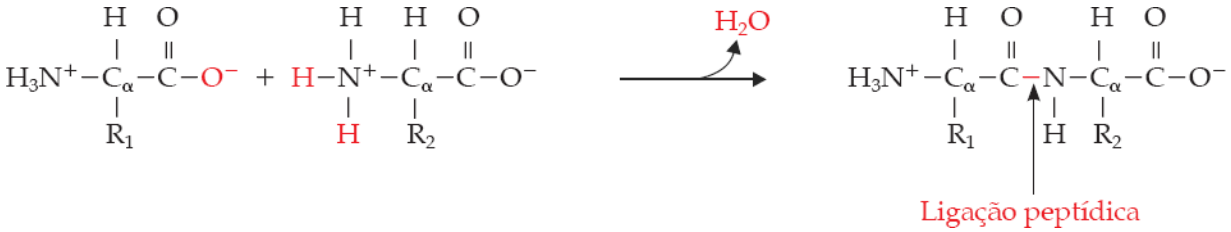
na cadeia lateral, utilizam-se os valores de pK_a dos grupos amino e carboxila; para aminoácidos com três grupamentos ionizáveis, usam-se os valores de pK_a dos grupos com mesmo sinal de carga. A única exceção a esta regra é a *tirosina*, que apresenta valores de pK_a iguais a 2,20 (carboxila), 9,21 (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 isoelétrico 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 revela que eles não apresentam poder tamponante significativo em pH fisiológico. Todavia, quando fazem parte de uma proteína, o valor de pK_a de suas cadeias laterais e dos grupos carboxila e amino terminais da proteína (Tabela 2.1) podem sofrer variações consideráveis, em relação ao seu valor no aminoácido livre. Essas alterações resultam das características do microambiente existente na região da proteína onde o aminoácido se encontra: polaridade, determinada pela proximidade de grupamentos com carga, exclusão de moléculas de água, como ocorre no interior da molécula proteica, e possibilidade de formação de ligações de hidrogênio (Seção 2.4). 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.

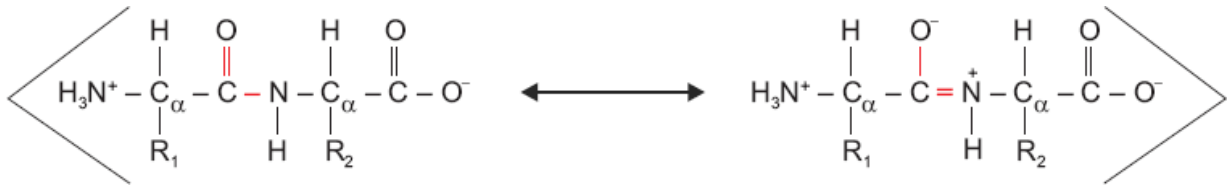
2.3 Polímeros de aminoácidos: peptídios e proteínas

Os aminoácidos podem formar polímeros lineares pela ligação do grupo α-carboxila de um aminoácido com o grupo α-amino de outro. Esta ligação carbono-nitrogênio é uma ligação *amídica*, chamada, no caso das proteínas, de *ligação peptídica*. É obtida, teoricamente, por exclusão de uma molécula de água e sua formação pode ser representada pela seguinte equação:



Esta reação, como está escrita, ***jamais*** ocorre, pois não é termodinamicamente viável. Nos seres vivos, a ligação peptídica não é feita por reação direta entre os aminoácidos, mas por um complexo aparato de síntese proteica, que inclui ribossomos, ácidos ribonucleicos, várias proteínas e enzimas. A síntese compreende uma sequência de etapas, envolvendo um expressivo gasto de ATP, que viabiliza termodinamicamente o processo. A equação é apenas um esquema didático para descrever a formação da ligação peptídica.

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



A consequência desse caráter parcial de dupla ligação é não haver possibilidade de rotação em torno da ligação peptídica. 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 retângulo na Figura 2.4 a). Todavia, existem pontos de dobramento entre as unidades peptídicas, graças à possibilidade de rotação (indicada por setas na Figura 2.4 b) em torno das ligações com o carbono α (C_α– C e C_α – N), que são ligações efetivamente simples.

O polímero de aminoácidos pode, então, ser visualizado como uma cadeia constituída por unidades planares, as unidades peptídicas, ligadas por uma articulação flexível — o carbono α (Figura 2.4 c). Esta cadeia chama-

se *cadeia polipeptídica*, que, graças a esse arranjo estrutural, pode dobrar-se de muitas maneiras diferentes.

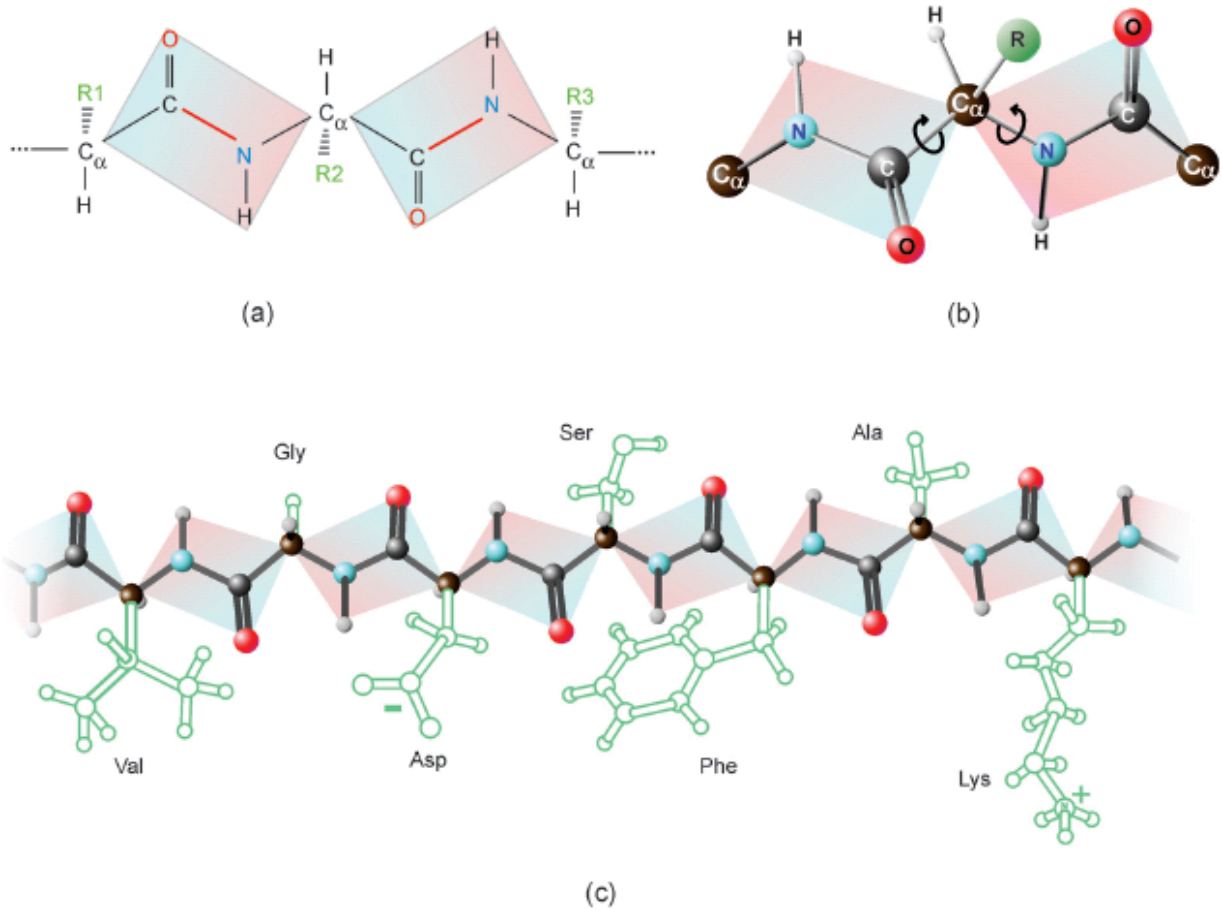


Figura 2.4 Cadeia polipeptídica. a) Unidade peptídica, com a ligação peptídica em vermelho. b) Rotação das unidades peptídicas em torno do carbono α. c) Segmento de uma cadeia polipeptídica, com as cadeias laterais dos aminoácidos em verde.

A cadeia polipeptídica pode conter um número variável de aminoácidos (ou, mais rigorosamente, *resíduos de aminoácidos*, já que, na formação de 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 chamados de *oligopeptídios*; quando o número é maior, podendo chegar a centenas ou milhares, são chamados de *polipeptídios*. As cadeias polipeptídicas que podem ser associadas a uma função recebem a

designação de *proteínas*. 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, além dos grupos R dos aminoácidos.

Muitos peptídios encontrados na natureza desempenham funções importantes, atuando como hormônios (encefalinas, oxitocina, vasopressina, glucagon), antibióticos (gramicidina), agentes redutores (glutationa) etc. (Tabela 2.2). Peptídios sintéticos têm aplicações diversas; 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 grupo metila.

Tabela 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 sanguínea 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 *Bacillus brevis*	Antibiótico
Glutationa	3	Maioria das células	Proteção de grupos SH de proteínas, manutenção do Fe^{2+} da hemoglobina e dissipação de H_2O_2

As *proteínas* podem ser formadas por uma ou mais cadeias polipeptídicas e contêm, geralmente, mais de 50 aminoácidos. A maior cadeia polipeptídica conhecida de uma proteína é a *titina*, também chamada *conectina*, uma proteína estrutural de músculos estriados (Tabela 2.3); a

fórmula molecular da isoforma mais comum é $C_{169.723}H_{270.464}N_{45.688}O_{52.243}S_{912}$. As proteínas desempenham uma função específica e, com poucas exceções (colágeno, Seção 2.5), contêm todos os 20 aminoácidos, em proporções que variam muito de proteína para proteína (Tabela 2.4). Cada proteína apresenta uma estrutura tridimensional definida e característica. Apesar de existirem inúmeras conformações teoricamente possíveis, todas as moléculas de uma dada proteína assumem a mesma conformação espacial. Esta configuração, entretanto, não é permanentemente fixa, e, muitas vezes, alterações estruturais transitórias estão relacionadas com o controle da função desempenhada pela proteína.

Tabela 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 (equina)	153	1
Hemoglobina (humana)	574	4
Aspartato transcarbamoilase (*E. coli*)	2.700	12
RNA polimerase (*E. coli*)	4.100	5
Titina (humana)	34.530	1

Tabela 2.4 Composição em aminoácidos de três proteínas.

	Número de aminoácidos por molécula de proteína		
Aminoácido	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

As proteínas são classificadas como globulares ou fibrosas, segundo sua forma. As *proteínas globulares* apresentam uma ou mais cadeias polipeptídicas organizadas em uma forma final aproximadamente esférica; são geralmente solúveis e desempenham funções dinâmicas. As *proteínas fibrosas* têm forma alongada, são geralmente insolúveis e desempenham um papel basicamente estrutural nos sistemas biológicos.

2.4 Estrutura das proteínas

A sequência de aminoácidos determina a estrutura espacial da proteína

A organização espacial[1] da proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. A sequência dos aminoácidos irá determinar o tipo de interação possível entre as cadeias laterais, que apresentam características de carga, volume e reatividade com a água muito variáveis. A organização tridimensional de uma proteína, desde a sequência de aminoácidos, passando pelo enrolamento da cadeia polipeptídica até a associação de várias cadeias, pode ser descrita em níveis estruturais de complexidade crescente.

Nesta seção, as estruturas tridimensionais descritas referem-se às proteínas globulares.

A estrutura das proteínas pode ser descrita em quatro níveis

A ***estrutura primária*** é a sequência de aminoácidos da cadeia polipeptídica, determinada geneticamente e específica para cada proteína. Por convenção, a estrutura primária é escrita na direção amino terminal → carboxila terminal. Exemplificando, os peptídios 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, o da lisina[2].

A ***estrutura secundária*** descreve as estruturas tridimensionais regulares, 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, α-hélice e folha β pregueada. A extensão do segmento 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 *ligações de hidrogênio*[3] entre o nitrogênio e o oxigênio dos grupos – NH e – C = O, constituintes das unidades peptídicas. Embora a ligação de hidrogênio seja uma interação fraca, o elevado número destas ligações confere grande estabilidade a essas estruturas.

A α-*hélice* é mantida por ligações de hidrogênio formadas entre uma unidade peptídica e a quarta unidade peptídica subsequente; estas ligações

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 (Figura 2.5). As cadeias laterais dos aminoácidos 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, muitas sequências diferentes de aminoácidos podem adotar esta configuração e sua estabilidade independe do tipo de cadeia lateral, mas até certo ponto — certas sequências 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 ligação de hidrogênio — este aminoácido é geralmente encontrado entre segmentos em α-hélice.

A *folhaβpregueada* ou *conformaçãoβ* é uma estrutura também mantida por ligações 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. Na folha β pregueada, as cadeias apresentam uma conformação maisdistendida que na α-hélice e dispõem-se lado a lado, o que atribui a essa estrutura o aspecto de uma folha de papel pregueada. As ligações 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 (Figura 2.6).

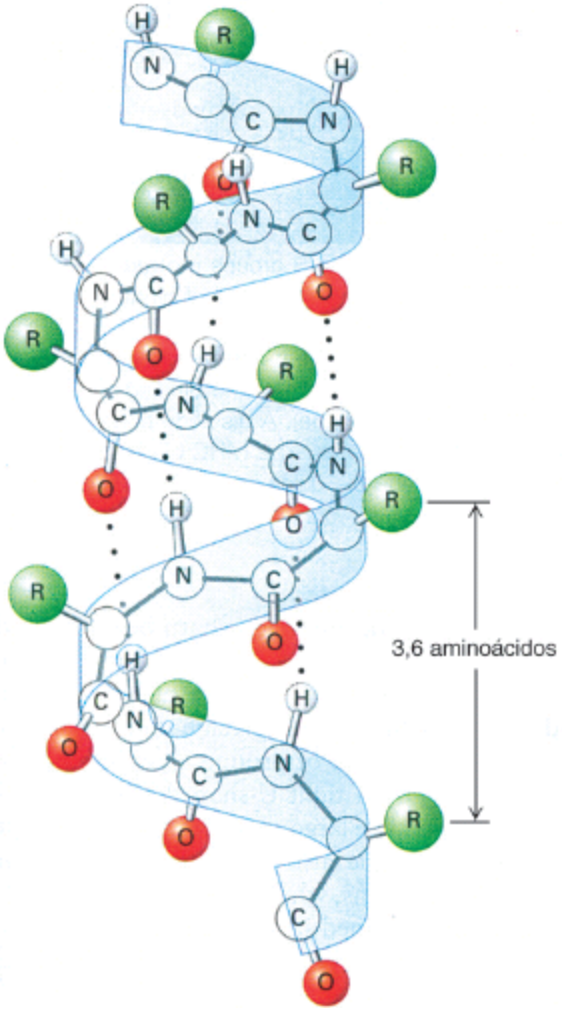


Figura 2.5 Modelo da α-hélice: a cadeia polipeptídica forma uma espiral, estabilizada por pontes de H entre os grupos – C = O e – NH das ligações peptídicas. As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos dispõem-se no exterior da hélice. (Adaptada de Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J: *Molecular Cell Biology*, 5th ed. W. H. Freeman and Company, 2004.)

Os dois tipos principais de estruturas secundárias regulares (α-hélice e folha β pregueada) ocorrem nas proteínas em proporções muito diversas. Um exemplo extremo é a *mioglobina* — uma proteína de músculo transportadora de oxigênio — que apresenta cerca de 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 (Figura 2.7). No outro extremo aparecem proteínas como a *concanavalina A*[4], que tem alto conteúdo de folha β pregueada e não forma α-hélice (Figura 2.8). A maioria das proteínas exibe os dois tipos de estrutura secundária, como acontece com a *toxina diftérica* (Figura 2.9), produzida por uma bactéria que infecta o trato respiratório superior de seres humanos.

Cada proteína tem um conteúdo próprio de α-hélice e de folha β pregueada, determinado pela sua estrutura primária. No entanto, um exemplo dramático e excepcional de alteração da estrutura de proteínas acontece no caso do *príon* (do inglês *prion*, derivado de *proteinaceous infectious particle*). Trata-se de uma partícula infecciosa constituída apenas de proteína — diferindo, portanto, dos agentes infecciosos conhecidos, capazes de se replicar porque contêm DNA ou RNA, como protozoários, bactérias e vírus —, responsável por encefalopatias transmissíveis em mamíferos. Alguns exemplos são: *encefalopatia espongiforme bovina* (*doença da vaca louca*), *scrapie*, uma moléstia semelhante que afeta ovelhas e a doença de Creutzfeldt-Jakob, em seres humanos. A incidência da moléstia no rebanho bovino atingiu proporções epidêmicas na Inglaterra na década de 1990, devido ao hábito de alimentar o gado com rações preparadas com carne e ossos derivados, inadvertidamente, de animais infectados. Estes animais apresentavam parte das moléculas da proteína *PrP* (de ***Pr****ion* ***P****rotein*) com estrutura alterada; esta proteína, na sua forma normal, ocorre no cérebro de animais sadios e sua função ainda é desconhecida. As moléculas modificadas da proteína *PrP* são os príons, capazes de converter a proteína PrP normal em novos príons. As mudanças consistem em aumento do conteúdo de folha β pregueada e redução daquele de α-hélice, além de agregação das moléculas. Resultam os sintomas característicos — disfunções motoras e extensa degeneração do tecido nervoso — e a morte do animal infectado. A transmissão das encefalopatias causadas por príons ocorre interespécies, como ficou demonstrado com a identificação de uma variante da doença de Creutzfeldt-Jakob, uma moléstia de ocorrência rara, em seres humanos que consumiram a carne de gado infectado. Outras doenças neurodegenerativas mais comuns, como as doenças de Alzheimer e Parkinson, estão igualmente associadas a agregados de proteínas anormais.

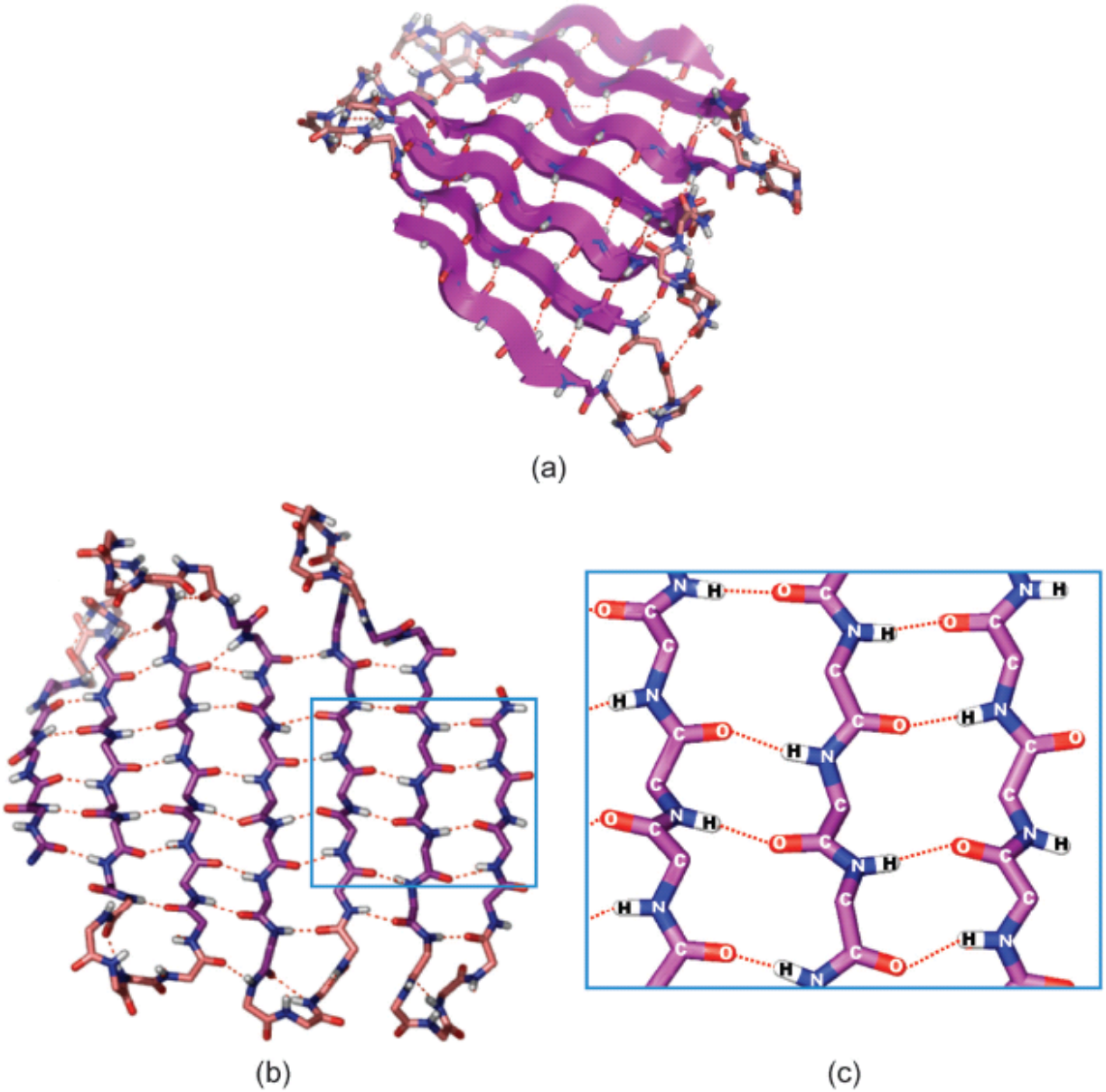


Figura 2.6 Folha β pregueada. a) Esquema de parte da molécula de uma proteína — os segmentos da cadeia polipeptídica com este tipo de estrutura secundária são simbolizados por setas onduladas que apontam na direção amino terminal → carboxila terminal. b) Representação plana dos dobramentos da cadeia polipeptídica e da disposição paralela dos diversos segmentos que, associados por ligações de H intracadeia, formam a folha β pregueada. c) Detalhamento mostrando os grupos que estabelecem as ligações de H. Não estão representadas as cadeias laterais dos aminoácidos.

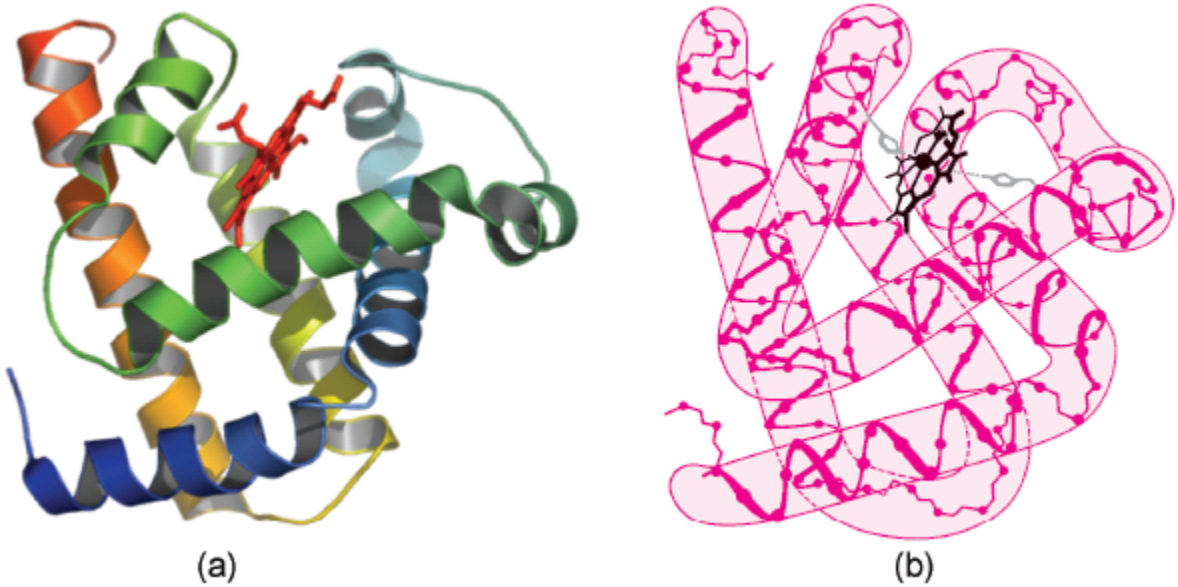


Figura 2.7 Modelos da mioglobina mostrando: os diversos trechos em α-hélice (representados por espirais), alternados por segmentos desenrolados (a); os dobramentos da cadeia da mioglobina, onde as esferas representam o carbono α dos resíduos de aminoácidos (b). A cadeia polipeptídica liga-se ao grupo heme — vermelho em (a) e preto em (b) —, descrito no Capítulo 3.

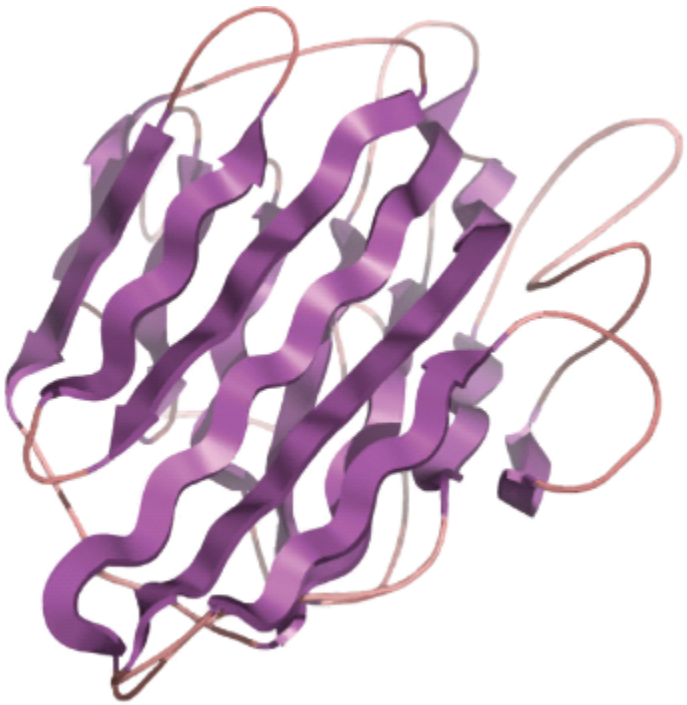


Figura 2.9 Estrutura da toxina diftérica, que apresenta segmentos em α-hélice, em folha β pregueada e sem estrutura regular, organizados em três domínios, representados em cores diferentes.

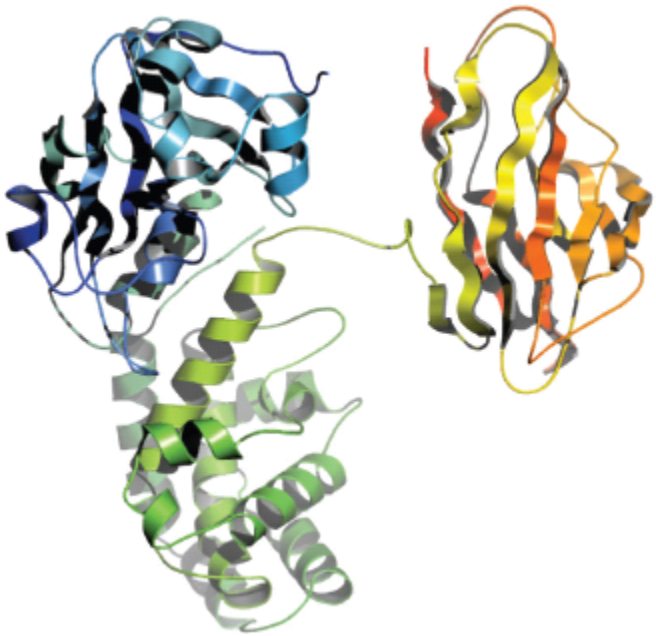


Figura 2.8 Concanavalina A, uma proteína que se organiza, predominantemente, em folha β pregueada.

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. Neste nível de organização (Figuras 2.7 a 2.9), segmentos distantes da estrutura primária podem se aproximar e interagir, por intermédio de ligações não covalentes entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Estas ligações são consideradas fracas (4 a 30 kJ · mol^{-1}), quando comparadas a ligações covalentes (200 kJ · mol^{-1}). Como ocorre com as ligações 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 (Figura 2.10): ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações iônicas ou salinas e forças de van der Waals.

— *Ligações de hidrogênio*. Estabelecidas entre grupos R de aminoácidos polares com ou sem carga. Por exemplo, serina e treonina, que apresentam grupo hidroxila, podem formar ligações de hidrogênio com asparagina ou glutamina, que apresentam grupo carbonila. As ligações de hidrogênio da estrutura terciária, naturalmente, não apresentam um padrão regular de disposição, ao contrário do que ocorre com as ligações de hidrogênio da estrutura secundária, com as quais não devem ser confundidas.
— *Interações hidrofóbicas*. Formadas entre as cadeias laterais hidrofóbicas dos aminoácidos apolares. Estas cadeias não interagem com a água e aproximam-se, reduzindo a área apolar exposta ao solvente. As interações hidrofóbicas não resultam de qualquer atração entre os grupos apolares, mas são consequência da presença da molécula proteica no ambiente aquoso celular — a maioria das cadeias hidrofóbicas localiza-se no interior da molécula proteica. As interações hidrofóbicas são as mais importantes para a manutenção da conformação espacial das proteínas, dado o grande número (nove) de aminoácidos hidrofóbicos.
— *Ligações iônicas ou salinas*. Incluem interações de grupos com cargas opostas, como os presentes nos aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) e ácidos (aspartato e glutamato). A energia de formação das ligações iônicas tem magnitude semelhante à das ligações dos grupos iônicos com a água, não contribuindo, portanto, para a conformação da molécula proteica quando estão localizados na sua superfície. Estas ligações, entretanto, têm importância fundamental para o dobramento da cadeia polipeptídica quando ocorrem no interior apolar da proteína. Todavia, esta situação não é muito frequente: a maioria dos grupos carregados de uma proteína localiza-se em sua superfície, estabelecendo interações íon-dipolo com a água, que forma uma camada organizada em volta da molécula proteica, a *camada de solvatação*.
— *Forças de van der Waals*. São a resultante das forças de atração e repulsão entre partes de moléculas. Inclui as forças entre dipolos permanentes e dipolos induzidos, encontrados nas cadeias laterais

dos aminoácidos.

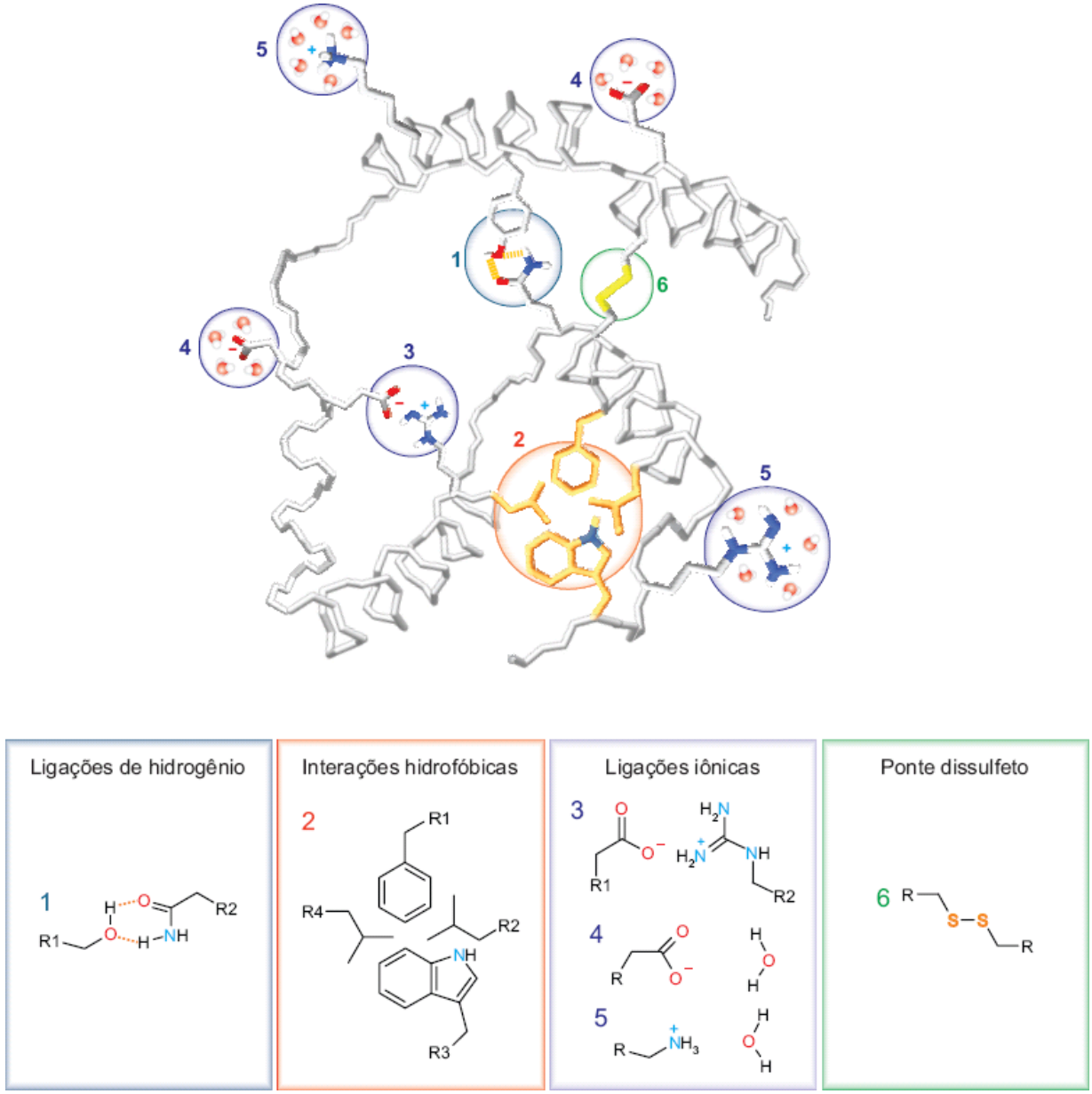


Figura 2.10 Ligações da estrutura terciária de uma proteína globular: ligações não covalentes — ligações de hidrogênio (1), interações hidrofóbicas (2) e ligações iônicas (3) — e uma ligação covalente, a ponte dissulfeto (6). Estão mostradas, ainda, as ligações iônicas entre cadeias laterais dos aminoácidos com carga e dipolos da água (4, 5).

Além das ligações não covalentes, a estrutura proteica pode ser estabilizada por uma ligação covalente (Figura 2.10), a *ponte dissulfeto* (– S – S –), formada entre dois resíduos de cisteína por uma reação de oxidação catalisada por enzimas específicas. Pontes dissulfeto são raramente encontradas em proteínas intracelulares, sendo mais frequentes em proteínas secretadas para o meio extracelular. Este é o caso da insulina, que apresenta três pontes dissulfeto (Figura 19.10 — Seção 19.4).

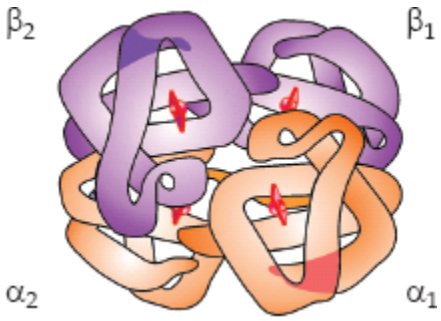


Figura 2.11 A estrutura quaternária da hemoglobina consiste na associação de duas cadeias α e duas cadeias β, cada uma associada a um grupo heme (em vermelho).

A ***estrutura quaternária*** descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades), para compor uma proteína funcional. A estrutura quaternária é mantida geralmente 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 ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (Figura 2.11).

A estrutura terciária pode conter domínios e motivos

A estrutura terciária pode apresentar padrões de elementos estruturais, que se repetem em proteínas diferentes, chamados de domínios e motivos.

Domínios são regiões diferenciadas da molécula proteica, com organização espacial compacta; cada domínio é um conjunto estrutural

definido, formado por dobramentos da cadeia polipeptídica. Geralmente, cadeias polipeptídicas longas, com centenas de resíduos de aminoácidos, são as que se organizam em domínios.

O grau de interação entre domínios pode variar desde domínios ligados por um segmento flexível da cadeia polipeptídica (Figura 2.9), até aqueles que estabelecem um contato muito íntimo, separados apenas por uma fenda estreita. 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. Em muitas enzimas, a ligação com a molécula de substrato ocorre em fendas situadas entre domínios; estes se aproximam, encaixando o substrato na molécula da enzima (Figura 5.4, Seção 5.1).

Os domínios frequentemente desempenham ações específicas; em inúmeras reações do metabolismo, o substrato liga-se a um dos domínios da enzima e a coenzima a outro. Em proteínas diferentes, domínios com a mesma função têm estruturas semelhantes, o que permite prever a atividade de uma proteína desconhecida a partir do conhecimento de seus domínios.

Motivos são diferentes formas de organização de elementos da estrutura secundária de proteínas globulares. Cada motivo tem um padrão de dobramento característico, que envolve interação entre segmentos da cadeia polipeptídica em α-hélice e/ou folha β pregueada. Os mesmos motivos se repetem em proteínas de origens muito diferentes.

Os motivos podem ser constituídos por arranjos de α-hélices, folhas β pregueadas ou por combinações das duas. Numerosos receptores da superfície celular, por exemplo, são compostos por sete α-hélices que atravessam a membrana plasmática (Figura 2.12); são responsáveis por receber os sinais que iniciam o processo de transdução, envolvido em fenômenos tão diversos quanto a visão, o paladar, o olfato e a atividade hormonal (Seção 19.3). Outro motivo complexo, chamado β *barril*, resulta da associação de numerosos segmentos em folha β pregueada. É encontrado na família das *porinas* (Figura 2.13), que formam canais na membrana externa de bactérias gram-negativas e de mitocôndrias, destinados ao transporte de íons e moléculas pequenas, como nucleosídios ou açúcares.

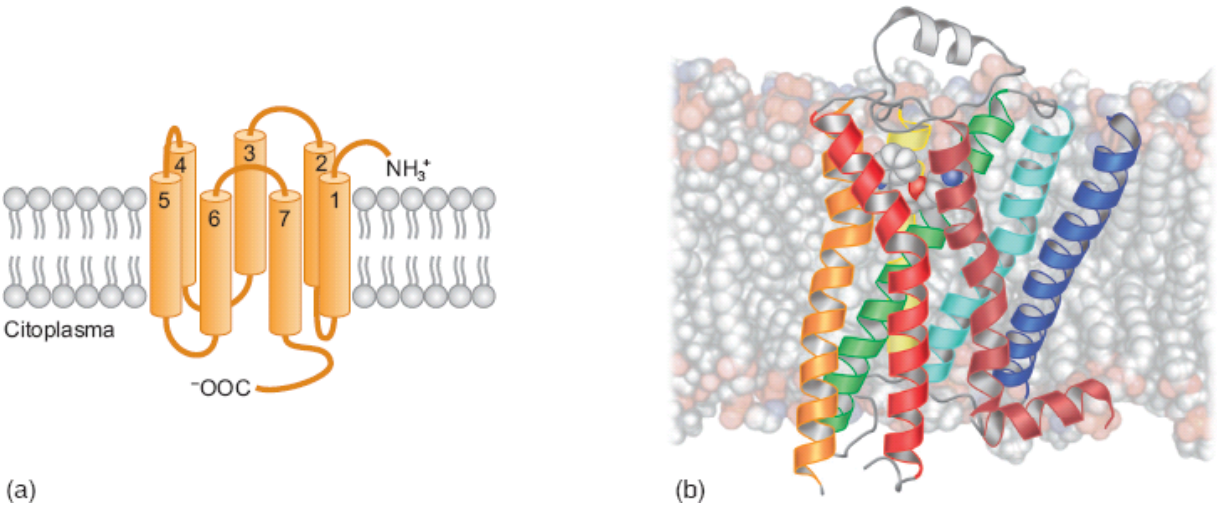


Figura 2.12 Estrutura de um receptor com sete segmentos em α-hélice (numeradas de 1 a 7), que atravessam a membrana plasmática. a) Representação esquemática. b) Estrutura tridimensional do receptor adrenérgico β_2.

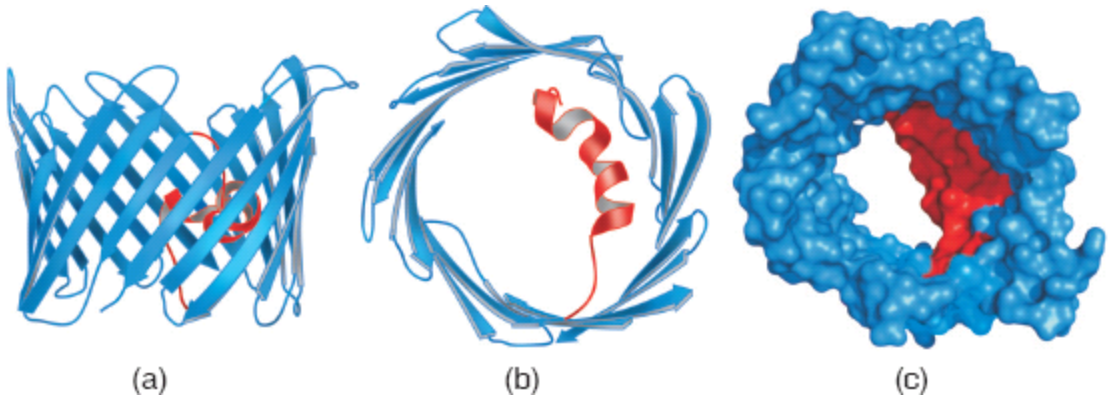


Figura 2.13 Estrutura de uma porina mitocondrial, o canal iônico voltagem-dependente *mVDAC1*, contendo um motivo em β barril (em azul) e uma hélice na extremidade amino terminal (em vermelho). Vista lateral (a) e superior (b) da proteína na representação em fitas; no centro, vista superior da representação de volumes atômicos (c).

2.5 Proteínas fibrosas

As proteínas fibrosas têm forma alongada e, diferentemente 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 pele dos vertebrados e de estruturas relacionadas, como cabelo, lã, chifres, unhas, cascos, bicos e penas. Nestas proteínas, são frequentes as 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. Os tratamentos estéticos, visando tornar o cabelo mais liso ou mais crespo, utilizam o mesmo procedimento, embora pretendam resultados opostos: desfazer as pontes dissulfeto por tratamento com agentes redutores e refazê-las em novas posições por tratamento com agentes oxidantes, depois de posicionar os fios de cabelo na conformação desejada. 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 peculiar em aminoácidos — alto conteúdo de glicina, prolina e de hidroxiprolina, um aminoácido derivado de prolina — e da grande regularidade na estrutura primária, sendo frequente a sequência glicina-prolina-hidroxiprolina. Estas características, diferentes da maioria das proteínas, permitem a associação íntima de três cadeias formando uma hélice tripla, o *tropocolágeno*, 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 e entre moléculas de tropocolágeno adjacentes (Figura 2.14). O colágeno é a proteína mais abundante dos vertebrados. Suas fibras são responsáveis pelas funções mecânicas e de sustentação do tecido conjuntivo, que se distribui por cartilagens, tendões, matriz óssea, córnea etc.; mantém, ainda, a estrutura e a elasticidade do sistema vascular e de todos os órgãos. O

número de ligações covalentes do colágeno varia conforme o tecido e aumenta com a idade do animal (o que explica a maior rigidez da carne de animais mais velhos). A estrutura do colágeno é rompida por aquecimento, originando uma proteína desenrolada, mais solúvel, a *gelatina*. Este é o princípio da fabricação industrial desta proteína, muito frequente na dieta humana. O baixo valor nutricional da gelatina está analisado no Capítulo 18.

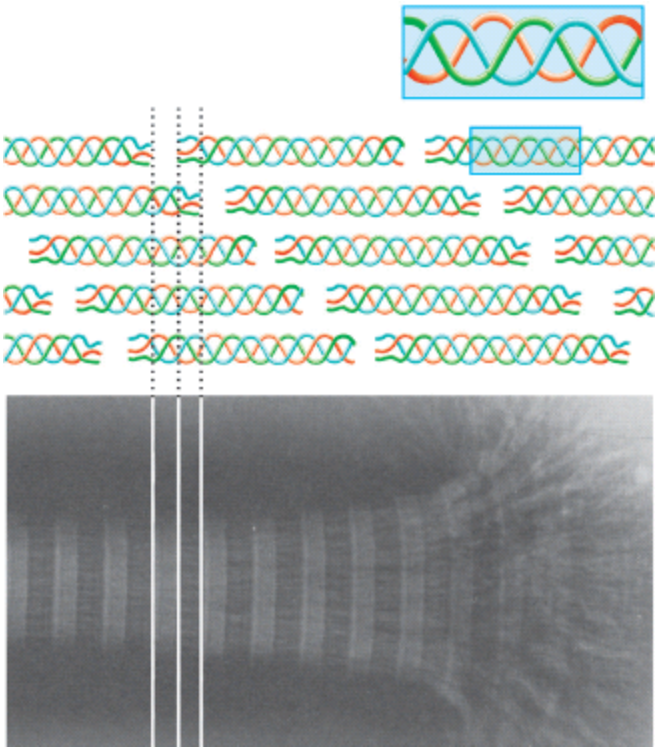


Figura 2.14 Associação de moléculas de tropocolágeno para formar fibrilas de colágeno: as moléculas ficam deslocadas umas em relação às outras, o que atribui, à fibrila de colágeno, um aspecto estriado ao microscópio eletrônico. As ligações covalentes que estabilizam o colágeno foram omitidas.

2.6 Proteínas conjugadas

As proteínas podem apresentar aminoácidos modificados e componentes não proteicos

Muitas proteínas contêm resíduos de determinados aminoácidos modificados, além dos 20 usuais. Esses aminoácidos exóticos não são codificados nos RNAs mensageiros; formam-se por alteração enzimática de aminoácidos comuns, após serem incorporados na cadeia polipeptídica que está sendo sintetizada.

No colágeno, é frequente a hidroxilação da cadeia lateral de prolina. A reação enzimática que produz esta modificação 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 nos diferentes 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 do grupo hidroxila de serina, treonina e tirosina. A adição e a remoção de grupos fosfato é um fenômeno cíclico frequentemente encontrado em proteínas com função enzimática. A fosforilação altera profundamente a atividade destas enzimas (Seção 19.2.2).

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. As *hemoproteínas*, como mioglobina, hemoglobina, catalase e citocromos, apresentam um grupo prostético denominado *heme*. Na mioglobina (Figura 2.7), o heme liga-se não covalentemente à cadeia polipeptídica, o mesmo acontecendo com cada uma das quatro subunidades da hemoglobina (Figura 2.11); a estrutura do grupo heme está mostrada na Figura 3.2. 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 (Seção 7.3). Outras proteínas importantes como o interferon e alguns hormônios também são glicoproteínas; até o colágeno contém pequenas porcentagens de açúcares covalentemente ligados. A hemoglobina, em determinadas condições, pode ligar-se à glicose, formando a *hemoglobina glicada* (Seção 3.5).

Quanto às *lipoproteínas*, devem-se distinguir as proteínas que apresentam algumas moléculas de lipídios covalentemente ligados das *lipoproteínas plasmáticas*. As primeiras são proteínas conjugadas no sentido estrito, como as lipoproteínas da parede celular de certas bactérias que contêm moléculas de ácidos graxos unidos por ligações covalentes. As lipoproteínas plasmáticas (Seção 6.2.7), por sua vez, são partículas 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 (Seção 20.8).

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 presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos e nos grupos amino e carboxila terminais.

Para cada proteína existe um determinado valor de pH — *ponto isoelétrico (pI)* — no qual a molécula é eletricamente neutra. Neste pH, o número de cargas positivas (grupos básicos protonados) equivale ao número de cargas negativas (grupos ácidos desprotonados).

O pI de proteínas, diferentemente do pI dos aminoácidos, não pode ser calculado, de modo simples, 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 (Tabela 2.1). Programas de computador sofisticados permitem grande aproximação no cálculo do ponto isoelétrico de proteínas. O pI das proteínas é de fácil determinação experimental: é o valor de pH no qual elas não migram, quando submetidas a um campo elétrico (Seção 2.10.2).

As proteínas exibem valores de pI que refletem a proporção entre aminoácidos ácidos e básicos em sua composição (Tabela 2.5). Para a pepsina, por exemplo, que tem muito mais aminoácidos ácidos (28%), que aminoácidos básicos (2%), a equivalência de cargas é obtida quando a grande maioria das carboxilas dos aminoácidos ácidos está protonada (sem carga) e apenas uma pequena fração desprotonada (com carga negativa), compensando a carga positiva dos aminoácidos básicos. Esta situação é encontrada em um pH muito baixo: o pI da pepsina é igual a 1. No caso do citocromo *c*, cuja porcentagem de aminoácidos básicos é aproximadamente o dobro daquela de aminoácidos ácidos, o pI é o pH em que cerca da metade dos aminoácidos básicos estão desprotonados, ou seja, um pH alto: o pI do citocromo *c* é igual a 10,6. Proteínas com pI maior que 7 são chamadas *proteínas básicas* e aquelas com pI menor que 7, *proteínas ácidas*. As histonas são proteínas básicas, e no pH celular apresentam-se com carga positiva, o que permite sua ligação ao DNA na formação dos cromossomos.

O abaixamento de pH resulta sempre em aumento da carga positiva da proteína, por ganho efetivo 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 porque grupos ácidos desprotonados adquirem carga negativa e grupos básicos desprotonados perdem carga positiva.

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

	Aminoácidos (%)						
	Ácidos			Básicos			Ácidos / Básicos
	pI	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 *c*	10,6	3,6	5,9	2,2	2,5	15,2	0,5

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, nos quais as moléculas têm todas a mesma carga e se repelem eletrostaticamente, estabilizando-se em solução (Figura 2.15).

As proteínas apresentam também alteração da solubilidade em função da concentração de sais. Proteínas globulares pouco solúveis em água tornam-se cada vez mais solúveis à medida que aumenta a concentração de sal da solução (Figura 2.15), até certa concentração limitante, que depende da proteína e do tipo de sal escolhido (trecho ascendente da curva da Figura 2.16). 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[5]. Por outro lado, quando a concentração de sal atinge valores muito elevados, a solubilidade das proteínas diminui (trecho descendente da curva da Figura 2.16), até sua precipitação. Este efeito, chamado "*salting out*", ocorre com sais di ou trivalentes, que competem com a proteína por moléculas de água para solvatação. Em altas concentrações desses sais, ocorre uma desorganização da camada de solvatação da proteína: 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 (que depende

da extensão da sua camada de solvatação), 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 — $(NH_4)_2SO_4$ — 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.

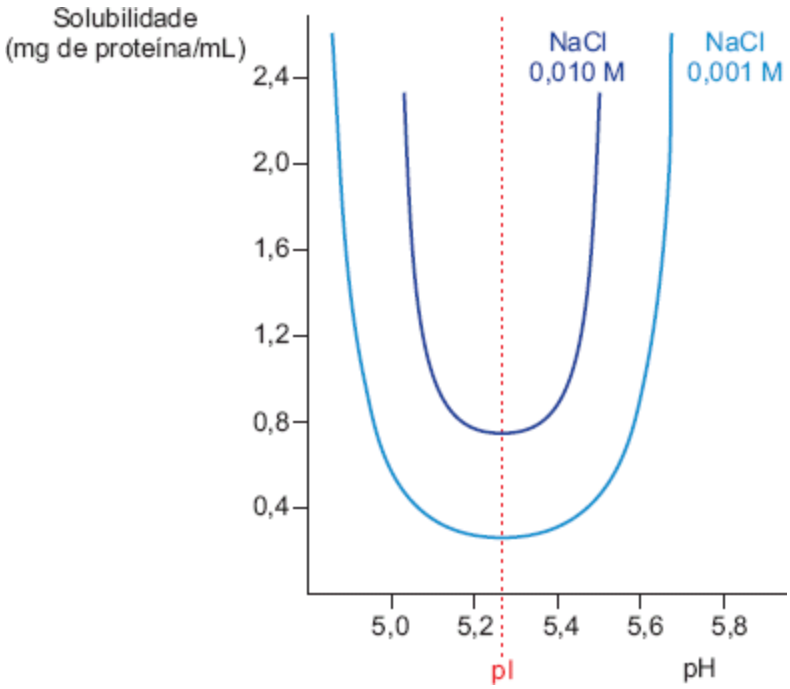


Figura 2.15 Solubilidade de uma proteína globular em função do pH, em duas concentrações de NaCl. Está assinalado o pH correspondente ao pI da proteína.

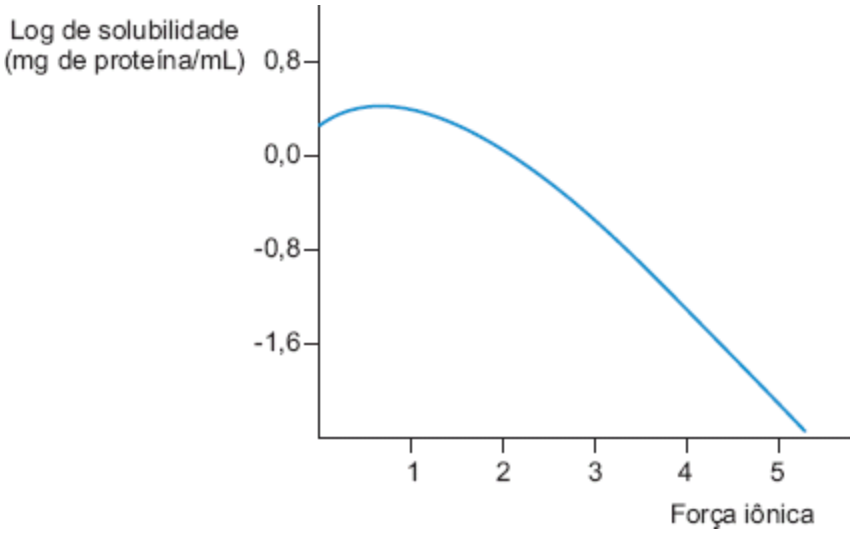


Figura 2.16 Solubilidade da hemoglobina equina, em função da concentração de $(NH_4)_2SO_4$, expressa em termos da força iônica da solução.

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 desses compostos, moléculas contendo grupos com carga, como as proteínas, sofrem menor hidratação e interagem 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 da proteína consiste na perda de sua estrutura original

À medida que uma proteína é sintetizada, 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. A proteína é dita, então, *desnaturada*: sua conformação nativa é destruída devido ao rompimento de ligações não covalentes (as ligações peptídicas são mantidas) e o resultado é uma cadeia polipeptídica distendida.

A desnaturação pode ser provocada, experimentalmente, por tratamentos que ocasionam o rompimento de ligações não covalentes. O aquecimento a temperaturas altas, mas menores do que 100°C, provoca a desnaturação da maioria das proteínas. Há exceções, como as proteínas de *bactérias termofílicas* que habitam fontes termais, cujas temperaturas são próximas de 100°C. Uma destas proteínas, a DNA polimerase da bactéria *Thermus aquaticus*, a Taq polimerase, tem sido amplamente empregada na reação em cadeia da polimerase (*PCR*, de ***P****olymerase* ***C****hain* ***R****eaction*), um método laboratorial de amplificação de DNA. Graças à sua estabilidade térmica, a enzima mantém-se ativa a 95°C, temperatura em que as fitas de DNA separam-se, e podem, então, ser duplicadas pela ação da enzima. 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.

Outros agentes desnaturantes são os ácidos e os álcalis fortes: 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. O tratamento com solventes orgânicos polares ou com compostos capazes de formar ligações de hidrogênio, como a ureia, determina a desnaturação da proteína; estes últimos compostos estabelecem ligações de hidrogênio com grupamentos 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 apolar longa, ligada a um grupo terminal carregado. 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 frequentemente empregado é o dodecilsulfato de sódio (SDS) (Figura 2.17).

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.

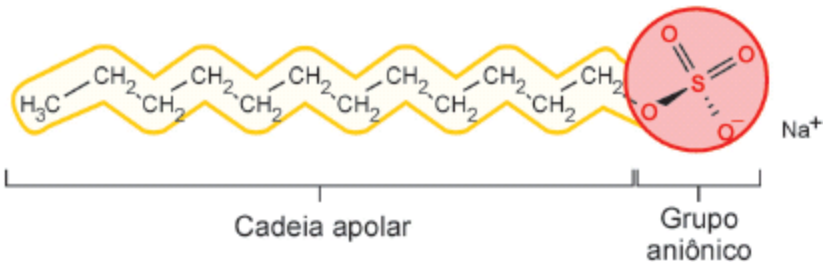


Figura 2.17 Fórmula estrutural do detergente dodecilsulfato de sódio (SDS), ilustrando sua natureza anfipática.

Proteínas desnaturadas podem renaturar

Retiradas as condições desnaturantes, algumas proteínas reassumem sua conformação nativa — este processo chama-se *renaturação*. A renaturação demonstra que a estrutura tridimensional de uma proteína é consequência de sua estrutura primária, ou seja, é determinada, unicamente, por sua sequência de aminoácidos.

Durante muito tempo, admitiu-se que o processo de enovelamento da cadeia polipeptídica recém-sintetizada nos ribossomos era autônomo, não requerendo nenhum fator adicional, nem fornecimento de energia. Esta visão passou a ser questionada diante da constatação de que a velocidade e a eficiência da renaturação *in vitro* são muito menores do que *in vivo*. Realmente, na década de 1990, demonstrou-se que as células dispõem de um aparato muito eficiente para assessorar a proteína durante a "montagem" de sua estrutura nativa. Este aparato é constituído por uma família de proteínas denominadas *chaperonas*[6]. Elas ligam-se a proteínas nascentes e, por meio de etapas cíclicas, sustentadas por hidrólise de ATP, impedem ou revertem interações inadequadas de regiões potencialmente complementares. Também facilitam o transporte de proteínas através de

membranas desde o citosol até o destino final, seja a secreção ou a inclusão em uma organela.

As proteínas assessoras possibilitam, ainda, a estabilização de proteínas em condições desfavoráveis, como altas temperaturas etc. As chaperonas foram identificadas na década de 1970 em *Drosophila melanogaster* como proteínas de choque térmico, *Hsp* (de ***H**eat **s**hock **p**rotein*), induzidas quando as células eram submetidas a altas temperaturas.

As proteínas assessoras são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas desde em bactérias até em mamíferos. Distúrbios no processo de enovelamento da cadeia proteica, e a consequente agregação de moléculas, estão envolvidos em diversas condições patológicas, como as doenças de Alzheimer, de Parkinson, aquelas causadas por príons (Seção 2.4) etc.

A substituição de aminoácidos pode alterar a função das proteínas

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, cuja cadeia lateral polar negativa localiza-se na superfície externa da molécula, por valina, com grupo R apolar. As moléculas da hemoglobina substituída, quando desoxigenadas, agregam-se devido a ligações hidrofóbicas envolvendo as cadeias laterais apolares de valina. Os agregados formam um precipitado fibroso que distorce as hemácias, que adquirem forma de foice — ***s**ickle*, 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 e sofrem hemólise facilmente (têm meia-vida de 16 a 20 dias em lugar dos 120 dias das hemácias normais), ocasionando anemia grave. A doença é conhecida como *anemia falciforme*, e manifesta-se somente quando a mutação ocorre em homozigose: indivíduos heterozigotos são normais. Outras hemoglobinas mutantes estão analisadas no próximo capítulo.

2.9 Purificação de proteínas — Estratégia geral

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 — pelo rompimento destas estruturas, que pode ser obtido por métodos diversos. A homogeneização mecânica em meio isotônico, por exemplo, produz o maceramento dos tecidos (ou órgãos) e a lise das células, originando um *extrato celular*, constituído por fragmentos de membrana plasmática, organelas (núcleos, mitocôndrias etc.) e o citosol. Os diversos componentes celulares podem ser separados por *fracionamento celular*, um procedimento 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 por métodos que se baseiam em solubilidade, tamanho, carga elétrica ou 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 é o mais comumente usado) ou solventes orgânicos miscíveis com água — a separação, neste caso, baseia-se em diferenças de solubilidade apresentadas pelas proteínas. Estas técnicas permitem 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 especificamente a proteína de interesse. Esta situação está exemplificada na Seção 5.5.1, 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. Graças às técnicas empregadas, a proteína heteróloga, que na célula original ocorre 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, então, é eluída com uma solução apropriada para a separação da proteína de interesse. As diferentes proteínas migrarão através da coluna com velocidades diferentes que dependerão do seu grau de interação com a matriz, o que permite a separação. Os vários tipos 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, cuja massa molar 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 (Figura 2.18). 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 poros de diversos tamanhos, permitindo a exclusão de moléculas com um largo intervalo de massa molar.

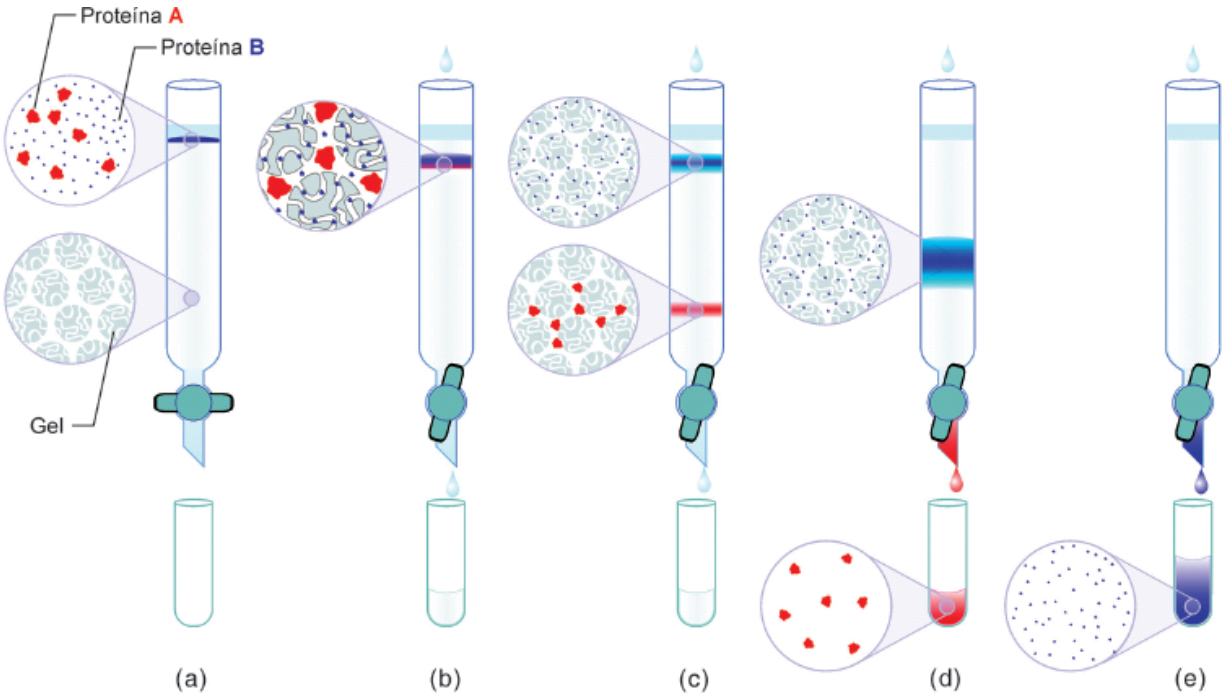


Figura 2.18 Filtração em gel. Uma mistura formada por duas proteínas (A e B), com massas molares diferentes, é aplicada sobre uma coluna de gel formado por esferas porosas (a). As moléculas da proteína menor (proteína B) podem penetrar nos poros das esferas (b), percorrendo a coluna mais lentamente (c); a proteína maior (proteína A) é, então, eluída primeiramente (d) e a proteína menor, depois (e).

A filtração em gel também pode ser empregada para diminuir a concentração de sais de uma solução de proteína após sua precipitação 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. Outro processo rotineiramente utilizado para separar proteínas de substâncias de pequena massa molar 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 (Figura 2.19).

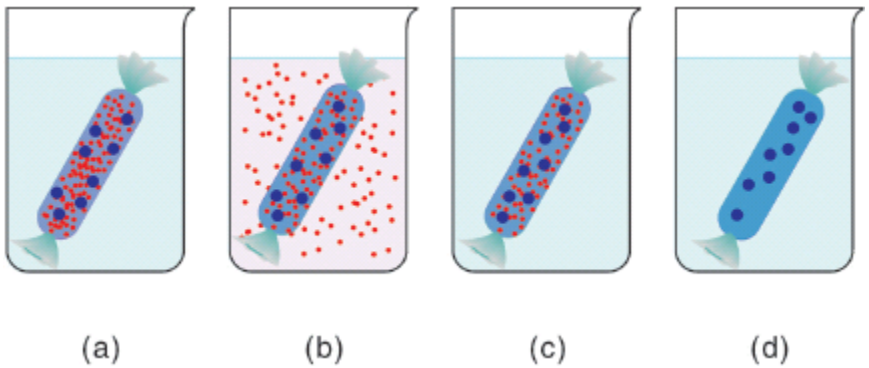


Figura 2.19 Diálise. O saco de diálise contendo a mistura de proteína (azul) e moléculas pequenas (vermelhas) é imerso em um volume grande de solução tampão (a). Como a membrana semipermeável permite a passagem apenas das moléculas pequenas, sua concentração dentro e fora do saco tende a se igualar (b). Após várias trocas de tampão (c), restam apenas as moléculas de proteína dentro do saco de diálise (d).

Cromatografia de troca iônica

As *resinas de troca iônica* comumente utilizadas para purificar proteínas são formadas por celulose ligada covalentemente a grupos com carga positiva ou negativa (Tabela 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.

Tabela 2.6 Algumas resinas utilizadas para cromatografia de troca iônica de proteínas.

Resina	Grupo ionizável
Fosfocelulose	$-PO_3^{2-}$
Carboximetilcelulose	$-CH_2-COO^-$
Dietilaminoetilcelulose	$-CH_2-CH_2-N^+H(CH_2CH_3)_2$

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 unir 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 (Figura 2.20). 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 (Tabela 5.6), embora seja restrita a uma classe especial de proteínas.

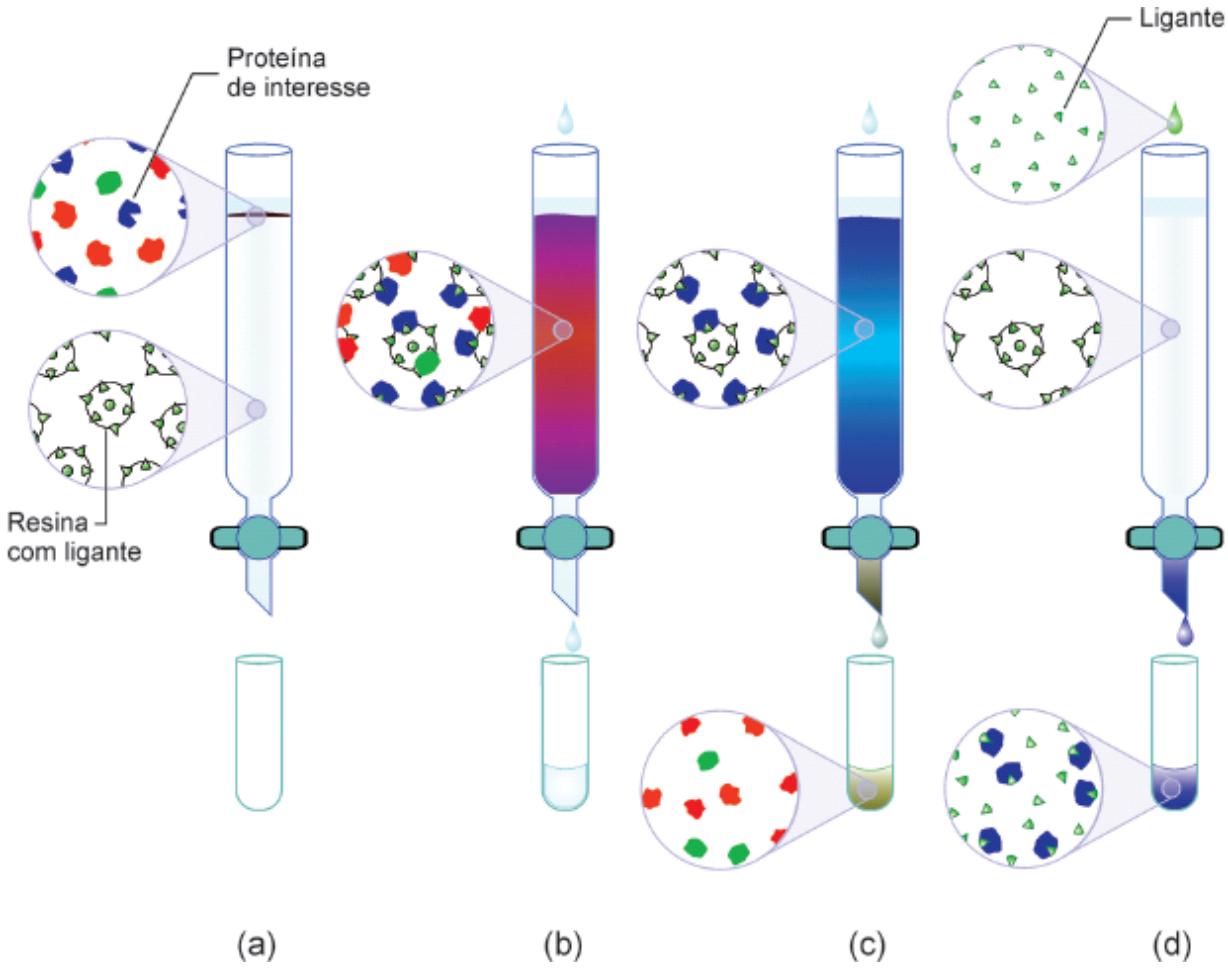


Figura 2.20 Cromatografia de afinidade. Uma mistura de proteínas (representadas em cores diferentes) é passada através de uma coluna da resina (esferas brancas), contendo um ligante (espículas em verde), pelo qual a proteína de interesse tem afinidade (a); as proteínas percorrem a coluna (b) e somente a proteína de interesse é retida (c); a eluição é feita com uma solução concentrada de ligante, que, competindo com suas moléculas ligadas à matriz, libera a proteína desejada (d).

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 (Figura 2.21). O sistema é submetido a uma diferença de potencial apropriada e as proteínas migram em direção ao polo de carga oposta à sua, com velocidades proporcionais às suas cargas. Depois de algum tempo da corrida eletroforética, 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 (Figura 2.22). Uma variante desta técnica, conhecida pela sigla *SDS-PAGE*, emprega um gel de poliacrilamida, em presença do detergente dodecilsulfato de sódio (SDS, Figura 2.17). O SDS liga-se a grupos 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. Cada molécula de detergente ligada atribui uma carga negativa à proteína desnaturada, mascarando a carga intrínseca da molécula nativa: todas as proteínas de uma mistura apresentarão carga negativa e migrarão em direção ao polo positivo. O resultado é a formação de um complexo com forma alongada, com uma densidade de cargas negativas proporcional ao comprimento da cadeia polipeptídica. Este método, portanto, separa proteínas segundo a sua massa molar. Se a proteína apresentar estrutura quaternária, suas subunidades serão desnaturadas e dissociadas por SDS e a eletroforese permite determinar a massa molar 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, a sua massa molar e de quantas subunidades são formadas.

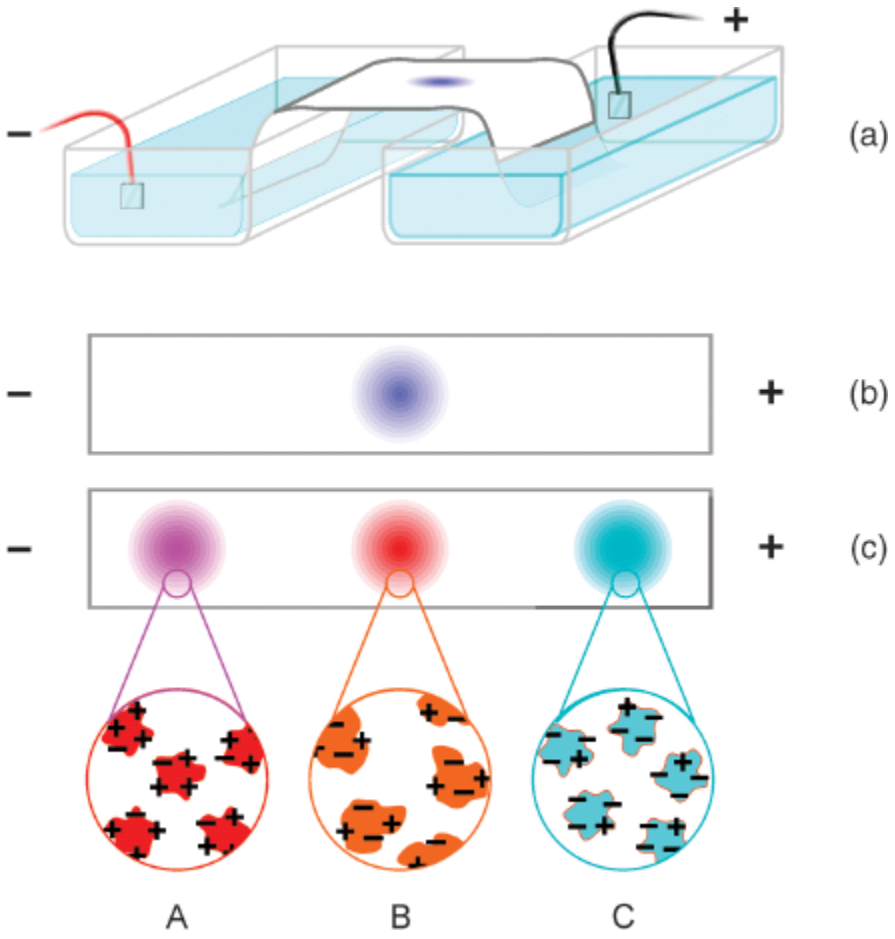


Figura 2.21 Eletroforese em papel. Uma mistura de três proteínas — A, B e C — é aplicada sobre uma tira de papel ou acetato de celulose, umedecida com tampão. A tira é colocada em um aparato apropriado e um campo elétrico é aplicado ao sistema (a). As proteínas migram, de sua posição inicial (b) para os polos, de acordo com a carga que apresentam no pH do tampão utilizado. Depois de algum tempo, a eletroforese é interrompida e a posição das proteínas é revelada (c).

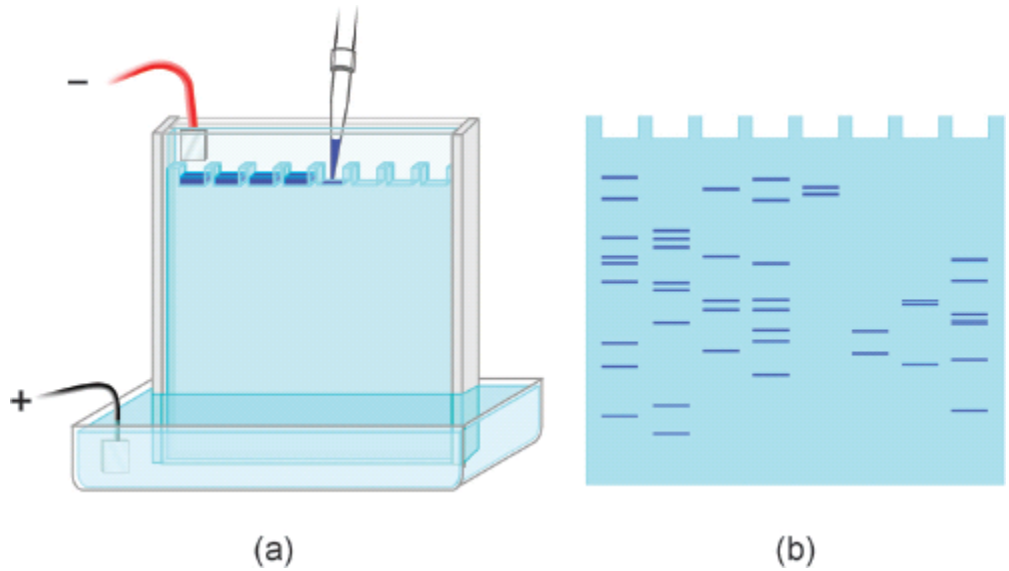


Figura 2.22 Eletroforese em gel. As amostras são colocadas em pequenas depressões (poços) formadas na parte superior do gel, contido entre placas de plástico e imerso em tampão (a). O aparato é submetido a um campo elétrico e as proteínas migram, formando bandas: quanto menor a massa molar da proteína, maior a distância migrada. Em (b), o resultado obtido, após revelação das bandas formadas no gel por coloração específica para proteínas. Nesta eletroforese, foram utilizadas amostras contendo diferentes misturas de proteínas.

Bibliografia

Boyer RF: *Biochemistry Laboratory: Modern Theory and Techniques*. Benjamin Cummings, 2006.

De Maio A *et al*.: Ferruccio Ritossa's scientific legacy 50 years after his discovery of the heat shock response: a new view of biology, a new society, and a new journal. *Cell Stress Chaperones* **17** (2): 139-143, 2012.

Diaz-Espinoza R, Soto C: High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol* **19** (4): 370-377, 2012.

Douglas PM, Cyr DM: Interplay between protein homeostasis networks in protein aggregation and proteotoxicity. *Biopolymers* **93** (3): 229-36, 2010.

Fairman JW *et al*.: The structural biology of β-barrel membrane proteins: a summary of recent reports. *Curr Opin Struct Biol* **21**: 1-9, 2011.

Knowles TPJ *et al*.: The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15** (6): 384-396, 2014.

Orij R *et al*.: Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1810** (10): 933-944, 2011.

Pace, CN: Energetics of protein hydrogen bonds. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 681-682, 2009.

Roe S (ed.): *Protein Purification Techniques: A Practical Approach,* 2nd ed. Oxford University Press, 2001.

Solomons TWG, Fryle CB: *Organic Chemistry*, 8th ed. Wiley, 2003.

Tinoco I *et al*.: *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Science*, 4th ed. Prentice Hall, 2002.

Tompa P: On the supertertiary structure of proteins. *Nat Chem Biol* **8** (7): 597-600, 2012.

Woolfson DN *et al*.: New currency for old rope: from coiled-coil assemblies to α-helical barrels. *Curr Opin Struct Biol* **22** (4): 432-441, 2012.

[1] As estruturas primárias e tridimensionais de inúmeras proteínas, determinadas geralmente por difração de raios X das proteínas no estado cristalino, podem ser encontradas em um banco de dados, o *Protein Data Bank* (*PDB*), disponível na Internet.

[2] Os resíduos de aminoácidos de uma cadeia polipeptídica são numerados de + a *n* a partir do amino terminal. Nos exemplos citados, a numeração seria: Ala1-Ser2-Lys3 e Lys1-Ser2-Ala3.

[3] Um átomo de hidrogênio ligado covalentemente a um átomo eletronegativo apresenta carga parcial positiva e pode associar-se a outro átomo eletronegativo, formando uma ligação mais fraca, não covalente, chamada *ligação (ponte) de hidrogênio.* Nos sistemas biológicos, os átomos eletronegativos são, geralmente, oxigênio e nitrogênio e, menos frequentemente, enxofre. A energia de formação de uma ligação de hidrogênio(4 a 30 kJ • mol^{-1}) é cerca de vinte vezes menor que a energia de formação de ligações covalentes.

[4] A concanavalina A é uma proteína vegetal do grupo das *lectinas*, que têm alta afinidade por açúcares específicos e que, por isto, são utilizadas na purificação de carboidratos por cromatografia de afinidade (Seção 2.10.1).

[5] A camada de solvatação da proteína resulta da organização de moléculas de água em torno dos grupos carregados dos aminoácidos presentes na superfície da molécula proteica.

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

OceanofPDF.com

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, e da remoção constante do CO_2 resultante deste processo. Nos organismos pluricelulares, as trocas gasosas com o meio não podem ser feitas eficientemente por simples difusão, existindo sistemas especializados incumbidos desta função. É o caso dos vertebrados, nos quais este papel é exercido por sistemas respiratório e circulatório complexos, do qual participam 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^+ (Seção 1.4). O bicarbonato é transportado pelo sangue até os pulmões, onde é eliminado como CO_2; os íons H^+ são associados à hemoglobina no nível dos tecidos e dela dissociados no nível dos pulmões. Deste modo, embora haja grande formação de CO_2 nos 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.

Em resumo, a hemoglobina tem duas funções essenciais: transportar oxigênio e exercer um poderoso efeito tampão.

3.1 Estrutura da hemoglobina

A hemoglobina está presente nas hemácias, com cerca de 270 milhões de moléculas por célula, equivalendo a aproximadamente 1/3 do seu peso.

A hemoglobina predominante (mais de 95% do total) nos seres humanos adultos (HbA) é formada por quatro cadeias polipeptídicas, duas α (com 141 aminoácidos) (α_1 e α_2) e duas β (com 146 aminoácidos) (β_1 e β_2). Apesar de apresentarem diferenças na sequência de aminoácidos, os dois tipos de subunidades e a mioglobina exibem estrutura terciária semelhante (Seção 2.4). Apresentam a maior extensão da cadeia formada por segmentos em α-hélice, conectados por regiões sem estrutura regular. As hélices recebem letras e os seus aminoácidos constituintes, números; por exemplo, F8 é o oitavo aminoácido da hélice F.

Na estrutura quaternária da hemoglobina, as ligações não covalentes são muito mais numerosas entre subunidades diferentes — α/β — do que entre subunidades iguais — α/α e β/β. O resultado desta associação desigual é uma molécula tetramérica composta pela união de dois dímeros, $\alpha_1\ \beta_1$ e $\alpha_2\ \beta_2$ (Figura 3.1 a). O contato entre os dois dímeros é estabelecido nas interfaces designadas $\alpha_1\ \beta_2$ e $\alpha_2\ \beta_1$ (Figura 3.1 b). *Estas interfaces sofrem modificações importantes na oxigenação e desoxigenação da hemoglobina*.

3.2 Ligação do oxigênio à hemoglobina

O grupo prostético heme é o sítio de ligação do oxigênio

A hemoglobina é uma hemoproteína (Seção 2.6): cada uma de suas cadeias está associada a um grupo prostético *heme* (Figura 3.2). O heme é uma molécula de porfirina contendo um íon de ferro, que, na mioglobina e na hemoglobina, permanece no estado ferroso, Fe^{2+}. As porfirinas consistem em um anel plano, resultante da fusão de quatro núcleos pirrólicos, com substituintes variáveis, que caracterizam seus subtipos; na hemoglobina é encontrado o isômero denominado *protoporfirina IX*[1]. O heme confere à hemoglobina, e ao sangue, sua cor característica.

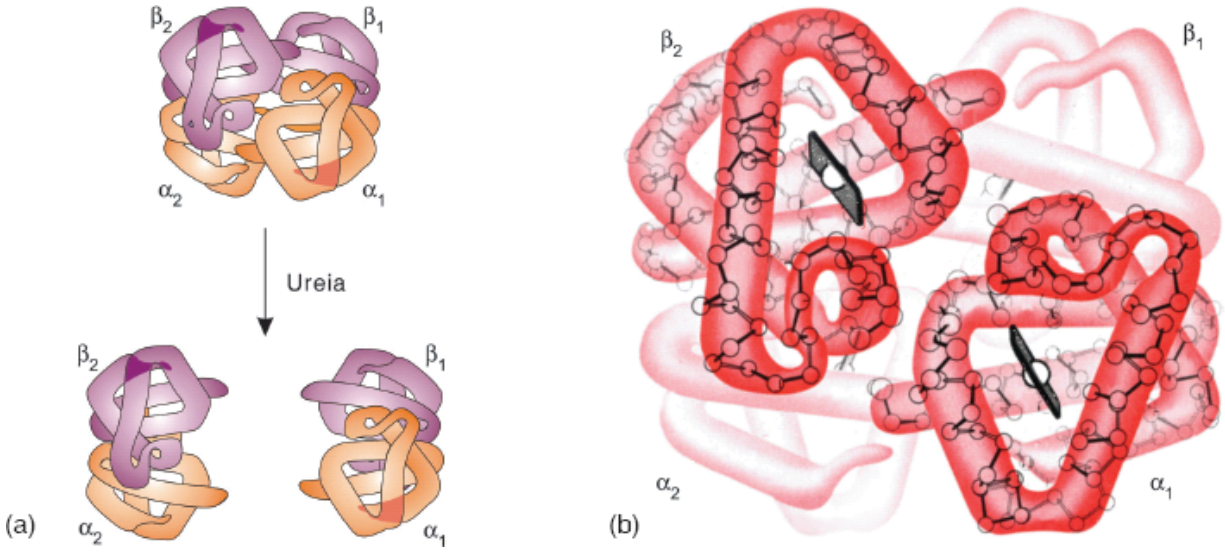


Figura 3.1 Estrutura quaternária da hemoglobina. a) A associação entre subunidades diferentes é mais forte que entre subunidades iguais: quando a hemoglobina é suspensa em solução concentrada de ureia, o tetrâmero dissocia-se em dímeros αβ; os grupos heme não estão mostrados. b) Esquema enfocando as áreas de contato entre os dímeros, com a interface $\alpha_1\beta_2$ à frente; cada grupo heme fica alojado em um bolsão hidrofóbico.

O grupo heme localiza-se dentro de uma cavidade hidrofóbica, delimitada sobretudo por aminoácidos apolares, que estabelecem interações hidrofóbicas com o anel porfirínico. Este ambiente apolar torna possível a ligação do oxigênio ao ferro (Fe^{2+}), sem que ele seja oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}).

O íon de ferro fica no centro do grupo heme, formando seis ligações: com os quatro átomos de nitrogênio do anel porfirínico, com a cadeia polipeptídica — em um resíduo de histidina, a His F8, chamada de *histidina proximal* — e pode, ainda, ligar-se reversivelmente a uma molécula de oxigênio (O_2). As duas últimas ligações são perpendiculares ao plano do anel e situam-se em lados opostos do plano do heme (Figura 3.2). Ao sítio de ligação do ferro com oxigênio podem ligar-se outras moléculas pequenas, como CO e H_2S, com afinidade ainda maior que o oxigênio, o que explica sua alta toxidez para organismos aeróbios.

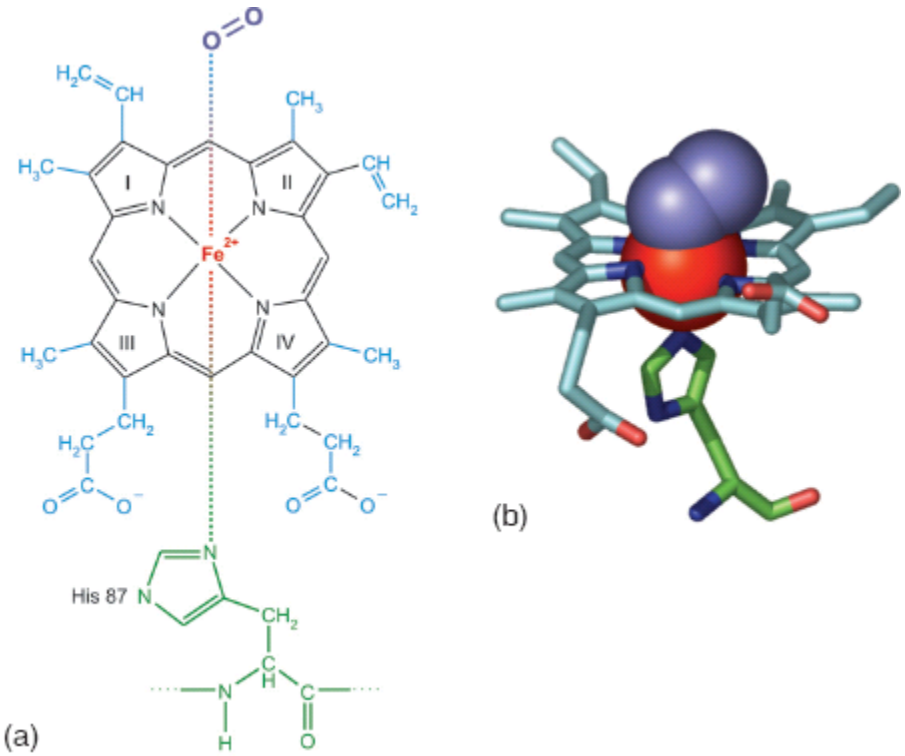


Figura 3.2 Estrutura do grupo heme (protoporfirina IX e um íon de ferro) da oxi-hemoglobina. a) O íon Fe^{2+} liga-se aos átomos de nitrogênio dos núcleos pirrólicos (numerados de I a IV) do anel porfirínico (em preto, com as cadeias laterais em azul), à molécula de oxigênio e ao grupo imidazólico da histidina proximal (His F8). b) Representação tridimensional do heme e das ligações do Fe^{2+}.

Uma molécula de hemoglobina totalmente oxigenada contém quatro moléculas de O_2 e é denominada *oxi-hemoblobina* (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

As hemoglobinas oxigenada e desoxigenada têm estruturas tão diferentes, que apresentam formas cristalinas distintas.

A oxigenação da hemoglobina determina alterações estruturais sequenciais. Na desoxi-Hb, os íons de ferro estão situados 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 anel, que se torna mais achatado, arrastando a His 87 à qual está ligado (Figura 3.3) e, consequentemente, o próprio segmento da cadeia polipeptídica que contém este aminoácido. A movimentação deste segmento desloca um segmento contíguo, segmentos estes que compõem as interfaces α_1 β_2 e α_2 β_1 entre os dímeros, provocando o rompimento de várias ligações não covalentes. Há uma alteração da disposição relativa dos dímeros, que resulta em estreitamento do bolsão entre as subunidades β (Figura 3.4). Deste modo, o pequeno deslocamento do ferro (cerca de 0,5 Å), causado pela ligação do oxigênio ao grupo heme de uma subunidade, dispara uma sequência de eventos mecanicamente transmitidos, que alteram a estrutura quaternária da hemoglobina.

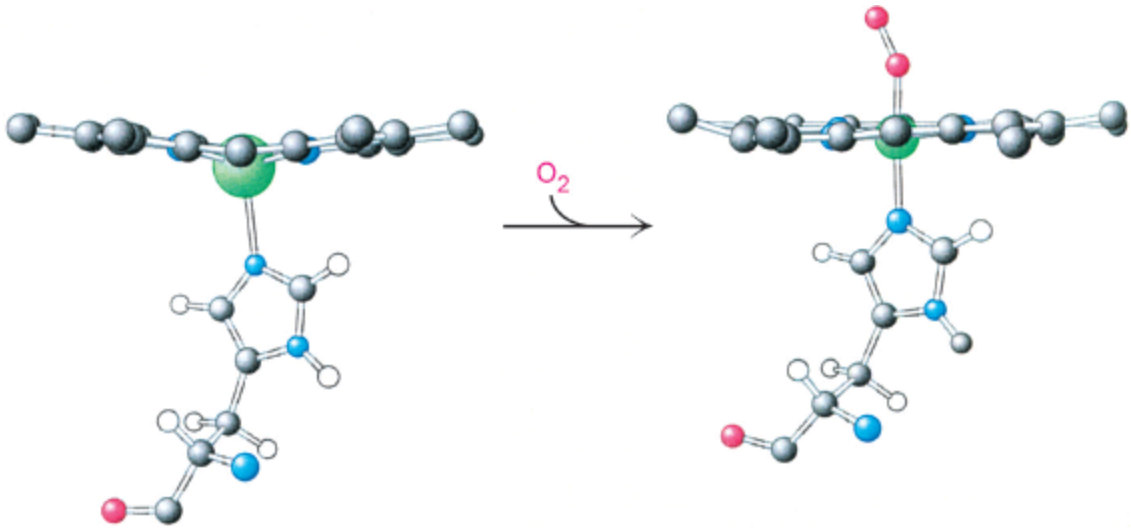


Figura 3.3 A ligação do oxigênio ao Fe^{2+} do grupo heme provoca o deslocamento do ferro para o plano do anel porfirínico, que se torna mais achatado, deslocando a histidina proximal e iniciando uma série de alterações estruturais na hemoglobina. (Adaptada de Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. & Stryer, L.: Biochemistry, 5th edition. Freeman and Company, 2002.)

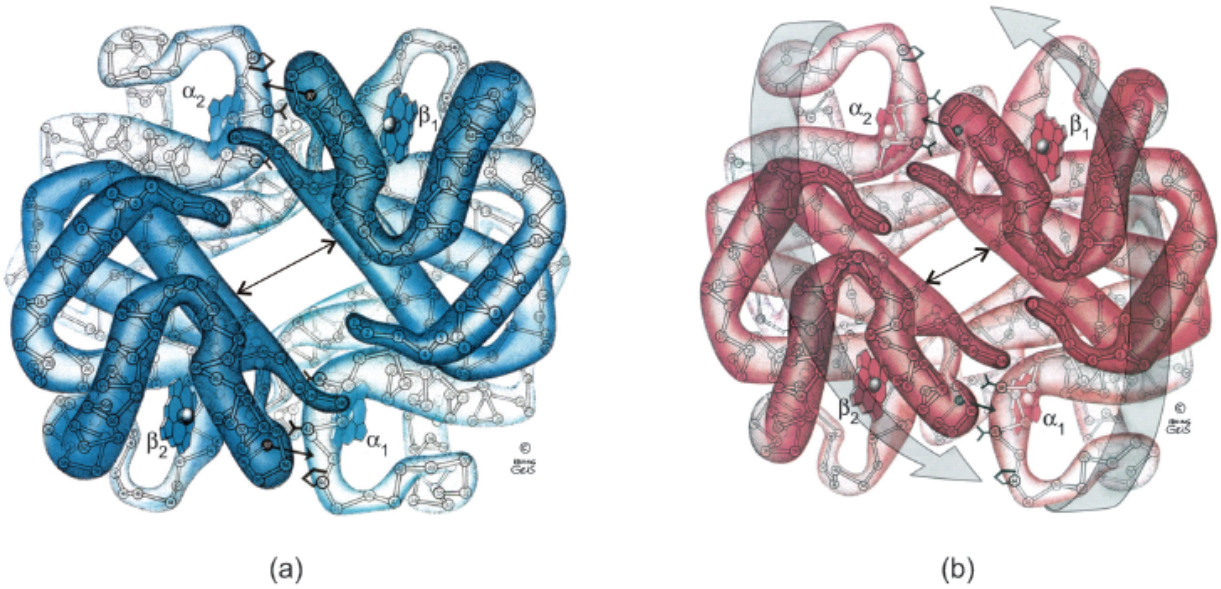


Figura 3.4 Estrutura tridimensional da desoxi-Hb (a) e oxi-Hb (b), com as cadeias β em primeiro plano. Na transformação desoxi-Hb → oxi-Hb, há movimentação de um dímero em relação ao outro, simbolizada pelas setas largas cinza sobre a molécula de oxi-Hb e evidenciada pela mudança na posição relativa de alguns aminoácidos; ocorre, ainda, um estreitamento da cavidade central entre as cadeias β, indicado pelas setas finas pretas.

A hemoglobina liga-se ao oxigênio cooperativamente

A ligação do oxigênio implica rearranjos moleculares sucessivos, já que a mudança de conformação de uma subunidade acarreta alteração das outras. Estes movimentos coordenados determinam a cinética de oxigenação da hemoglobina: a ligação da primeira molécula de oxigênio facilita o preenchimento dos outros grupos heme. As sucessivas conformações assumidas pela molécula de hemoglobina têm afinidades crescentes pelo oxigênio: a ligação da quarta molécula é 300 vezes mais eficiente do que a ligação da primeira. A esse fenômeno dá-se o nome de *cooperatividade*. Como a cooperatividade resulta da influência exercida por um sítio sobre outros localizados em subunidades diferentes de uma mesma molécula, só pode ser apresentada por proteínas oligoméricas, como a hemoglobina e as enzimas alostéricas (Seção 19.2.1). No caso da mioglobina, formada por uma única cadeia polipeptídica e um único grupo heme, não existe cooperatividade.

A diferença no mecanismo de oxigenação de mioglobina e hemoglobina está traduzida nas cinéticas de oxigenação destas proteínas em função da pressão parcial de oxigênio (pO_2) (Figura 3.5): enquanto a mioglobina apresenta uma curva hiperbólica, a hemoglobina exibe uma curva sigmoide. A forma hiperbólica é esperada para uma proteína com um único sítio de ligação. A curva sigmoide indica que a ligação das moléculas de oxigênio aos quatro heme não é independente, e que o preenchimento de um heme aumenta a afinidade por oxigênio dos outros heme.

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. No sangue arterial que sai dos pulmões dos seres humanos, a pO_2 é alta, em média, 100 mmHg (ou 100 torr ou 13,3 kPa^2) 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 saturação da hemoglobina cai para 33%, ou seja, ela libera 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.

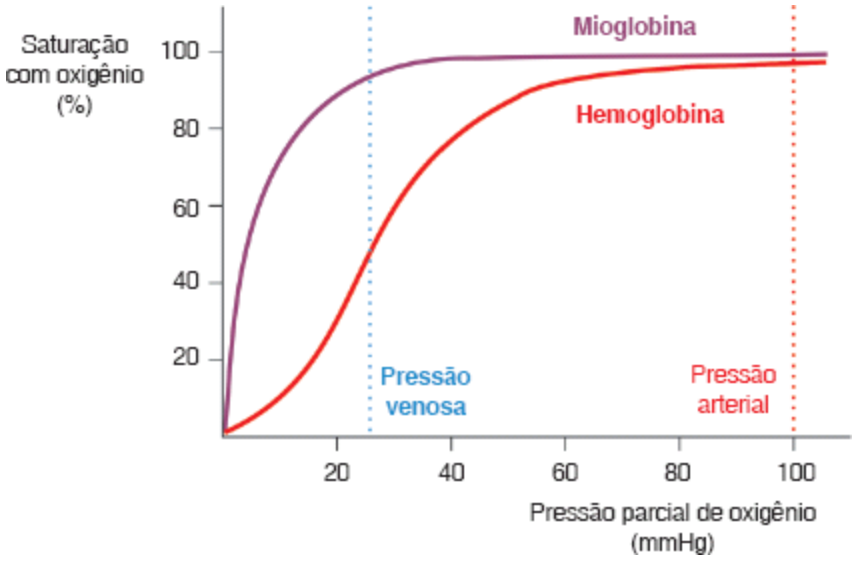


Figura 3.5 Curva de saturação com oxigênio de mioglobina e hemoglobina; estão indicados os valores normais, ao nível do mar, da pO_2 venosa e da pO_2 arterial.

3.3 Fatores que interferem na ligação com oxigênio

O aumento da temperatura, a presença de determinados compostos orgânicos fosforilados, o aumento da pressão parcial de CO_2 e a diminuição de pH são fatores que provocam a redução da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

O efeito da temperatura, no intervalo de 37 a 41°C, tem grande importância fisiológica porque permite maior oferta de oxigênio à medida que a temperatura se eleva. No caso de febre, ocorre aceleração do metabolismo celular, com maior demanda de oxigênio; em grupos musculares sob contração intensa, há um aumento da temperatura local, resultante do metabolismo intenso. Em ambas as situações, a diminuição da afinidade da hemoglobina por oxigênio é uma adaptação favorável.

3.3.1 2,3-bisfosfoglicerato (BPG)

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 do que quando purificada. Este fenômeno resulta da presença, nestas células, de 2,3-bisfosfoglicerato (BPG) (Figura 3.6), 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 (Figura 3.7).

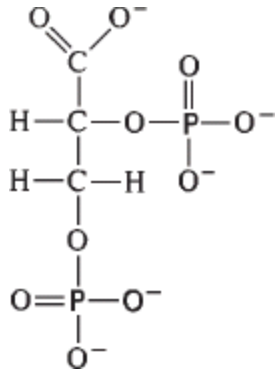


Figura 3.6 Estrutura do 2,3-bisfosfoglicerato (BPG).

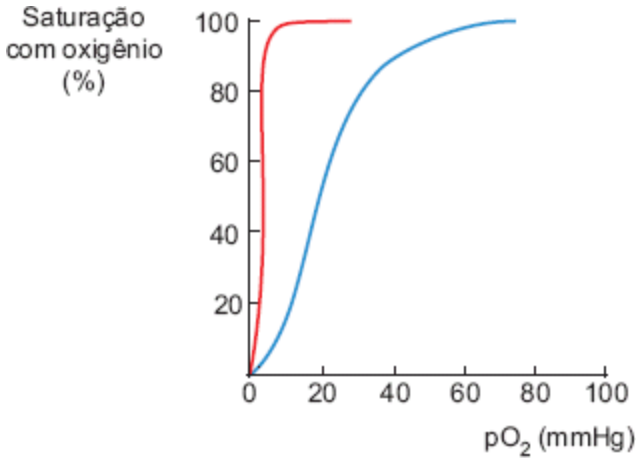


Figura 3.7 Efeito do BPG sobre a afinidade da hemoglobina por oxigênio. A saturação foi medida na ausência (curva vermelha) e na presença de BPG (curva azul). Na ausência de BPG, a afinidade da hemoglobina por oxigênio é tão alta, que a curva de ligação se torna hiperbólica.

O BPG liga-se fortemente à desoxi-Hb, que apresenta a cavidade entre as subunidades β suficientemente grande para alojá-lo. Esta cavidade é circundada por cadeias laterais de aminoácidos carregadas positivamente, que interagem com os grupos negativos do BPG (Figura 3.8). Na oxi-Hb, a cavidade é menor (Figura 3.4), o que dificulta a ligação do BPG. A consequência é o predomínio da forma desoxigenada da hemoglobina, o que equivale a um decréscimo na sua afinidade por oxigênio.

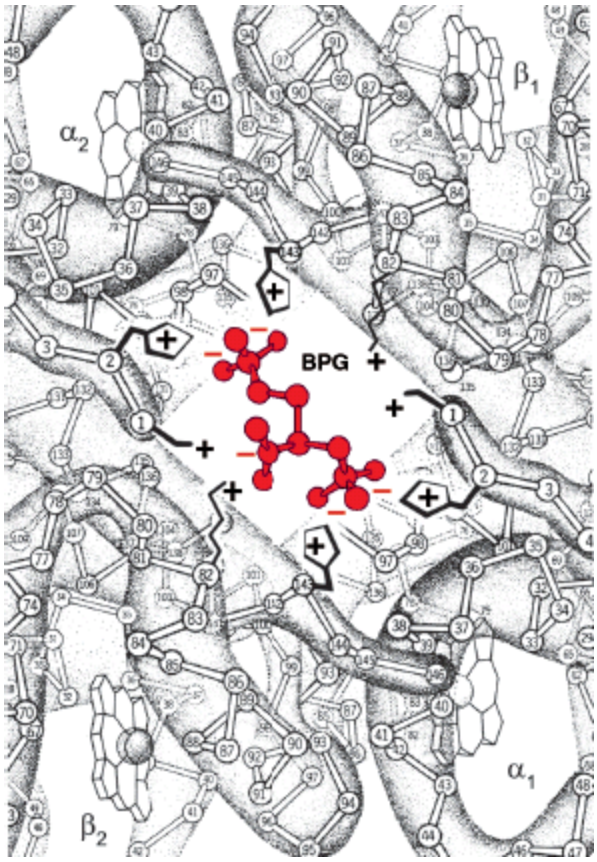


Figura 3.8 Ligação do BPG à cavidade entre as cadeias β da desoxi-Hb. Os grupos com carga positiva que interagem com os grupos negativos do BPG são: amino terminal (Val 1), imidazólico (His 2 e His 143) e amino (Lys 82), pertencentes a aminoácidos das duas cadeias β.

O efeito do BPG manifesta-se em baixas pressões de oxigênio, sendo suplantado por pressões elevadas de oxigênio, nas quais prevalece a oxi-Hb, como indicado nas equações seguintes (as quais não consideram que cada molécula de hemoglobina pode combinar-se com 1 a 4 moléculas de O_2):

pO_2 baixa (tecidos)	pO_2 alta (pulmões)
$HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$	$Hb + O_2 \rightarrow HbO_2$
$Hb + BPG \rightarrow HbBPG$	$HbBPG \rightarrow Hb + BPG$
$HbO_2 + BPG \rightarrow HbBPG + O_2$	$HbBPG + O_2 \rightarrow BPG + HbO_2$

Nas condições de alta pO_2 dos pulmões, a hemoglobina fica saturada com oxigênio, mesmo na presença de BPG, cujo papel fisiológico é aumentar substancialmente a liberação de oxigênio nos tecidos extrapulmonares, onde a pO_2 é baixa.

O nível de BPG nas hemácias aumenta, de modo gradativo, em condições associadas com hipóxia tecidual (oxigenação deficitária dos tecidos) prolongada, como: comprometimento do sistema cardiorrespiratório, estado anêmico e permanência em grandes altitudes. Este mecanismo adaptativo compensa a menor disponibilidade de oxigênio existente nessas situações, com um aumento na liberação do gás para os tecidos.

3.3.2 pH: efeito Bohr

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

A afinidade da hemoglobina pelo oxigênio varia com o pH, mesmo dentro do estreito limite fisiológico de variação do pH: é tanto menor quanto menor o pH (Figura 3.9).

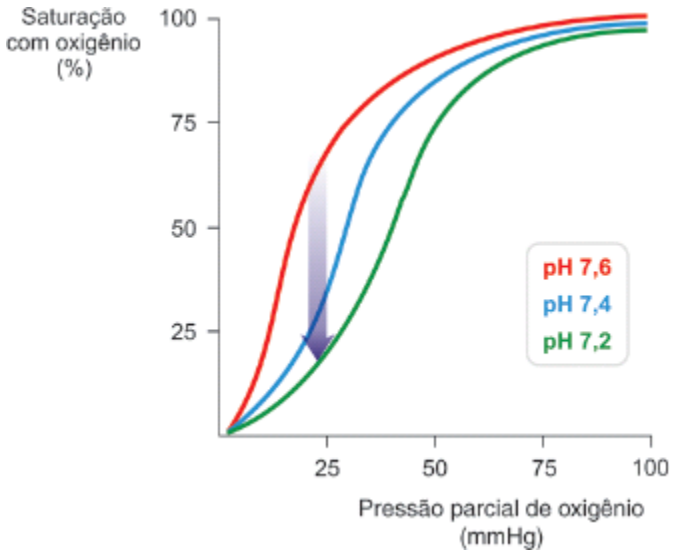


Figura 3.9 Efeito do pH sobre a saturação da hemoglobina com oxigênio. A porcentagem de moléculas de hemoglobina oxigenada diminui com o aumento da concentração de H^+ (ver seta no gráfico), em baixas pressões parciais de oxigênio (pO_2).

A afinidade da hemoglobina por oxigênio também diminui com acréscimos na pressão parcial de CO_2 (pCO_2), produzindo desvios da curva de saturação com oxigênio para a direita, um resultado semelhante ao da diminuição de pH (Figura 3.9). O CO_2 reage com os grupos amino terminais das cadeias da hemoglobina, formando a carbamino-hemoglobina, que tem afinidade menor por O_2.

Os íons H^+, como acontece com o BPG, ligam-se preferencialmente à desoxi-Hb, que passa a constituir a forma predominante, o que corresponde a 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 Brönsted 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, que modifica a relação espacial entre determinados aminoácidos e acarreta variações nos valores de pK_a de seus grupos ionizáveis.

Alterações importantes referem-se à posição relativa de resíduos de aminoácidos localizados nas interfaces $\alpha_1\beta_2$ e $\alpha_2\beta_1$ entre os dímeros — eles 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. Em resumo, a conversão de oxi-Hb em desoxi-Hb é acompanhada por captação de prótons, e a sua oxigenação, por liberação de prótons.

A influência do pH e da concentração de CO_2 sobre a oxigenação da hemoglobina tem grande importância fisiológica, porque no nível dos tecidos a acentuada produção de CO_2 pelo metabolismo e o decréscimo no pH resultante estão sempre associados a uma maior demanda de oxigênio. O efeito do pH e da pressão parcial de CO_2 sobre a união entre Hb e O_2 é denominado *efeito Bohr*.

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

pO_2 e pH mais baixos (tecidos)

$$HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$$
$$Hb + H^+ \rightarrow HHb$$
$$HbO_2 + H^+ \rightarrow HHb + O_2$$

pO_2 e pH mais altos (pulmões)

$$HHb + O_2 \rightarrow HHbO_2$$
$$HHbO_2 \rightarrow HbO_2 + H^+$$
$$HHb + O_2 \rightarrow HbO_2 + H^+$$

A representação do efeito Bohr não levou em conta a estequiometria do processo: cada molécula de hemoglobina pode combinar-se com + a 4 moléculas de O_2 e associar-se ou liberar de 1,2 a 2,8 H^+, dependendo de condições como o pH, a concentração de 2,3-bisfosfoglicerato etc.

3.3.3 Hemoglobina e o tamponamento do sangue

A análise das equações que resumem o efeito Bohr 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 nos tecidos e nos alvéolos pulmonares, respectivamente.

Nos capilares que irrigam os tecidos, o CO_2 produzido pelo metabolismo celular difunde-se até as hemácias, onde é hidratado rapidamente em uma reação catalisada pela anidrase carbônica (Seção 1.4), formando H_2CO_3. No pH do sangue (7,4), o H_2CO_3 dissocia-se em HCO_3^- e H^+:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

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 e é transportado até os pulmões (Figura 3.10). Cerca de 90% do CO_2 produzido nas células são transportados aos pulmões por este mecanismo; 5% como carbamino-hemoglobina e 5% permanecem em solução.

Nos pulmões a situação inverte-se. A alta pO_2 leva à oxigenação da hemoglobina e à dissociação de H^+. O HCO_3^- desloca-se do plasma para o interior das hemácias e combina-se com os H^+, formando H_2CO_3, que é convertido em CO_2 e H_2O pela anidrase carbônica. O CO_2 difunde-se das hemácias para o plasma, depois para os alvéolos pulmonares e é expirado. A liberação de prótons pela hemoglobina corrige o valor de pH que, de outro modo, tenderia a aumentar pois, com a baixa pCO_2 alveolar, o CO_2 é eliminado no ambiente, consumindo H^+ e HCO_3^-:

$$H^1 + HCO_3^- \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H_2O + CO_2$$

Assim, a manutenção do pH fisiológico, imprescindível para o desempenho de qualquer função vital, é obtida pela ação coordenada do sistema Hb/HbO_2 e do sistema CO_2/HCO_3^-.

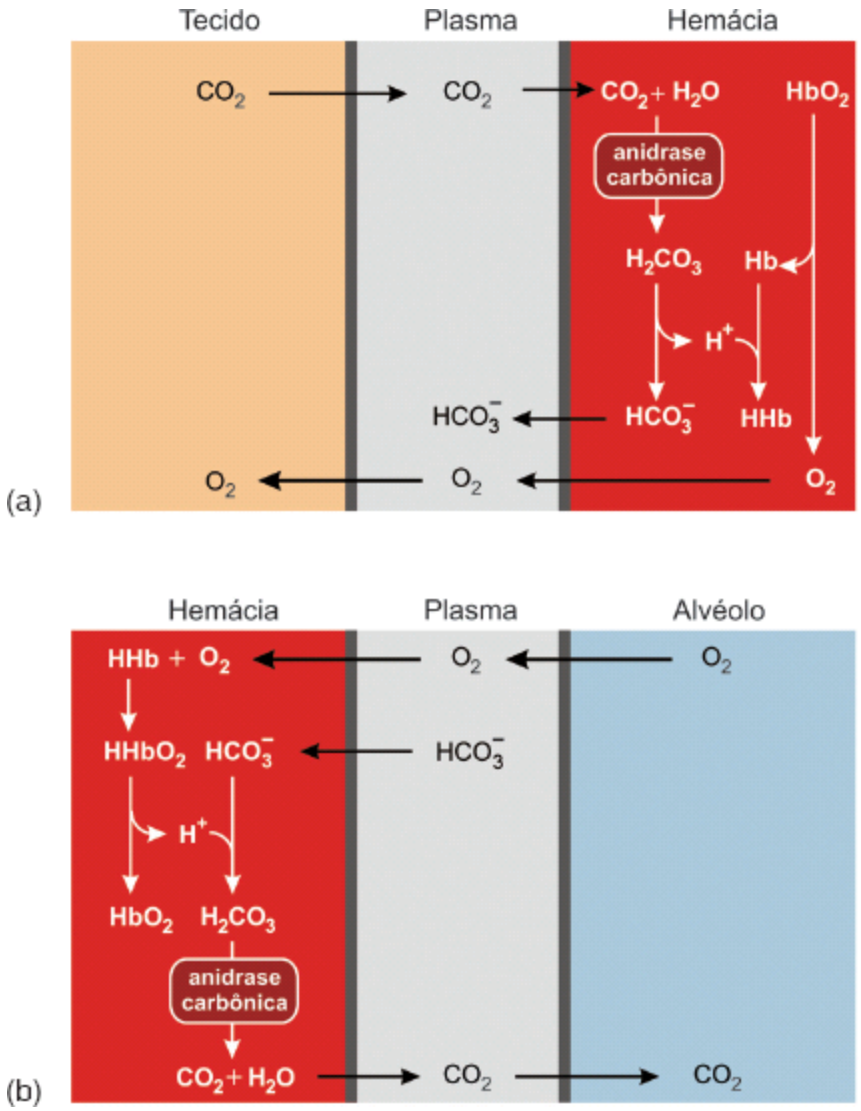


Figura 3.10 Esquema dos processos que ocorrem nos tecidos (a) e nos pulmões (b) e possibilitam a manutenção do pH plasmático.

3.4 Hemoglobina fetal

O feto humano, e de outros mamíferos, tem uma hemoglobina diferente da HbA, a principal hemoglobina dos adultos. A *hemoglobina fetal* (*HbF*) tem uma cadeia polipeptídica chamada γ (gama) em substituição à cada cadeia β. A estrutura da HbF é, então, $\alpha_2\ \gamma_2$, em contraposição à estrutura $\alpha_2\ \beta_2$ da HbA.

HbF tem maior afinidade por oxigênio que HbA: sua curva de saturação com oxigênio é deslocada para a esquerda em relação à curva de saturação

da HbA (Figura 3.5). 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 2,3-bisfosfoglicerato (BPG, Seção 3.3.1) aos dois tipos de hemoglobina. Nas cadeias γ, um aminoácido com carga positiva foi substituído por um polar sem carga. Ou seja, na molécula de HbF existe um par a menos de grupos positivos na cavidade onde se insere o BPG (Figura 3.8), que, por isto, liga-se mais fracamente que na HbA. Como a concentração de BPG é igual nas hemácias da mãe e do feto, e a HbF liga-se menos eficientemente ao BPG, 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

Foram descritas mais de 700 anomalias hereditárias nos seres humanos causadas por mutações que determinam alterações na estrutura da hemoglobina ou diminuição da síntese de suas cadeias polipeptídicas. São as chamadas *hemoglobinopatias*, que podem ser clinicamente insignificantes ou constituírem doenças graves. O estudo das hemoglobinas mutantes introduziu o conceito de *patologia molecular*, que se refere a doenças causadas pela alteração de uma única proteína.

As mutações na molécula de hemoglobina ocasionam, frequentemente, a substituição de um único aminoácido, trazendo consequências variáveis, segundo sua localização. 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* (Seção 2.8). A frequência do gene de HbS, ao contrário dos genes de outras hemoglobinas mutadas, é alta, chegando a 40% em algumas regiões da África. Como a sobrevida dos homozigotos para HbS é baixa, somente uma forte pressão seletiva poderia explicar a alta incidência do gene defectivo — 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 frequência do gene para

HbS são altamente correlacionadas — 70 anos após esta descoberta, o mecanismo de proteção pelo gene mutado ainda é questionado. A anemia falciforme demonstra claramente que mutações deletérias podem constituir ferramentas da evolução, determinando uma maior probabilidade de sobrevivência de seus portadores.

Mutações afetando aminoácidos situados no interior da molécula geralmente determinam a síntese de hemoglobinas não funcionais. A perda da função normal pode resultar de perturbações da estrutura terciária, como acontece quando há substituição de um aminoácido por prolina, que interrompe uma α-hélice. Em outros casos, a troca de aminoácidos com cadeia lateral apolar por outros com grupo R polar altera o caráter hidrofóbico da cavidade onde se aloja o grupo heme, ocasionando a oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+}.

O segundo 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, a produção das cadeias α é defectiva, enquanto nas β-*talassemias*, resultantes de vários tipos de mutações, faltam as cadeias β. Os homozigotos apresentam anemia severa e essa condição é denominada *talassemia maior*; os heterozigotos são assintomáticos (*talassemia menor*) e, como acontece na anemia falciforme, apresentam alguma proteção contra a malária.

A hemoglobina pode sofrer alterações químicas transitórias, resultantes de processos endógenos, como é o caso de sua ligação à glicose, formando a *hemoglobina glicada* (HbA_{1c}), em uma reação não enzimática. A concentração de HbA_{1c} aumenta quando a concentração de glicose no sangue é anormalmente elevada (hiperglicemia), como ocorre em pacientes com diabetes (Seção 21.4). HbA_{1c} apresenta uma alta afinidade por oxigênio e resposta atenuada ao 2,3-bisfosfoglicerato (Seção 3.3.1). A conjugação desses fatores dificulta a liberação do oxigênio ligado à hemoglobina, podendo contribuir para a hipóxia celular e a instalação da microangiopatia diabética.

Outra modificação da hemoglobina é a oxidação do íon ferroso (Fe^{21}) do grupo heme ao estado férrico (Fe^{3+}), que origina a *meta-hemoglobina*

(*HbM*), que não se liga ao oxigênio. Níveis elevados de HbM (meta-hemoglobinemia) podem ser devidos a mutações ou à ação de drogas e poluentes ambientais.

A manutenção do íon no estado ferroso (Fe^{21}) depende de diversos fatores, como a integridade do nicho hidrofóbico da hemoglobina onde se insere o grupo heme, formado por resíduos de aminoácidos apolares, e a atuação de sistemas enzimáticos antioxidantes presentes nas hemácias (Seção 12.3) — mutações que afetem esses fatores podem causar a *meta-hemoglobinemia congênita*, que é rara e letal quando em homozigose.

A *meta-hemoglobinemia adquirida* resulta da exposição a reagentes oxidantes e de incidência relativamente frequente. Na prática médica, pode ser causada por medicamentos, como anestésicos locais (benzocaína), nitrofenóis (dinitrofenol — Seção 11.5), fertilizantes (nitratos) e produtos industriais, como anilina, corante usado na fabricação de *jeans*. Pacientes submetidos a procedimentos que utilizam benzocaína tópica na orofaringe e traqueia (broncoscopia, endoscopia) podem apresentar concentração elevada de HbM. O tratamento consiste na administração de agentes redutores como azul de metileno.

O aumento de HbM no sangue se manifesta clinicamente por cianose (coloração azulada) de lábios e extremidades, cor marrom do sangue arterial (HbM tem cor marrom) e redução da saturação arterial de oxigênio; dependendo do nível de HbM, pode ocorrer hipóxia grave e até morte.

Em seres humanos sadios, os mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo mantêm teores de HbM menores do que 1% da hemoglobina total. Porém, a exposição a um agente oxidante chega a aumentar esse valor em mais de mil vezes.

Bibliografia

Allison AC: The discovery of resistance to malaria of sickle-cell heterozygotes. *Biochem Molec Biol Educ* **30**: 279-287, 2002.

Campbell KL *et al*.: Substitutions in woolly mammoth hemoglobin confer biochemical properties adaptive for cold tolerance. *Nat Genet* **42** (6): 536-540, Year published: 2010.

Cyrklaff M *et al*.: Hemoglobins S and C interfere with actin remodeling in *Plasmodium falciparum*–infected erythrocytes. *Science* **334** (6060): 1283-1286, 2011.

Flandrois M *et al*.: La méthémoglobinémie: une maladie à ne pas oublier (Methemoglobinemia: A rare but important condition to recognize). Arch Pediatr **20** (10): 1160-1161, 2013.

Giardina B *et al*.: The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. *Acta Physiol Scand* **182** (3): 229-244, 2004.

Miele AE *et al*.: Hemoglobin allostery: new views on old players. *J Mol Biol* **425**, 1515-1526, 2013.

[1] A nomenclatura das porfirinas adota um prefixo que se refere aos tipos de substituintes dos núcleos pirrólicos — no caso do prefixo *proto*, são: metila, propionila e vinila — e um algarismo romano que indica o isômero resultante dos diferentes arranjos possíveis dos substituintes ao redor do anel tetrapirrólico. Nas protoporfirinas podem formar-se 15 isômeros (I a XV), mas somente a protoporfirina IX é sintetizada pelos seres vivos.

OceanofPDF.com

4 O Sentido das Reações

Uma transformação, por exemplo, 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 transformação).

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 *exergônicas* ou *espontâneas*. 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. A transformação de diamante em grafite, por exemplo, é espontânea (porque, quando ocorre, libera energia) e, no entanto, os diamantes são bastante estáveis. Também é possível manter glicose em contato com oxigênio sem que ocorra oxidação do açúcar em tempo mensurável; a reação de oxidação de glicose por oxigênio é espontânea, por liberar energia quando ocorre, mas a sua velocidade é praticamente igual a zero. Em contraposição às espontâneas, as transformações que teoricamente ocorreriam com o estado final tendo mais energia do que o estado inicial são denominadas *endergônicas* ou *não espontâneas*. Estas reações simplesmente não ocorrem. Reiterando, a espontaneidade de uma reação e a quantidade de energia por ela liberada são completamente desvinculadas de parâmetros cinéticos, como a velocidade.

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

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

4.1 Variação de energia livre: critérios de espontaneidade

Uma reação apresenta diferentes valores de DG, com sinal positivo ou negativo

Qualquer reação química é acompanhada de uma variação de energia livre, referente à diferença entre o conteúdo energético dos produtos e reagentes e o valor da diferença revela o grau de espontaneidade da reação. 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[1] 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:

$$A \rightleftharpoons B$$

o valor de ΔG pode ser obtido calculando-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, por convenção, é negativo;

se aconteceu no sentido B → A (no sentido oposto ao que está escrita), o sinal de ΔG, por convenção, é positivo.

Para ilustrar como varia o ΔG em função das concentrações iniciais dos componentes de uma reação, suponha-se que a reação indicada tenha constante de equilíbrio igual a 2 (K_{eq} = 2); no equilíbrio, a razão [B]/[A] deve ser igual a 2. Algumas situações iniciais hipotéticas, numeradas de I a V, encontram-se na Tabela 4.1. Em todas estas situações, o equilíbrio será atingido quando a concentração de B for igual a 8 (unidades de concentração, por exemplo, mol por litro) e a de A for igual a 4. Na situação I, em que a reação é iniciada com 8 de A e 4 de B, a reação deve processar-se no sentido A → B, até que seja atingida a concentração 8 de B, restando 4 de A. A partir deste ponto, não há mais transformação, a reação atingiu o equilíbrio: o valor de ΔG pode ser aferido e lhe será atribuído 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 "o grau" 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: neste 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 com sinal positivo. Um resultado análogo será verificado na comparação entre as situações V e I.

Resumindo, *para uma mesma reação* (A ⇌ B) *, existirão diversos valores de* Δ*G,* ***dependendo das concentrações iniciais de*** **A** ***e*** **B**, *e a reação poderá ocorrer no sentido* A → B *ou* B → A. *Por convenção, o valor de* ⇌ *G tem sinal negativo quando a transformação chegou ao equilíbrio com a reação processando-se no sentido em que foi escrita* (A → B) *e tem sinal positivo, quando o equilíbrio foi atingido com a reação processando-se no sentido contrário a este* (B → A).

Também para uma reação mais complexa, do tipo:

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

as mesmas considerações são válidas: haverá vários valores de ΔG e a reação ocorrerá no sentido em que está escrita ou no sentido oposto, conforme as concentrações iniciais de A, B, C e D.

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

Situação	Concentrações iniciais		Transformação ocorrida	Sinal de ΔG
	[A]	[B]		
I	8	4	4A → 4B	Negativo
II	6	6	2A → 2B	Negativo
III	4	8	—	Zero
IV	2	10	2B → 2A	Positivo
V	0	12	4B → 4A	Positivo

$\Delta G^{o\prime}$ indica o sentido da reação somente nas condições padrão

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*, simbolizada por ΔG^o. 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 iguais a 1 M, temperatura de 25°C, pressão de 1 atmosfera e pH = 0. O valor de ΔG^o é a variação de energia livre entre o instante inicial, dentro das condições padrão, e o momento em que a reação entra 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 ΔG9, para concentrações quaisquer das espécies envolvidas e $\Delta G^{o\prime}$, para concentrações 1 M.

Partindo-se das condições padrão, uma reação química pode atingir o equilíbrio, processando-se no sentido em que foi escrita ou no sentido

contrário e o sinal convencionado para $\Delta G^{o\prime}$, analogamente ao $\Delta G'$, é negativo no primeiro caso e positivo, no segundo.

Considerando uma reação hipotética A + B ⇌ C + D, em condições padrão, quando, no equilíbrio, a concentração de C e a concentração de D são*maiores* que + M e a reação ocorreu no sentido em que foi escrita, o $\Delta G^{o\prime}$ é negativo. Este é o caso, por exemplo, da hidrólise da sacarose:

$$\text{Sacarose} + H_2O \rightleftharpoons \text{Glicose} + \text{Frutose} \qquad \Delta G^{o\prime} = -29{,}3\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Para outra reação, E + F ⇌ G + H, também em condições padrão, pode ocorrer o inverso: as concentrações de G e H no equilíbrio são *menores* do que 1 M, ou seja, o equilíbrio foi obtido com a reação se processando no sentido contrário ao que foi escrito e o sinal de $\Delta G^{o\prime}$ é positivo. É o caso da reação seguinte (Seção 10.1):

$$\text{Malato} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Oxaloacetato} + NADH + H^+ \qquad \Delta G^{o\prime} = +29{,}7\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

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 malato e NAD^+. O valor de $\Delta G^{o\prime}$ será o mesmo, entretanto, com sinal negativo, porque a reação processou-se no sentido em que foi escrita.

$$\text{Oxaloacetato} + NADH + H^+ \rightleftharpoons \text{Malato} + NAD^+ \qquad \Delta G^{o\prime} = -29{,}7\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

O sinal de$\Delta G^{o\prime}$ indica, portanto, o sentido em que a reação ocorre em condições padrão.

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

O valor de $\Delta G'$ de uma reação, por exemplo, A + B ⇌ C + D, depende das concentrações iniciais de reagentes e produtos, e do valor de $\Delta G^{o\prime}$, segundo a fórmula

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

onde R é a constante dos gases (8,31 $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$) e T é a temperatura na escala Kelvin.

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

$$\Delta G' = 0$$

donde

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

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

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

Obtém-se:

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

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 (Tabela 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 processando-se em dois sentidos diferentes:

a) 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 $\Delta G^{o\prime}$ é negativo, ou seja, a reação processou-se no sentido em que foi escrita
b) 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 $\Delta G^{o\prime}$ é positivo, ou seja, a reação processou-se no sentido oposto ao escrito.

Tabela 4.2 Valores de constante de equilíbrio e de variação de energia livre padrão a pH 7.

K_{eq}	$\Delta G^{o\prime}$ (kJ · 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

O sentido das reações é indicado pelo sinal de ΔG′

Ficou estabelecido até aqui que, quando se trata de concentrações de reagentes e produtos fixadas em 1 M, o sentido da reação é indicado pelo sinal de $\Delta G^{o\prime}$. Pode-se demonstrar que, neste caso, o valor de $\Delta G^{o\prime}$ coincide com o valor de ΔG9. Seja, por exemplo, a reação

$$C \rightleftharpoons D$$

com K_{eq} igual a 10^{-2} e $\Delta G^{o\prime}$ igual a +11,4 kJ mol^{-1} (Tabela 4.2). O valor de ΔG′ é dado por:

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

Na condição examinada, as concentrações de C e D são iguais a 1 M e [D]/[C] = 1 e 2,3 RT log [D]/[C] = 0. Assim,

$$\Delta G' = \Delta G^{o\prime}$$

e a reação ocorre no sentido indicado por $\Delta G^{o\prime}$ e ΔG9, ou seja, de D para C (D → C).

Considere-se agora, para a mesma reação, a situação em que a concentração inicial de reagente é significativamente maior do que a de produto, por exemplo [C] = + M e [D] = 10^{-3} M. A razão [D]/[C] será 10^{-3} e o sinal de ΔG9 será negativo:

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

Neste caso, a reação ocorrerá no sentido indicado por ΔG9, ou seja, de C para D (C → D), contrário ao sentido em que ocorre nas condições padrão.

Generalizando, *o sentido das reações é estabelecido pelo sinal de* $\Delta G'$*; no caso das condições padrão, seu valor coincide com o de* $\Delta G^{o\prime}$*. 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 $\Delta G^{o\prime}$ positivo poderão ocorrer no sentido em que estão escritas, desde que a razão entre as concentrações iniciais de produtos e reagentes seja menor do que a constante de equilíbrio, ou seja, em condições onde o $\Delta G'$ é negativo.

Um composto é considerado rico em energia segundo o valor do $\Delta G^{o\prime}$ da hidrólise de uma de suas ligações

A grande utilidade do conceito e dos valores de $\Delta G^{o\prime}$ para a Bioquímica é estabelecer um parâmetro que permite comparar reações. Como o $\Delta G'$ de cada reação varia com as concentrações iniciais de reagentes e produtos,

tais comparações são feitas por meio dos valores de $\Delta G^{o\prime}$ das diferentes reações, por serem únicos.

Uma aplicação importante desse critério de comparação é a possibilidade de avaliar o conteúdo energético de diferentes compostos. Para tanto, analisa-se o $\Delta G^{o\prime}$ da reação de hidrólise de uma ligação específica do composto; em muitos casos, tal ligação é estabelecida com um grupo fosfato (Tabela 4.3). Considere-se o caso do *ATP* (*adenosina trifosfato*), um composto essencial do metabolismo. O ATP e seus derivados — *ADP* (*adenosina difosfato*) e *AMP* (*adenosina monofosfato*) — são constituídos por uma base nitrogenada (adenina), um açúcar (ribose) e, pelo menos, um grupo fosfato[2] (Figura 4.1). O grupo fosfato α está ligado à ribose por ligação éster fosfórico; a ligação entre os grupos fosfato α e β e entre β e γ é do tipo anidrido fosfórico. A reação de hidrólise do ATP produz ADP e fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4), representado por P_i, e apresenta $\Delta G^{o\prime}$ igual a – 31 kJ · mol^{-1}:

$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + HPO_4^{2-} + H^+$$

Como o $\Delta G^{o\prime}$ da reação de hidrólise é negativo e tem valor absoluto maior do que 25 kJ · mol^{-1}, o ATP é classificado como um *composto rico em energia*. Exemplos de $\Delta G^{o\prime}$ de hidrólise de outros compostos estão alistados na Tabela 4.4.

Na verdade, reações de hidrólise de compostos ricos em energia, como o ATP, só ocorrem nas células em condições especiais, apesar de terem $\Delta G^{o\prime}$ tão favoráveis. Vale lembrar que a reação de hidrólise de ATP é muito favorável termodinamicamente, mas desfavorável cineticamente. Além disto, as enzimas capazes de promover a hidrólise de ATP são poucas e estão submetidas a rigoroso controle celular.

Por outro lado, o ATP apresenta alto potencial de transferência do grupo fosfato para moléculas aceptoras, esta sim, uma reação frequente no metabolismo, e espontânea. Graças a esta propriedade, o ATP cumpre um papel fundamental, o de possibilitar a substituição de processos termodinamicamente inviáveis por outros viáveis, dos quais ele participa. *Esta discussão é retomada no Capítulo 8, que apresenta exemplos ilustrativos da atuação do ATP*.

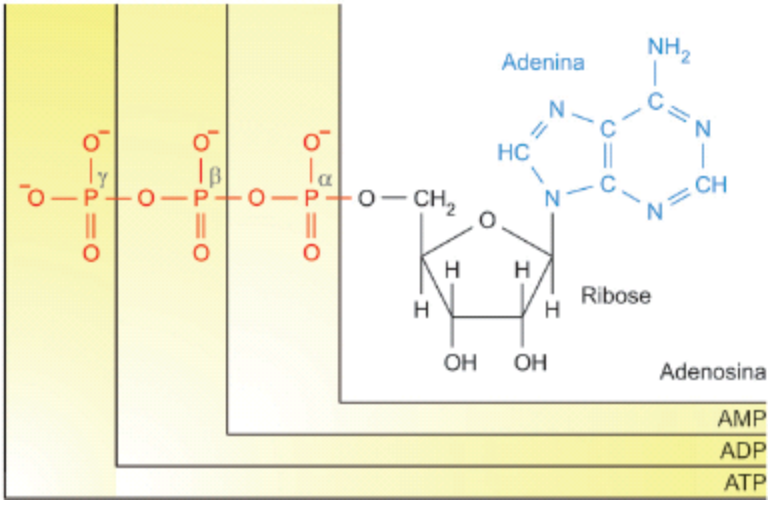
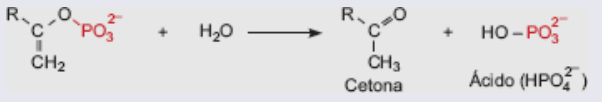
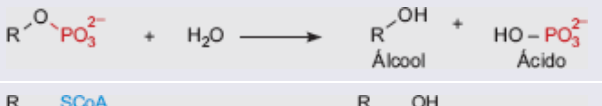
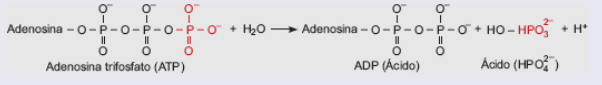
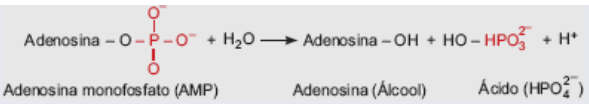


Figura 4.1 Estrutura da adenosina, adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP). Nos três nucleotídios (AMP, ADP e ATP), o grupo fosfato está unido à ribose da adenosina por ligação éster fosfórico ($\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólise = − 15 kJ · mol^{-1}); no ADP e no ATP, a ligação com o(s) outro(s) grupo(s) fosfato é do tipo anidrido fosfórico ($\Delta G^{\circ\prime}$ de hidrólise = − 31 kJ · mol^{-1}).

Tabela 4.3 Classificação de ligações segundo os produtos de sua hidrólise e valores aproximados de $\Delta G^{\circ\prime}$ das reações. Reações de hidrólise de ATP, ADP e AMP.

Tipo de ligação	Reação de hidrólise	$\Delta G^{\circ\prime}$ (kJ · mol^{-1})
Fosfoenol		– 60
Anidrido carboxílico-fosfórico		– 40
Éster fosfórico		– 15
Tioéster		– 30
Anidrido fosfórico		– 31
Anidrido fosfórico		– 31

Éster fosfórico		– 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 da hidrólise forem um ácido carboxílico e ácido fosfórico (HPO_4^{2-} a pH 7,4), a ligação é classificada como *anidrido carboxílico-fosfórico* (anidrido misto ou acil-fosfato); se os compostos resultantes forem um álcool e ácido fosfórico, a ligação é classificada como *éster fosfórico*; quando se formarem dois ácidos fosfóricos, a ligação é *anidrido fosfórico*. Notar que a classificação refere-se à ligação, e não ao composto como um todo.

Tabela 4.4 Tipo de ligação hidrolisada e variação de energia livre padrão a pH 7 da reação de hidrólise.

Composto	Tipo de ligação hidrolisada	$\Delta G^{o\prime}$ (kJ • mol–1)
Fosfoenolpiruvato	Fosfoenol	– 62
1,3-Bisfosfoglicerato	Anidrido carboxílico-fosfórico	– 49
Creatina fostato	Fosfoguanidino	– 43
ATP (a ADP + Pi)	Anidrido fosfórico	– 31
Acetil-CoA	Tioéster	– 31
Glicose 1-fosfato	Éster fosfórico	– 21
Frutose 6-fosfato	Éster fosfórico	– 14

Todos os compostos são classificados como *compostos ricos em energia*, menos glicose 1-fosfato e frutose 6-fosfato. A estrutura da creatina fosfato encontra-se na Figura 22.8, as do ATP e ADP na Figura 4.1, a da acetil-CoA na Figura 9.8 e as demais na Figura 9.5. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4).

Algumas reações não podem ser revertidas nas condições celulares

Uma reação pode ocorrer no sentido inverso ao das condições padrão. Biologicamente, nem sempre isto é viável. Um exemplo é a reação de hidrólise de ATP em ADP e P_i, que tem $\Delta G^{o\prime}$ negativo e com valor absoluto alto. A constante de equilíbrio da reação é, pois, muito grande e, para que a

reação pudesse ocorrer no sentido da síntese de ATP, seria necessário que as concentrações de ADP e P_i fossem exageradamente altas, para tornar negativo o valor de $\Delta G'$. Tais valores de concentração nunca são encontrados nas células e a reação, simplesmente como foi escrita, jamais é utilizada para a síntese *in vivo* de ATP. *O mecanismo biológico para produzir ATP é extremamente complexo e está analisado no* Capítulo 11.

Na célula, as reações com $\Delta G^{o\prime}$ positivo são seguidas de reações com $\Delta G^{o\prime}$ negativo

Além do consumo de ATP, as células dispõem de outros mecanismos para a realização de transformações metabólicas desfavoráveis.

Ao longo das sequências de reações que compõem o metabolismo celular, encontram-se reações cujo valor de $\Delta G^{o\prime}$ é positivo. Apesar disto, elas procedem no sentido em que estão escritas, isto é, no sentido oposto ao indicado pelo sinal de $\Delta G^{o\prime}$. Não há contradição entre as duas afirmações, porque, nas células, as reações estão fora das condições padrão (as concentrações de reagentes e produtos são diferentes de 1 M), e o sentido da reação é dado pelo $\Delta G'$. Nas vias metabólicas, as reações com $\Delta G^{o\prime}$ positivo são seguidas de reações que têm $\Delta G^{o\prime}$ negativo. Estas reações são designadas *acopladas*. O acoplamento consiste no fato de pelo menos um dos produtos da primeira reação ser usado como reagente da segunda reação. No exemplo seguinte, as reações são acopladas pelo intermediário comum C:

$$\begin{array}{rl} A \rightleftharpoons B + C & \Delta G^{o\prime} = +13\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \\ C + D \rightleftharpoons E & \Delta G^{o\prime} = -22\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \\ \hline A + D \rightleftharpoons B + E & \Delta G^{o\prime} = -9\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \end{array}$$

O consumo contínuo de C pela segunda reação estabelece, para a primeira reação, uma razão [B] [C]/[A] sempre menor do que a do equilíbrio — o sinal de $\Delta G'$ da primeira reação torna-se negativo e a reação processa-se no sentido $A \rightarrow B + C$, apesar do valor positivo de seu $\Delta G^{o\prime}$. O recurso teórico da adição das reações intermediárias e dos seus respectivos

valores de $\Delta G^{o\prime}$ mostra que o processo global (A + D ⇌ B + E) apresenta $\Delta G^{o\prime\prime}$ negativo.

4.2 Reações de oxidação-redução

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

$$A_{red} \rightleftharpoons A_{ox} + e^-$$

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:

$$B_{ox} + e^- \rightleftharpoons B_{red}$$

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

$$A_{red} + B_{ox} \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red}$$

Em muitas reações biológicas de oxidação-redução, os elétrons transferidos são acompanhados de prótons, ou seja, há transferência de átomos de hidrogênio:

$$\underset{\text{(red)}}{AH_2} + \underset{\text{(ox)}}{B} \rightleftharpoons \underset{\text{(ox)}}{A} + \underset{\text{(red)}}{BH_2}$$

A tendência de um par redox (A_{ox}/A_{red}) em perder ou ganhar elétrons é expressa pelo seu *potencial de redução*, representado por *E*. Quando na presença de outro par redox, a transferência de elétrons ocorrerá do par com

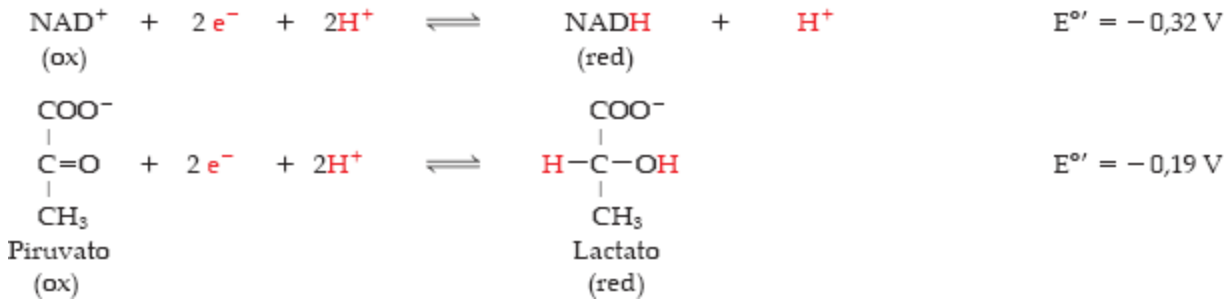
menor potencial de redução para o par com maior potencial de redução. A diferença entre os potenciais de redução dos dois pares redox é o ΔE da reação. Analogamente ao valor de ΔG, este potencial depende não só das espécies envolvidas, mas das concentrações da forma oxidada e da forma reduzida das espécies. Define-se também o *potencial de redução padrão*, E^o, 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^o.

As medidas de E^o 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 ($2\ H^+ + 2\ e^- \leftrightharpoons H_2$) com uma atmosfera de pressão e tem, por convenção, E^o igual a zero volt. Para medir o E^o 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 é o E^o 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^o e de E em pH = 7 recebem a notação $E^{o\prime}$ e E'.

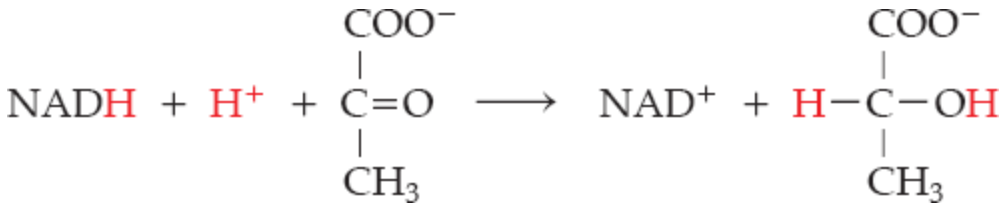
Se as concentrações das formas oxidada e reduzida forem diferentes de 1 M, o potencial de redução do sistema (E′) será função dessas concentrações e do potencial de redução padrão ($E^{o\prime}$), como mostra a *equação de Nernst*:

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

O valor de $E^{o\prime}$ é uma medida da afinidade de um par redox por elétrons, ou seja, quanto maior o potencial, maior esta afinidade. Quando dois pares com $E^{o\prime}$ diferentes são acoplados, o par de $E^{o\prime}$ menor reduzirá o par de $E^{o\prime}$ maior. Considerem-se dois pares redox:



Misturando-se as quatro espécies, cada uma com concentração igual a 1 M, o par com $E^{o\prime}$ menor (NAD^+/NADH) doa elétrons para o par com $E^{o\prime}$ 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 redução padrão ($\Delta E^{o\prime}$) ocorrida é:

$$\Delta E^{o\prime} = E^{o\prime} \text{ do oxidante} - E^{o\prime} \text{ do redutor}$$
$$\Delta E^{o\prime} = -0{,}19 - (-0{,}32)$$
$$\Delta E^{o\prime} = +0{,}13 \text{ V}$$

Nas reações de oxidação-redução, a variação de energia livre padrão pode ser determinada pela variação do potencial de redução padrão ($\Delta E^{o\prime}$):

$$\Delta G^{o\prime} = -n\,\mathcal{F}\,\Delta E^{o\prime}$$

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

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

$$\Delta G^{o\prime} = -n\,\mathcal{F}\,\Delta E^{o\prime}$$

$$\Delta G^{o\prime} = -2 \times 96{,}5 \times 0{,}13$$

$$\Delta G^{o\prime} = -25{,}09\ kJ \cdot mol^{-1}$$

A transformação é realmente espontânea: foi o valor positivo de $\Delta E^{o\prime}$ o determinante do valor negativo de $\Delta G^{o\prime}$e 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^1. Portanto, a razão NAD^+/NADH deixa de ser 1 M/1 M, assumindo valores gradativamente maiores e o valor de E9 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; a razão de concentração piruvato/lactato também deixa de ser 1 M/1 M, gradativamente assume valores menores e o E9 vai diminuindo.

Em consequência destas variações, os potenciais de redução (E′) dos dois pares vão ficando cada vez mais próximos: o valor de ΔE′ torna-se cada vez menor, diminuindo, paralelamente, o valor de ΔG′ Quando o E9 dos dois pares se igualarem, ΔE′ torna-se igual a zero, ΔG′ também se reduz a zero, não há mais deslocamento de elétrons e a reação “para”, isto é, a reação atingiu o equilíbrio.

Bibliografia

Alberty RA: *Thermodynamics of Biochemical Reactions*. Wiley-Interscience, 2003.

Atkins PW, Palma J: *Physical Chemistry*, 7th ed. W. H. Freeman, 2001.

Lambert FL: Entropy is simple, qualitatively. *J Chem Educ* **79** (10): 1241-1246, 2002.

Tinoco I *et al.*: *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Science*, 4th ed. Prentice Hall, 2002.

[1] O valor de ΔG é expresso em quilojoules (kJ); um quilojoule equivale a 0,239 quilocaloria (kcal).

[2] Compostos com esta estrutura são designados *nucleotídios*, por serem os monômeros constituintes dos ácidos nucleicos, embora desempenhem outras funções, como é o caso do ATP. A porção da molécula do nucleotídio formada pela base nitrogenada ligada ao açúcar é chamada *nucleosídio* (*adenosina*, quando a base é a *adenina*).

OceanofPDF.com

5 Enzimas

A manutenção da vida celular depende da contínua ocorrência de um conjunto de reações químicas, que devem atender duas exigências fundamentais: (1) devem ocorrer em *velocidades adequadas* à fisiologia celular — a insuficiência na produção ou na remoção de metabólitos pode levar a condições patológicas, e (2) precisam ser altamente *específicas*, de modo a gerar produtos definidos.

Quando se examina a composição química de uma célula simples como a de *Escherichia coli* (Tabela 5.1), uma bactéria presente 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 separação em diferentes compartimentos 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. De fato, uma reação química pode ser termodinamicamente viável ou espontânea (Seção 4.1), mas ter velocidade igual a zero ou muito próxima de zero. Por exemplo, glicose cristalizada ou em solução pode ser mantida em contato com oxigênio, sem que ocorra oxidação do açúcar, apesar da oxidação de glicose liberar grande quantidade de energia. A velocidade com que esta transformação ocorre, em tempo mensurável, é igual a zero.

A presença de proteínas com função catalítica, as *enzimas*, dirigindo todas as reações celulares permite atender as duas exigências inicialmente apresentadas.

Como *catalisadores*, as enzimas aumentam de várias ordens de grandeza a velocidade das reações que catalisam (Tabela 5.2) — a oxidação de glicose por oxigênio por meio de uma sequência de reações catalisadas por enzimas pode ser feita nas células em minutos. Para ter uma ideia do papel indispensável das enzimas, basta lembrar que mesmo reações que têm água como reagente (e a concentração da água é 55,5 M) são catalisadas por enzimas. Ademais, por serem altamente específicas, as enzimas "selecionam", entre todas as reações potencialmente possíveis, aquelas que efetivamente irão ocorrer.

Durante muito tempo, admitiu-se que todos os catalisadores biológicos fossem proteínas. No início da década de 1980, entretanto, verificou-se que moléculas de RNA catalisavam reações químicas celulares. A descoberta foi surpreendente e este tipo particular 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). Sua atuação nas reações metabólicas está restrita a alguns casos especiais, conquanto importantes. Cerca de 10 anos depois da identificação das ribozimas, foram selecionados, *in vitro*, pequenos segmentos de DNA com atividade catalítica, as *desoxirribozimas*, que, todavia, não são encontradas na natureza.

Tabela 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

Nucleotídios e seus precursores	0,5	200
Outras moléculas	0,2	200

Tabela 5.2 Aumento da velocidade da reação por catálise enzimática.

Reação	Enzima	Vc/V[(1)]
$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$	Anidrase carbônica	10^7
Di-hidroxiacetona fosfato ⇌ Gliceraldeído 3 -fosfato	Triose fosfato isomerase	10^9
Glicose + ATP ⇌ Glicose 6 -fosfato + ADP + H^+	Hexoquinase	10^{10}
Glicose 6-fosfato ⇌ Glicose 1-fosfato	Fosfoglicomutase	10^{12}
Ureia + H_2O ⇌ $NH_3 + CO_2$	Urease	10^{14}
Orotidina monofosfato ⇌ Uridina monofosfato + CO_2	Orotidina monofosfato descarboxilase	10^{17}

[(1)]Vc = velocidade da reação catalisada; V = velocidade da reação não catalisada.

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 diminuírem sua energia de ativação

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

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

[B] e [A] representam as concentrações molares de B e de A, e a unidade da velocidade (v) é mols por litro por segundo.

A velocidade da reação é 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 igual a 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

$$2A \rightleftharpoons B + C \text{ ou } A + B \rightleftharpoons C + D$$

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

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

Para um melhor entendimento dos fatores que interferem na velocidade de reação, é importante analisar como ocorre a transição entre reagente e produto (ou entre reagentes e produtos). Considere-se o diagrama de uma reação espontânea (Figura 5.1) que mostra a variação de energia livre do sistema em função de um parâmetro genérico da reação que mede a sua progressão, o seu *caminho*. Na reação espontânea, a energia dos produtos é menor do que a dos reagentes. Nota-se, ainda, que para se transformar no produto, o reagente deve passar por um estado intermediário, de maior energia. Assim, para reagir, as moléculas devem ter uma quantidade de energia que lhes permita atingir o estado reativo, chamado *estado de transição*.

Uma reação de primeira ordem envolve, muitas vezes, alterações da molécula do reagente (único), que requerem energia e que a fazem alcançar o estado de transição. Esta condição, para cada molécula, ocorre ocasionalmente, de modo que somente uma fração das moléculas de um

sistema está apta a sofrer a reação. Uma reação de segunda ordem só ocorre quando duas moléculas diferentes colidem — ao se chocarem, as moléculas devem estar com orientação apropriada uma em relação à outra e a colisão deve levá-las a adquirir uma quantidade mínima de energia que lhes permita atingir o estado de transição. Muitos choques são improdutivos ou porque ocorrem entre moléculas direcionadas de modo inadequado ou porque as colisões não são suficientemente energéticas.

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 livre de ativação* ou *energia de ativação* (E_a). Esta energia é, portanto, a "barreira" que separa os reagentes dos produtos (Figura 5.1) e equivale ao adicional à energia média das moléculas de reagente, necessária para atingir o estado de transição. 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.

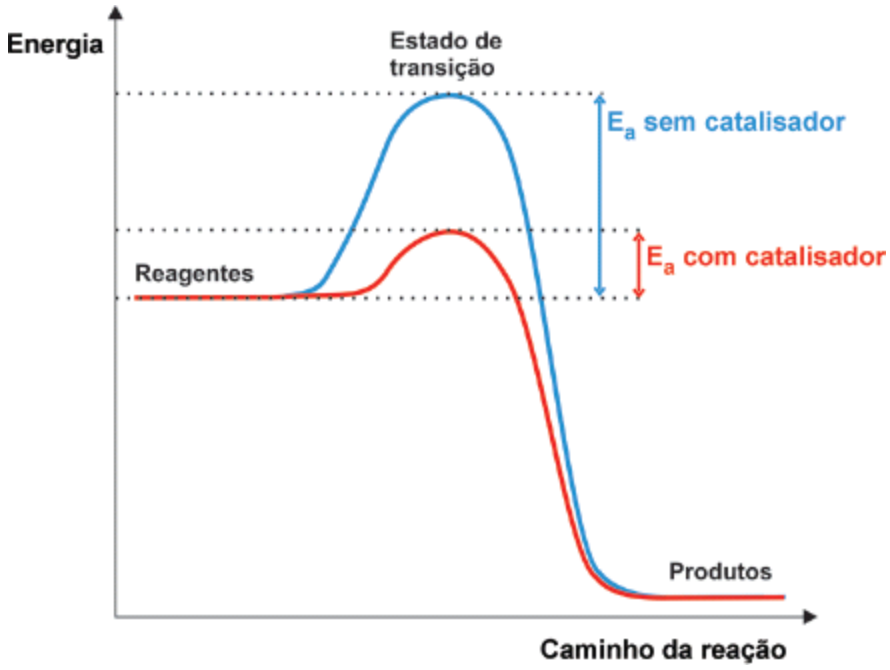


Figura 5.1 Diagrama mostrando a variação de energia livre em função do caminho de uma reação espontânea hipotética. Na presença do catalisador, a reação ocorre por um caminho alternativo com energia de ativação (E_a) menor.

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, respeitando o mesmo padrão de distribuição de energia.

A decorrência das considerações expostas é que a velocidade de reação pode ser aumentada de três maneiras diferentes:

1. *aumentando a concentração do reagente*, como estabelecido pela equação da velocidade;
2. *elevando a temperatura*, pois um número maior de moléculas atinge a energia de ativação (Figura 5.2 a);
3. *diminuindo a energia de ativação*, por permitir que, mesmo mantida a temperatura, um número maior de moléculas atinja a energia necessária para reagir (Figura 5.2 b).

A redução do 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* aceleram a velocidade da reação, sem alterar a proporção entre reagentes e produtos encontrada no final da reação e sem serem consumidos no 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 quando a reação termina.

As *enzimas* catalisam praticamente todas as reações químicas que se processam nos seres vivos. Nas reações enzimáticas, os reagentes são chamados *substratos*.

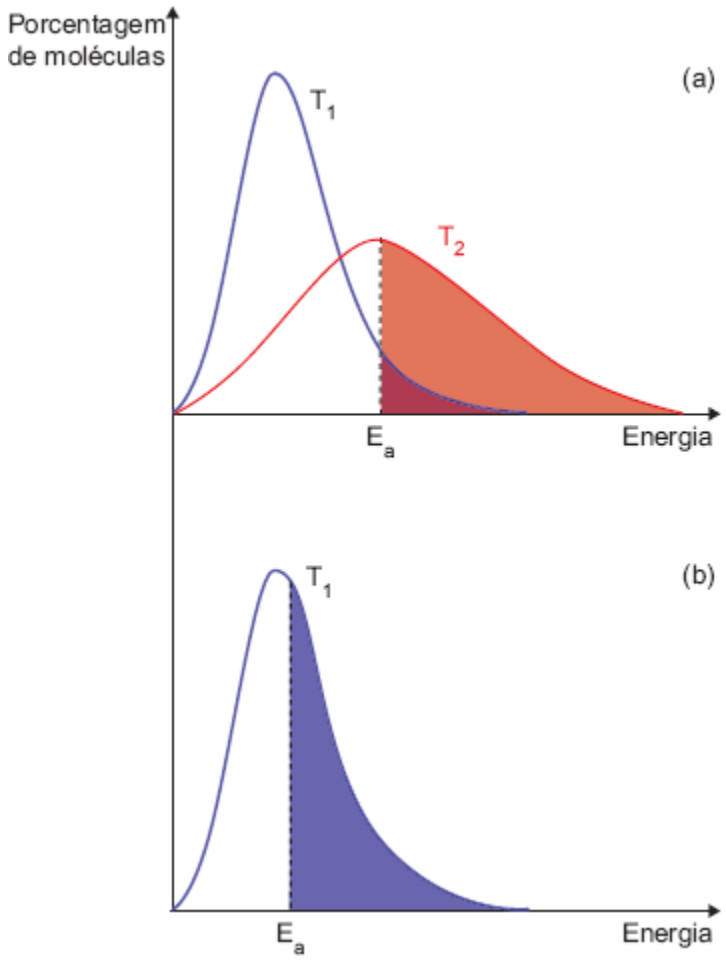


Figura 5.2 Alteração da distribuição de energia entre as moléculas de uma população que se encontram em uma temperatura T_1: (a) por aumento da temperatura ($T_2 > T_1$); (b) pela presença de um catalisador. A área colorida representa a fração da população com energia igual ou maior do que a energia de transição (E_a).

A eficiência da catálise enzimática deriva da ligação do substrato à enzima

Geralmente há uma grande diferença de tamanho entre as moléculas de enzimas e as de seus substratos. As enzimas são macromoléculas proteicas — mesmo as menores são formadas de mais de uma centena de aminoácidos — e suas massas molares variam de 10.000 a alguns milhões, enquanto a massa molar dos substratos é muitas ordens de grandeza inferior (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 Massas molares aproximadas de enzimas e de seus substratos.

Enzima	Substrato	Massa molar aproximada
Catalase		200.000
	H_2O_2	34
Urease		500.000
	Ureia	60
Fosfofrutoquinase		380.000
	Frutose 6-fosfato	300
Glutamina sintetase		600.000
	Glutamato	150

Embora, em geral, o total da molécula enzimática seja necessário para a catálise, a ligação com o substrato dá-se apenas em uma região pequena e bem definida da enzima, chamada *sítio ativo*. O sítio ativo constitui uma cavidade com forma definida, revestida por cadeias laterais de aminoácidos, algumas das quais ajudam a ligar o substrato enquanto outras participam diretamente da catálise. A estrutura do sítio ativo é responsável pela grande especificidade das enzimas, pois permite à enzima "reconhecer" seu substrato. Uma molécula, para ser aceita como substrato, deve ter uma forma complementar à do sítio ativo e conter grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo.

A relação substrato-enzima não deve ser entendida como um modelo rígido de chave-fechadura. A ligação do substrato induz uma mudança na conformação da enzima (Figura 5.3), amoldando sua forma à do substrato e fazendo-a adquirir uma nova configuração, ideal para a catálise. É o que se chama *ajuste induzido*.

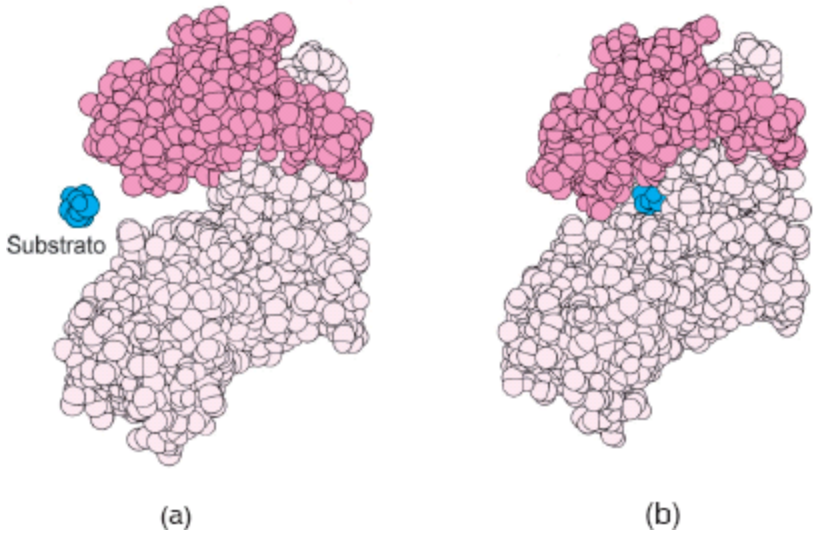


Figura 5.3 Mudança da conformação da enzima induzida pela ligação com o substrato. O exemplo mostra a hexoquinase antes (a) e depois (b) de se ligar ao substrato, a glicose. A molécula da enzima consta de dois domínios, que se aproximam, encaixando o substrato.

A ligação à enzima modifica também a molécula do substrato, que é submetida a tensão e distorção, assumindo uma conformação aproximada à que tem no estado de transição, mas com menor conteúdo energético. Ainda mais, a ligação das moléculas dos substratos ao sítio ativo propicia sua correta orientação e sua aproximação, favorecendo a reação, que passa a depender muito menos dos choques casuais entre moléculas. Na verdade, as enzimas reproduzem os mecanismos da catálise não enzimática de reações orgânicas. Nestes processos, cadeias laterais de aminoácidos do sítio ativo adicionam ou removem prótons do substrato, ou formam ligações covalentes transitórias com o substrato. As enzimas, como todos os catalisadores, criam um novo *caminho* para a reação, com um novo estado de transição, que requer menor energia de ativação (Figura 5.1).

Um exemplo simples deste novo caminho é a hidrólise de um éster catalisada por ácido (Figura 5.4). A reação de hidrólise consiste no ataque do oxigênio (que tem carga residual negativa) da 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 é alta. Os íons H^+ originados da dissociação do ácido criam 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 suscetível ao ataque do oxigênio da água. Este novo caminho, na presença de H^+, tem energia de ativação menor e, em uma mesma temperatura, mais moléculas poderão reagir e a velocidade da reação será maior. Se a mesma reação fosse catalisada por uma enzima, a atuação catalítica do íon H^+ poderia ser exercida por um grupo NH_3^+ pertencente à cadeia lateral de um resíduo de lisina do sítio ativo.

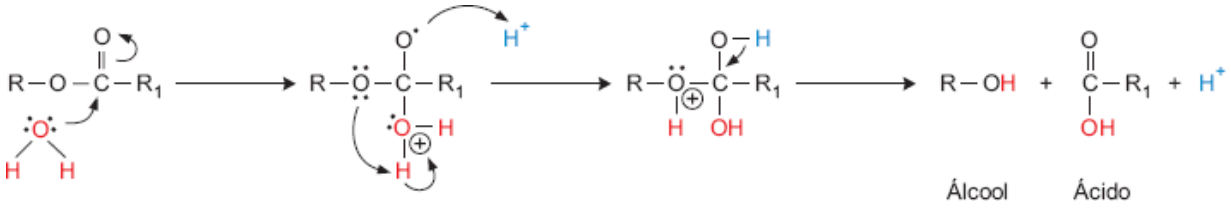


Figura 5.4 Mecanismo da hidrólise de um éster catalisada por um ácido. A presença dos íons H^+ altera a distribuição de cargas elétricas do éster, criando um caminho de reação.

As enzimas são mais eficientes que os catalisadores não enzimáticos

As enzimas aceleram a velocidade das reações em várias ordens de grandeza maiores do que os catalisadores não enzimáticos; tornam possível a ocorrência, a velocidades apreciáveis, de reações cujas velocidades seriam desprezíveis na sua ausência (Tabela 5.2). 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 reações para as quais a célula possua enzimas específicas. Ainda mais: como são sintetizadas pelas próprias células, *sua concentração e sua atividade podem ser reguladas*, permitindo um ajuste fino do metabolismo às condições fisiológicas.

O conjunto destes aspectos favoráveis possibilita a manutenção da vida, justificando o alto investimento energético para a síntese de enzimas.

5.1.1 Graus de especificidade das enzimas

O sítio ativo de uma enzima permite a ligação apenas do seu substrato, trazendo grande especificidade para a catálise. O grau de especificidade

varia com a enzima considerada. Há enzimas que aceitam como substratos 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 não enzimáticos. Os íons H^+, por exemplo, agem como catalisadores em um grande número de reações, incluindo a hidrólise de ésteres, proteínas e polissacarídios. As *enzimas proteolíticas*, ao contrário, são específicas para a hidrólise de proteínas, não atuando sobre carboidratos ou lipídios, para cujas hidrólises são requeridas 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 são encontrados entre as *L-aminoxidases*, por exemplo. São enzimas capazes de reconhecer aminoácidos na configuração L, sendo inativas com isômeros na forma D.

5.2 Classificação e nomenclatura das enzimas

As enzimas são classificadas em seis grupos de acordo com o tipo de reação que catalisam (Tabela 5.4) e cada grupo é subdividido em classes e subclasses. Cada enzima recebe um nome que descreve a reação que catalisa e um código numérico, de tal forma que possa ser identificada sem ambiguidade.

Por exemplo, a enzima que catalisa a oxidação do etanol por NAD^+ é designada *álcool:NAD*$^+$: *oxirredutase* e tem o número de classificação EC 1.1.1.1. (*EC* de ***E****nzyme* ***C****omission*), que significa:

EC 1 = oxirredutases

EC 1.1 = oxirredutases que atuam sobre doadores de elétrons com grupo HC-OH

EC 1.1.1 = oxirredutases que atuam sobre doadores com grupo HC– OH e catalisam uma reação que tem NAD^+ ou $NADP^+$ como aceptores de elétrons

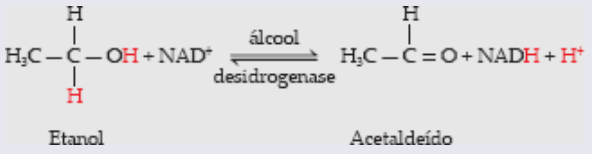
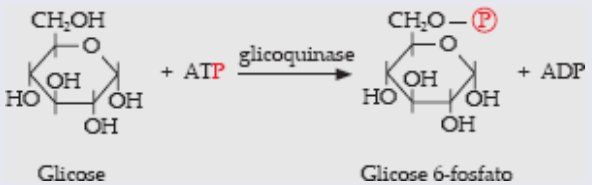
EC 1.1.1.1 = enzima que catalisa a oxidação do etanol.

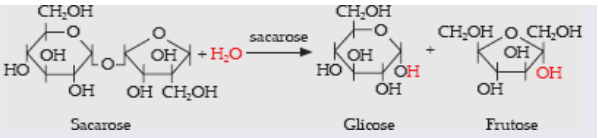
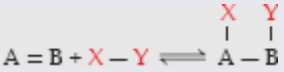
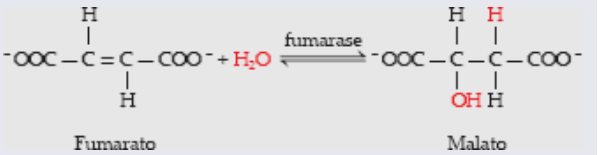
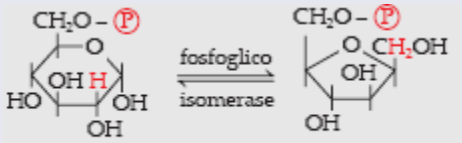
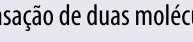
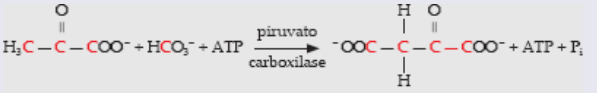
A nomenclatura oficial é, na prática, substituída por nomes mais simples ou que se tornaram clássicos. A álcool:NAD^+: oxirredutase é comumente referida como *álcool desidrogenase*; a enzima que catalisa a síntese de glicogênio, oficialmente designada *UDPglicose:glicogênio 4-α-D-glicosiltransferase* (EC 2.4.1.11), é chamada *glicogênio sintase*. Na terminologia usual, o nome é dado indicando o substrato, seguido de outra palavra terminada em *ase* que especifica o tipo de reação que a enzima catalisa. Sendo assim, com um pouco de prática, é possível prever o nome da enzima conhecendo-se a reação que ela catalisa e vice-versa. Mesmo esta forma simplificada de nomenclatura apresenta exceções, como é o caso das enzimas digestivas: *pepsina, tripsina* etc., cujos nomes triviais tornaram-se clássicos.

5.3 Fatores que interferem na atividade enzimática: pH e temperatura

A estrutura e a forma do sítio ativo são uma decorrência da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças na conformação da proteína. Isto torna a atividade enzimática dependente das características do meio, notadamente do pH e da temperatura (Seção 2.8).

Tabela 5.4 As seis classes de enzimas e as reações que catalisam.

Classe	Tipo de reação	Exemplo
1. Oxirredu-tases	Oxidação-redução $AH_2 + B \rightleftharpoons A + BH_2$	
2. Transferases	Transferência de grupos $A-X + B \rightleftharpoons A + B-X$	
3. Hidrolases	Hidrólise $A-B + H_2O \rightleftharpoons A-H + B-OH$	

		 Sacarose Glicose Frutose
4. Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou remoção de grupos, deixando dupla ligação 	 Fumarato Malato
5. Isomerases	Rearranjos intramoleculares	 Glicose 6-fosfato Frutose 6-fosfato
6. Ligases	Condensação de duas moléculas, associada ao consumo de ATP 	 Piruvato Oxaloacetato

Ⓟ = PO_3^{2-}.

Tabela 5.5 pH ótimo de enzimas.

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

Para a maioria das enzimas existe um valor de pH no qual a sua atividade é máxima — a velocidade da reação diminui à medida que o pH se afasta desse valor ótimo. Ele é característico para cada enzima (Tabela 5.5), 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 ionizáveis nos resíduos de aminoácidos.

Alguns destes grupos podem fazer parte do sítio ativo ou serem importantes na manutenção da estrutura espacial da molécula. 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* decorre do número e tipo de grupos ionizáveis que uma enzima apresenta e da sequência 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.

A velocidade da reação enzimática, a 0ºC, apresenta valores próximos de zero. A elevação da temperatura aumenta a velocidade somente enquanto a enzima conservar sua estrutura nativa. Acima de 50-55°C, a maioria das enzimas são desnaturadas, acarretando a perda do poder de catálise. Entre 0ºC e 50°C 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.

As considerações referentes a amplas variações de pH são pertinentes ao estudo da atividade enzimática *in vitro*. Os seres vivos têm suas reações ocorrendo em ambiente tamponado, 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 para o controle de sua ação. A temperatura tem influência decisiva sobre a distribuição geográfica dos seres vivos. Microrganismos, vegetais e animais ectotérmicos têm suas atividades vitais inteiramente dependentes da temperatura ambiente; aves e mamíferos, endotérmicos, são menos afetados.

5.4 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 (Seção 5.1). À medida que a

reação se processa, a concentração do reagente diminui e a velocidade da reação também, ou seja, a velocidade da reação varia ao longo do tempo. A velocidade da reação determinada após um intervalo de tempo é a *velocidade média* da reação durante esse tempo. Para determinar a velocidade de reação efetivamente proporcional à concentração inicial de reagente, é necessário medir a *velocidade inicial* (v_0). Esta medida é conseguida utilizando-se um tempo de reação muito pequeno, durante o qual a conversão de reagente em produto tenha sido tão reduzida que a concentração de reagente possa ser considerada constante — é o chamado *tempo inicial*. Como o tempo inicial difere para cada reação considerada, podendo variar de frações de segundos até várias horas, convenciona-se ser o tempo em que menos de 10% do reagente (substrato) tenham sido transformados em produto.

Grande parte das reações catalisadas enzimaticamente obedece ao padrão

$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

Para o tratamento da cinética enzimática, entretanto, será adotado um modelo mais simples, em que há apenas um substrato e um produto, representado por:

$$S \rightleftharpoons P$$

É o caso, por exemplo, de algumas reações de isomerização, em que um isômero é transformado em outro.

A velocidade de reação é medida em tempos iniciais, quando a concentração de P é desprezível (e, portanto a velocidade $v = k [P]$ é praticamente igual a zero), sendo possível fazer a aproximação:

$$S \rightarrow P$$

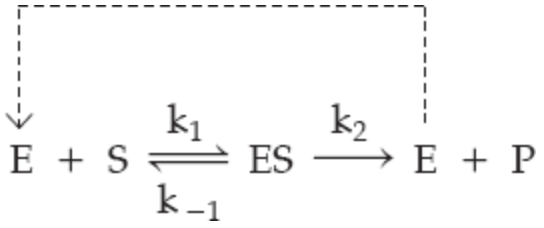
A reação catalisada enzimaticamente processa-se em duas etapas: na primeira, a enzima (E) liga-se reversivelmente ao substrato (S), formando um *complexo enzima-substrato* (ES):

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (1)$$

Na segunda fase, são liberados o produto (P) e a enzima:

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (2)$$

Uma vez na forma livre, a enzima pode, então, ligar-se a outra molécula de substrato (seta tracejada no esquema seguinte). A representação conjunta das etapas (1) e (2) é:



As equações de velocidade para as reações componentes do processo são:

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

$$v_{-1} = k_{-1}\,[ES]$$

$$v_2 = k_2\,[ES]$$

O tratamento matemático dos dados experimentais, obtidos com preparações não purificadas de enzimas, foi feito no início do século XX por Leonor Michaelis e Maud L. Menten. Estes pesquisadores procuravam explicar, sobretudo, porque a função que relaciona a velocidade da reação com a concentração do reagente (substrato, S) era uma hipérbole equilátera e não uma reta, como previsto pela equação v = k [reagente].

Michaelis e Menten partiram de dois pressupostos: (1) a concentração de substrato é muito maior do que a concentração de enzima e (2) $k_1 > k_{-1} > k_2$. São duas as decorrências desta diferença de grandeza entre as constantes de velocidade k_{-1} e k_2:

1. a primeira reação estabelece um equilíbrio, o que não seria possível se k_2 fosse maior do que k_{-1}
2. a velocidade da reação global, ou seja, a velocidade da formação do produto, v_2, é determinada pelo valor de k_2, já que esta é a etapa mais lenta e limitante do processo.

Estes pressupostos revelaram-se verdadeiros para um grande número de enzimas, chamadas *enzimas michaelianas*, e serão admitidos 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. Realmente, em virtude da diferença de massa molar entre eles (Tabela 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 e NH_4^+, catalisada pela glutamina sintetase:

$$\text{Glutamato} + NH_4^{=} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glutamina} + \text{ADP} + HPO_4^{2-} + H^+$$

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. Como k_2 é muito menor do que k_{-1}, a conversão $ES \rightarrow E + P$ é comparativamente muito lenta e estabelece-se um equilíbrio entre E, S e ES. Este equilíbrio é atingido em frações de segundo depois de serem postos em contato enzima e substrato, e tem concentrações definidas e constantes de cada espécie, havendo sempre uma porcentagem de enzima livre (E). Na Figura 5.5, esta fase ocorre até o tempo t_1. Como a enzima é

um composto químico, a reação E + S ⇌ ES em nada difere de uma reação genérica A + B ⇌ 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_{-1}:

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad\qquad K_{eq} = \frac{[ES]}{[E]\,[S]} = \frac{k_1}{k_{-1}}$$

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

$$ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad\qquad v_2 = k_2\,[ES]$$

Durante o tempo em que é medida a *velocidade inicial* (o *tempo inicial*), mantém-se a seguinte situação: contínua formação do produto e concentrações estáveis de ES, E e S. O fato de ES estar sendo consumido na formação do produto não provoca diminuição significativa da sua concentração, pois há sempre substrato excedente para combinar-se com a enzima que é liberada quando se forma o produto; a pequena e contínua diminuição da concentração de S não é significativa, face ao seu grande excesso. Na Figura 5.5, 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 Figura 5.5) a diminuição da concentração de substrato passa a ser significativa: a reação prosseguirá com velocidades cada vez menores (ao longo do intervalo de tempo Δt, na Figura 5.5), até que todo o substrato seja transformado em produto (tempo t_3, na Figura 5.5).

As considerações que serão feitas daqui para diante referem-se a velocidades iniciais (v_0), medidas em tempos iniciais.

A influência da concentração do substrato na velocidade da reação pode ser esclarecida pela análise de três situações de concentrações diferentes de substrato (situações I, II e III da Figura 5.6), com uma *mesma* concentração de enzima. É importante ressaltar que as velocidades consideradas são velocidades iniciais, v_0 (incluindo a $V_{máx}$), medidas após um *mesmo* tempo

inicial — a influência do tempo na velocidade da reação não está sendo analisada na Figura 5.6.

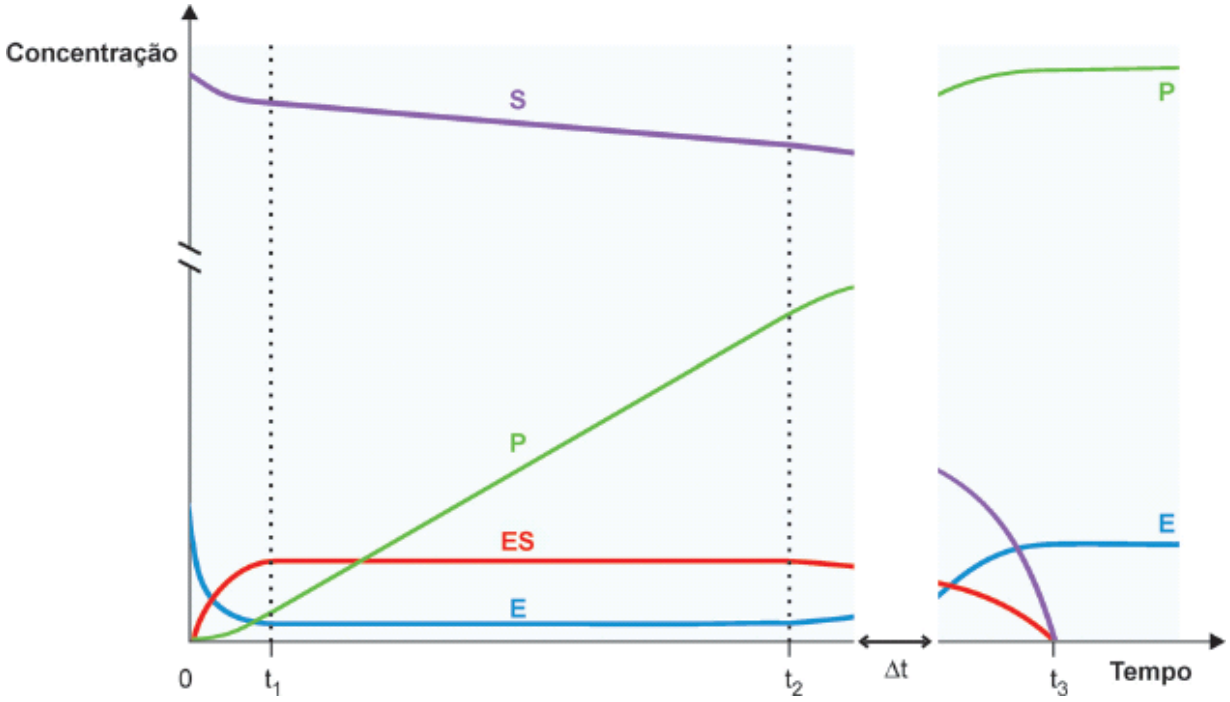


Figura 5.5 Variação das concentrações dos componentes da reação enzimática em função do tempo. O intervalo 0 - t_1 é muito pequeno. Após o tempo t_1 estabelece-se o equilíbrio entre E, S e ES, cujas concentrações permanecem aproximadamente constantes até o tempo t_2. A concentração do produto cresce 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 (v_0) deve ser medida. Durante o intervalo de tempo Δt, a concentração do substrato diminui efetivamente e a reação chega ao final (tempo t_3).

A situação I da Figura 5.6 supõe uma pequena concentração de substrato (pequena, porém muito maior do que a concentração de enzima) e que o equilíbrio da primeira etapa da reação 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. Na situação II,

há uma maior concentração de substrato e o equilíbrio é obtido com 50% das moléculas de enzimas na forma de complexo ES e os outros 50% como enzimas livres (E). Na situação III, o aumento da concentração de substrato foi tal que levou 75% das moléculas de enzimas a estar complexadas com o substrato.

Em resumo, nas situações I, II e III da Figura 5.6, as concentrações de E (enzima livre) e de complexo ES, expressas como porcentagem da concentração total de enzima ([E] + [ES]), são:

	$E + S \rightleftharpoons$	ES
I	75%	25%
II	50%	50%
III	25%	75%

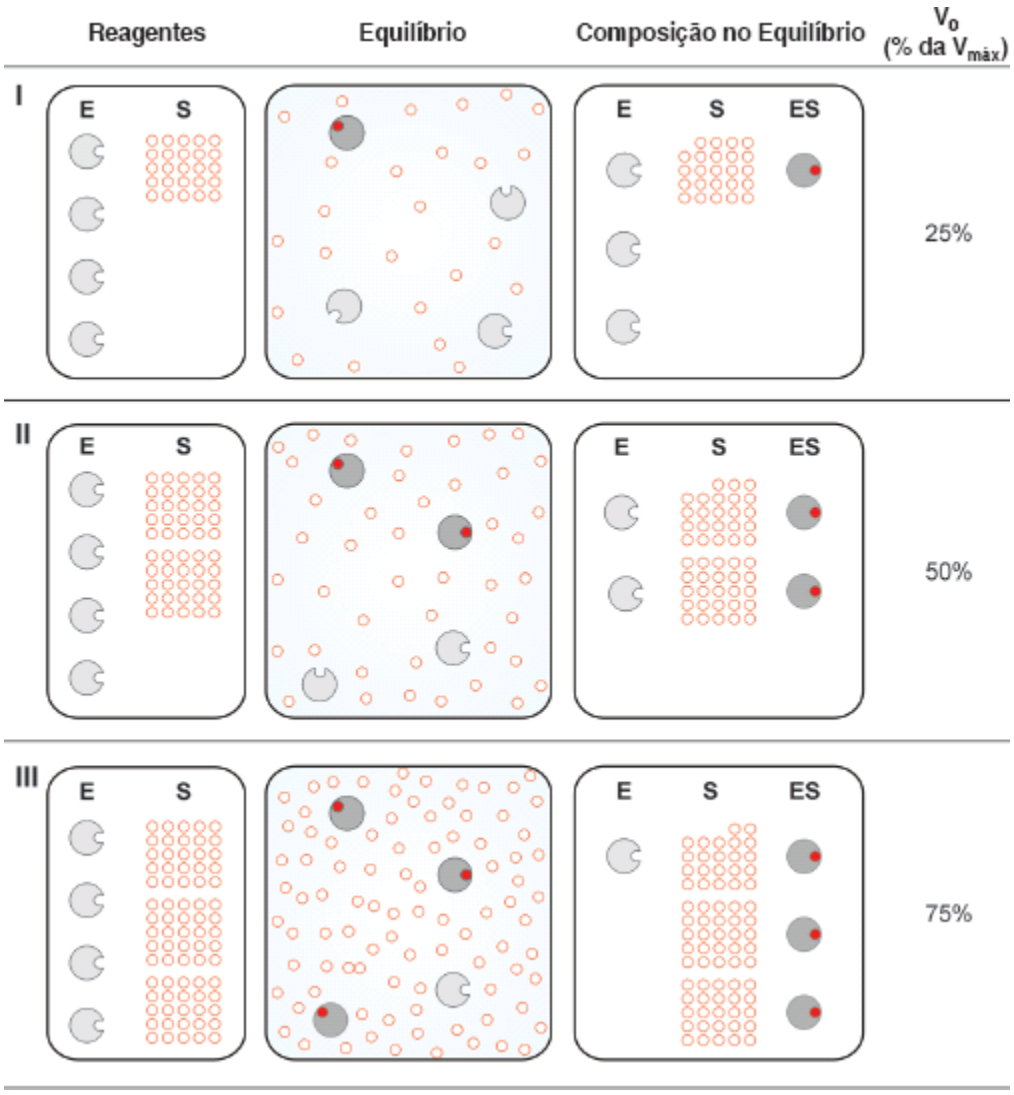


Figura 5.6 Esquema ilustrativo do equilíbrio E + S ⇌ ES, em três situações (I, II, III) de concentrações diferentes de substrato e mesma concentração de enzima, analisadas após um mesmo tempo inicial. As velocidades de reação (v_0) são indicadas em porcentagens da $V_{máx}$. Na prática, a proporção [S]/[E] é muito maior do que a representada no esquema.

Se a quantidade de substrato for muito maior do que a prevista na situação III, a concentração de E será praticamente nula, encontrando-se toda a enzima disponível sob a forma de ES. Trata-se da maior concentração possível de ES, praticamente igual à concentração de enzima utilizada:

$$\underset{\cong 0\%}{E} + \underset{}{S} \rightleftharpoons \underset{\cong 100\%}{ES}$$

A concentração de ES é refletida na velocidade de formação do produto, já que

$$v_2 = k_2 [ES]$$

e a reação ocorre na maior velocidade possível. Essa 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* ($V_{máx}$) da reação. Com as concentrações de substrato das situações I e II serão obtidas velocidades respectivamente iguais a 25 e 50% da $V_{máx}$. A velocidade da reação é sempre proporcional à concentração de ES, como exemplificado na Figura 5.6.

Os dados experimentais para construir um gráfico que relaciona velocidade inicial e concentração de substrato (Figura 5.7) podem ser conseguidos pelo procedimento seguinte. Prepara-se uma série de tubos contendo a *mesma* concentração de enzima e concentrações crescentes de substrato. Espera-se o tempo adequado para que se forme uma quantidade mensurável de produto; este tempo, entretanto, deve ser suficientemente pequeno para que menos de 10% do substrato tenham sido transformados em produto, para garantir que serão medidas velocidades iniciais. Dosa-se o produto e calcula-se a velocidade (quantidade de produto formado dividido pelo tempo). Na curva obtida (Figura 5.7), podem-se identificar duas regiões:

1. a região que contém os pontos A e B, em que a velocidade aumenta com o aumento da concentração de S, indicando que durante a reação havia moléculas de enzima livres — nesta parte, a concentração de S é o fator limitante da velocidade da reação;
2. a região do ponto C, em que a velocidade permanece essencialmente constante, apesar do aumento da concentração de S, e se aproxima de $V_{máx}$, indicando que a maioria das moléculas de enzima estiveram ligadas ao substrato durante o tempo em que a

velocidade da reação foi medida (sobre a dificuldade de determinar o valor de $V_{máx}$ *a partir do gráfico da Figura 5.7, ver Seção 5.5*).

Entre todas as concentrações de substrato, existe uma que provoca a formação de uma concentração de ES igual à metade da máxima possível — o equilíbrio da primeira etapa é estabelecido com 50% das enzimas sob a forma livre e 50% das enzimas na forma ES (situação II da Figura 5.6):

$$\underset{50\%}{E} + \underset{}{S} \rightleftharpoons \underset{50\%}{ES}$$

Nestas condições, a velocidade é igual à metade da $V_{máx}$. Esta específica concentração de substrato corresponde à *constante de Michaelis-Menten*, K_M(Seção 5.6), e apresenta interesse particular, pois seu valor indica a *afinidade* que uma enzima apresenta pelo substrato. Esta correlação pode ser exemplificada com a *hexoquinase*, que aceita como substratos açúcares de seis carbonos (hexoses), como a glicose e a frutose. Para saber por qual das duas hexoses a hexoquinase apresenta maior afinidade, são feitos dois experimentos, do tipo mostrado na Figura 5.8, um utilizando glicose como substrato e o outro, frutose. Em cada experiência, obtêm-se a velocidade máxima aproximada da reação e a metade dessa velocidade. No caso em que o substrato é a glicose, a metade da $V_{máx}$ é obtida com concentração do açúcar igual a 0,15 mM. Dito de outra forma, é necessária uma concentração 0,15 mM de glicose para que metade da enzima disponível encontre-se ligada à glicose, fazendo o complexo Enzima-Glicose. Para conseguir situação análoga com frutose, é necessária uma concentração de frutose 10 vezes maior, isto é, 1,5 mM. A hexoquinase tem, portanto, uma afinidade muito maior pela glicose do que pela frutose.

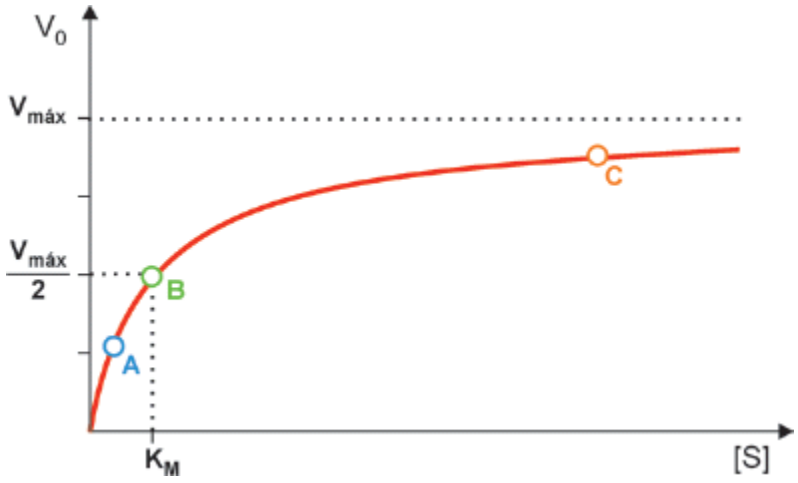


Figura 5.7 Variação da velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração do substrato (S).

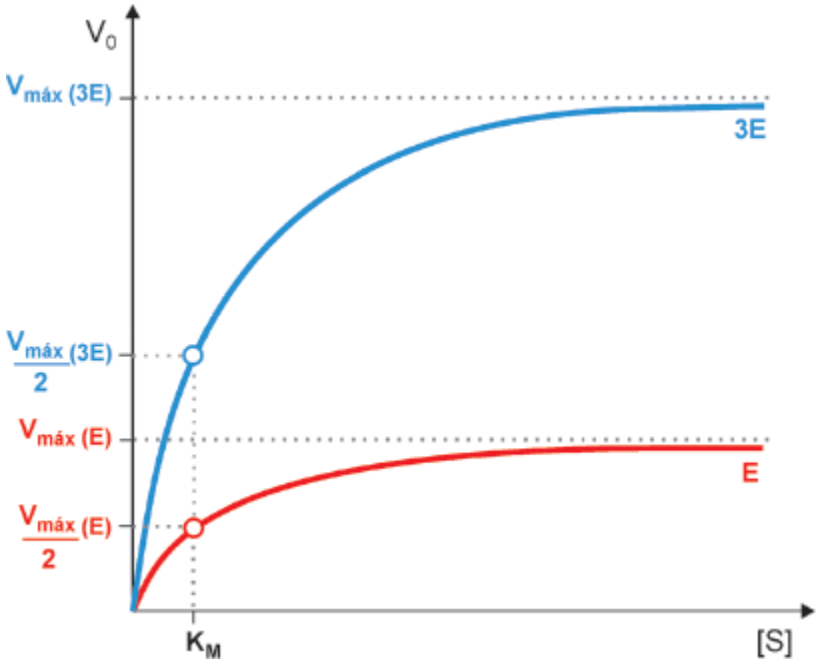


Figura 5.8 Variação da velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração do substrato (S) para duas concentrações de enzima (E, 3E).

A velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima

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:

$$E + S \rightleftharpoons ES \qquad\qquad K_{eq} = \frac{[ES]}{[E]\,[S]}$$

Para uma concentração de enzima igual a 2E, deve-se ter:

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

O substrato está sempre em tal excesso que a quantidade que se liga à enzima é desprezível, de modo que:

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

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

$$v_2 = k_2\,[ES]$$

a velocidade em um caso também será o dobro da outra (Figura 5.8).

Generalizando, a velocidade da reação é diretamente proporcional à concentração da enzima (Figura 5.9). Esta proporcionalidade facilita a determinação da concentração (atividade) de uma enzima.

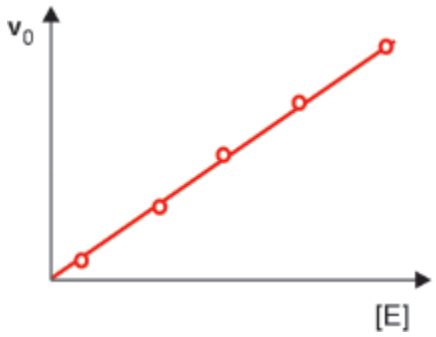


Figura 5.9 Velocidade da reação enzimática (v_0) em função da concentração da enzima (E).

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

As concentrações das soluções são habitualmente expressas em unidades de massa do soluto por unidades de volume da solução. As soluções de enzimas constituem um caso especial, por duas razões. A primeira é que muitas vezes há necessidade de aferir a quantidade de uma enzima na presença de outras proteínas — é o caso de dosagem de enzimas no plasma sanguíneo e em outros fluidos corpóreos ou extratos celulares. A segunda razão é que o importante não é a massa total da enzima, mas a quantidade de enzimas ativas. Ou seja, interessa aferir a atividade enzimática e não a concentração. Em uma solução de enzima desnaturada, sua massa é conservada, mas a propriedade catalítica está perdida.

Em virtude do exposto, a dosagem de uma enzima é feita pela medida de sua *atividade*, que é avaliada pela velocidade da reação que ela catalisa. Dada a especificidade das enzimas, esta medida é possível, mesmo na presença de outras proteínas. Uma amostra da solução contendo a enzima é incubada com concentração alta de substrato, para garantir a velocidade máxima e impedir que pequenas variações na concentração do substrato possam afetar as medidas. A velocidade da reação é determinada e a atividade enzimática é expressa em Unidades Internacionais. Uma *Unidade Internacional* (*U*) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol de produto por minuto em condições de medida especificadas para cada caso (pH, temperatura etc.). As dosagens de enzimas são geralmente expressas em U/mL ou U/L (Tabela 5.6).

A concentração de enzimas intracelulares no plasma é centenas de vezes menor do que no interior das células. Quando as células são lesadas, suas concentrações plasmáticas tornam-se anormalmente elevadas, revelando a instalação da moléstia. Ainda mais, a 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 muitas doenças (Tabelas 5.6 e 5.7) — os valores obtidos no indivíduo afetado são comparados 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 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*, que é o número de Unidades de enzima por miligrama de proteína presente na preparação. 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 medida deve aumentar (Tabela 5.8). 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.

Tabela 5.6 Resultados de exames laboratoriais de dosagens de enzimas plasmáticas em dois indivíduos (A e B).

	Atividade enzimática no soro (U/L)		
Enzimas	**Indivíduo A**	**Indivíduo B**	**Valores de referência**
Aldolase	2	2,1	Até 3
Amilase	120	125	60-160
Colinesterase	2.700	3.200	1.900-3.800
Creatina quinase	62	50	10-80
Lactato desidrogenase	398	220	120-240
Fosfatase ácida prostática	2,8	7,7	Até 3,7
Fosfatase alcalina	295	80	50-250
Aspartato transaminase	560	12	Até 18
Alanina transaminase	1.095	18	Até 21

γ-Glutamil transferase	61	11	6-28

Os resultados dos exames do indivíduo A são compatíveis com um quadro de hepatite viral aguda e os dos exames do indivíduo B, com carcinoma de próstata.

Tabela 5.7 Enzimas cujas concentrações plasmáticas são alteradas em determinadas doenças.

Enzimas	Moléstias
Transaminases, γ-glutamil transferase	Hepatite, enfarte do miocárdio
Creatina quinase, lactato desidrogenase	Enfarte do miocárdio
Amilase, lipase	Pancreatite
Fosfatase alcalina, γ-glutamil transferase	Hepatite, cirrose, câncer, processos obstrutivos de vias biliares
Fosfatase ácida	Neoplasia de próstata
Amilase	Parotidite (caxumba)

Tabela 5.8 Purificação hipotética de uma enzima.

Etapas da purificação	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	U[(1)]/mL	U totais	U/mg[(2)]	Índice de purificação[(3)]
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

(1) U: unidade internacional de atividade enzimática. (2) Atividade específica: número de unidades de enzima por miligrama de proteína. Pelos dados apresentados na tabela, 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 subsequentes. [3]Índice de purificação: razão entre a atividade específica da etapa considerada e a atividade específica do extrato celular.

5.5 A equação de Michaelis-Menten

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

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} E + P$$

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

$$v_{-2} = k_{-2} [E] [P]$$

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_{-2} também tende a zero.

A velocidade de formação de ES é apenas:

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

[E] é 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:

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

A velocidade de desaparecimento de ES será a soma de duas velocidades: aquela que dissocia ES em E + S (v_{-1}) e aquela que transforma

ES em E + P (v_2):

$$v_{-1} = k_{-1}[ES]$$

$$v_2 = k_2[ES]$$

Assim, a velocidade de desaparecimento de ES será:

$$v_{-1} + v_2 = k_{-1}[ES] + k_2[ES]$$

$$v_{-1} + v_2 = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

Durante os tempos iniciais de 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 ($v_{-1} + v_2$) de ES são, então, iguais.

$$v_1 = v_{-1} + v_2$$

$$k_1([E_t] - [ES]) \cdot [S] = (k_{-1} + k_2)[ES]$$

$$([E_t] - [ES]) \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] - [ES] \cdot [S] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot [ES]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES] \cdot \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [ES] \cdot [S]$$

$$[E_t] \cdot [S] = [ES]\left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]\right)$$

$$[ES] = \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} \qquad \text{Equação (A)}$$

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

$$v_0 = k_2 [ES]$$

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

$$v_0 = k_2 \frac{[E_t][S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

Como a velocidade máxima ($V_{máx}$) é obtida quando toda a enzima (E_t) se encontra sob a forma de ES, o produto $k_2 [E_t]$ é a velocidade máxima e

$$v_0 = \frac{V_{máx}[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

A relação $(k_{-1} + k_2)/k_1$ foi definida por Michaelis e Menten como uma nova constante, K_M. Chega-se assim à expressão final da equação de Michaelis-Menten:

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

Quando a concentração de substrato é tal que a velocidade de reação é metade da velocidade máxima (ponto B da Figura 5.7), resulta:

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

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

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

$$K_M = [S]$$

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 determinação experimental desta constante (Figura 5.7). O valor do K_M indica o grau de afinidade da enzima pelo substrato, como exemplificado pela hexoquinase (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 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

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:

$$v_0 = \frac{V_{máx}}{K_M}\,[S]$$

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

$$v_0 = K\,[S]$$

uma equação de reta do tipo $y = ax$. Esta equação mostra que, com concentrações pequenas de substrato, a velocidade de reação é diretamente proporcional à concentração do substrato (região do ponto A no gráfico da Figura 5.7).

Por outro lado, quando a concentração de S é muito maior do que K_M (região do ponto C da Figura 5.7), K_M + [S] é praticamente igual a [S] e a equação de Michaelis-Menten fica igual a

$$v_0 = V_{máx}$$

indicando que, quando a concentração de substrato é muito alta (saturante), a velocidade é constante e máxima, independendo da concentração de substrato. Na prática, é muito difícil atingir a $V_{máx}$; ainda assim, há recursos matemáticos que permitem determinar seu valor.

Um gráfico com os valores inversos de v_0 e [S] possibilita a determinação de $V_{máx}$ e K_M

A equação de Michaelis-Menten é a equação de uma hipérbole retangular; portanto, os valores exatos de $V_{máx}$ nunca são atingidos, pois a curva tem assíntota no valor $V_{máx}$ do eixo v_0. Mesmo aproximações de $V_{máx}$ seriam obtidas com concentrações tão altas de substrato, que são difíceis de conseguir experimentalmente. Como consequência, a determinação de K_M **também é impossibilitada.**

O problema da determinação de $V_{máx}$ e K_M pode ser resolvido a partir 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 uma reta cujo intersepto nas ordenadas é $\frac{1}{V_{máx}}$ e, nas abscissas, $-\frac{1}{K_M}$ (Figura 5.10).

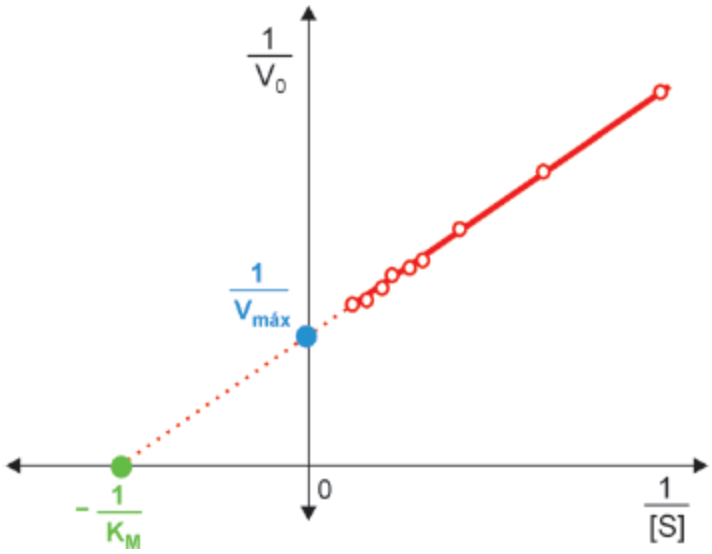


Figura 5.10 Transformação de Lineweaver-Burk para os resultados de um experimento onde foram preparados tubos contendo diversas concentrações de substrato e a mesma concentração de enzima; após a incubação, mediu-se v_0. Os inversos dos valores das concentrações de substrato utilizadas e os inversos dos valores de v_0 compõem uma reta (linha contínua), que, extrapolada (linha pontilhada), permite a determinação dos valores de K_M e de $V_{máx}$.

Este gráfico permite aferir $V_{máx}$ sem que seja atingido, na prática, o ponto que equivaleria a esta velocidade, já que a reta pode ser traçada a partir de pontos experimentais conseguidos com concentrações não saturantes de substrato. Prolongando-se a reta, encontra-se o valor do inverso de $V_{máx}$ no intercepto com o eixo das ordenadas e o valor negativo do inverso de K_M, na intersecção com o eixo das abscissas.

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. Como $V_{máx}$ é igual ao produto k_2 [Et], k_{cat} é igual a k_2:

$$k_2 = \frac{V_{máx}}{[E_t]}$$

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 (Tabela 5.10). 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 (K_M grande), ou porque a eficiência de gerar produto a partir de ES é pequena (k_{cat} pequeno), ou pelas duas razões somadas. Por outro lado, os maiores valores desta relação serão obtidos satisfazendo simultaneamente duas condições: alta afinidade da enzima pelo substrato ($K_M$pequeno) e alta eficiência na transformação de ES em produto (k_{cat} grande). Na Tabela 5.10 aparecem os valores da razão k_{cat}/K_M para várias enzimas. Esta razão 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 M^{-1}• s^{-1}). Isto significa que estas enzimas catalisam a reação com uma eficiência próxima da perfeição: 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 eliminação de radicais livres de oxigênio (catalase e superóxido dismutase); comparativamente, a pepsina, uma enzima digestiva, é muito poucoeficiente.

Tabela 5.10 Algumas enzimas de alta eficiência.

Enzima	k_{cat} (s^{-1})	K_M (M)	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)
Superóxido dismutase	1×10^6	$3{,}5 \times 10^{-4}$	$2{,}8 \times 10^9$
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}	$3{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}7 \times 10^3$

5.6 Inibidores enzimáticos

A atividade enzimática pode ser diminuída pela ação de substâncias, genericamente chamadas de *inibidores*. Algumas destas substâncias são constituintes normais das células, outras são estranhas aos organismos. Os inibidores enzimáticos encontrados nas células que cumprem um papel regulador importante são designados *alostéricos*. Como estes inibidores são produzidos pelas próprias células, a variação de sua concentração é um recurso por elas largamente empregado no controle da velocidade das reações (Seção 19.2.1).

Adicionalmente, 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 sequência de reações que compõem uma via metabólica.

A possibilidade de inibir reações enzimáticas é também um campo aberto para aplicações farmacológicas. Muitos medicamentos de uso corrente na prática terapêutica baseiam suas propriedades na inibição

específica de certas enzimas. Alguns exemplos serão analisados nesta seção.

Conquanto exista grande variação quanto aos mecanismos de inibição, pode-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 com as enzimas, levando a uma inativação praticamente definitiva. Alguns exemplos são os *compostos organofosforados*, que constituem o princípio ativo de muitos inseticidas; eles formam ligações covalentes com o grupo OH de resíduos de serina. Outros exemplos são a *iodoacetamida* e o *iodoacetato*, que reagem 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. É nesta toxicidade que reside o perigo potencial dos detritos industriais, cujo conteúdo em inibidores enzimáticos inespecíficos é capaz de afetar praticamente qualquer ser vivo. Ligando-se a serina ou cisteína, aminoácidos frequentes nas proteínas, esses inibidores podem inativar qualquer enzima.

Outros inibidores irreversíveis têm propriedades terapêuticas. A *aspirina* (*ácido acetilsalicílico*) é empregada como agente anti-inflamatório, antipirético e analgésico. Ela transfere seu grupo acetila para o grupo OH de um resíduo de serina da molécula de *cicloxigenase*, inativando-a (Figura 5.11); esta enzima participa da via de síntese de *prostaglandinas* (Seção 16.6). A *penicilina* liga-se covalentemente ao sítio ativo de uma enzima da via de síntese da parede bacteriana, inibindo-a; desprovidas de parede, as células ficam sujeitas à lise; este antibiótico é o agente terapêutico ideal, que atua sobre uma enzima que o parasita apresenta e o indivíduo parasitado não.

Os *inibidores reversíveis* são classicamente divididos em dois grupos: os competitivos e os não competitivos.

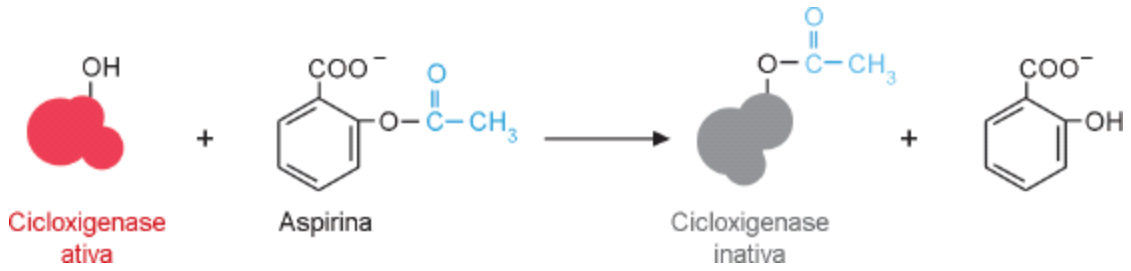


Figura 5.11 Reação de inativação da cicloxigenase por reação irreversível com aspirina (ácido acetilsalicílico).

5.6.1 Inibidores competitivos

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

Os *inibidores competitivos* (I_C), por apresentarem configuração espacial semelhante à do substrato, são capazes de ligarem-se ao centro ativo da enzima, produzindo um complexo enzima-inibidor (EI_C).

A constante de equilíbrio da reação

$$E + I_C \rightleftharpoons EI_C$$

é chamada constante do inibidor (K_{I_c}), e 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_C *jamais* gera produto e a atividade enzimática ficará diminuída proporcionalmente à fração de enzima que estiver ligada ao inibidor. Uma vez que 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_C 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 e das afinidades entre a enzima e o

substrato e entre a enzima e o inibidor. Em concentrações baixas de substrato, encontrar-se-á uma fração das enzimas associada ao substrato (gerando produto) e uma fraçãoligada ao inibidor e 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 100%, e tudo se passa como se não houvesse inibidor presente no meio de reação. A velocidade máxima da reação será idêntica à velocidade máxima da reação na ausência do inibidor, mas só será obtida com concentrações de substrato maiores do que as da reação não inibida (Figura 5.12). Se a concentração do inibidor competitivo for exageradamente alta em relação à concentração do substrato, a probabilidade da enzima livre ligar-se ao substrato será, praticamente, nula e a velocidade da reação será zero.

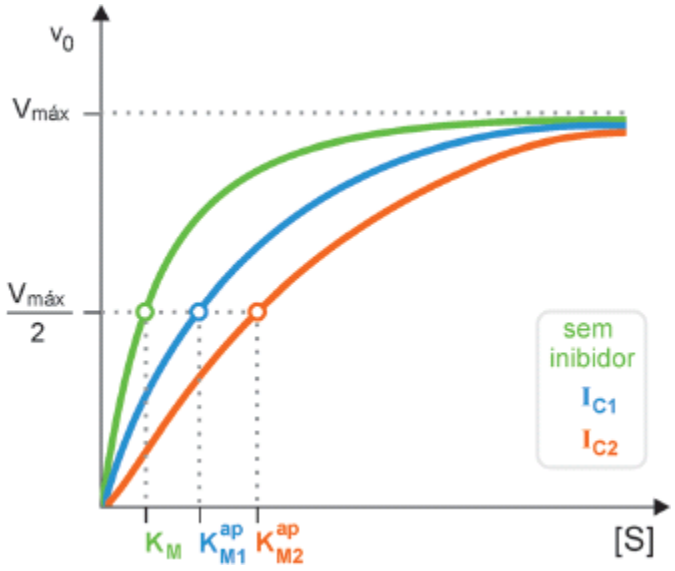


Figura 5.12 Efeito de duas concentrações de inibidor competitivo ($I_{C1} < I_{C2}$) sobre a velocidade da reação enzimática.K^{ap}_{M1} e K^{ap}_{M2} são valores do K_M aparente para as concentrações I_{C1}e I_{C2} de inibidor, respectivamente.

Visto que mesmo na presença de inibidor competitivo 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 sem inibidor.

É claro, entretanto, que este valor não pode ser usado como uma medida de K_M, cuja determinação deve ser feita na ausência de inibidores. A nova constante, medida em presença de inibidores, é chamada K_M *aparente* (K_M^{ap}).

O valor de K_M^{ap} depende de duas variáveis: a afinidade da enzima pelo inibidor, expressa pela constante do inibidor (K_{Ic}), e a própria concentração de inibidor, $[I_c]$. A equação da velocidade da reação torna-se igual a

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

onde $K_M(1 + \frac{[I_c]}{K_{I_c}}) = K_M^{ap}$. Substituindo-se este valor na equação anterior, obtém-se

$$v_0 = \frac{V_{máx}\,[S]}{K_M^{ap} + [S]}$$

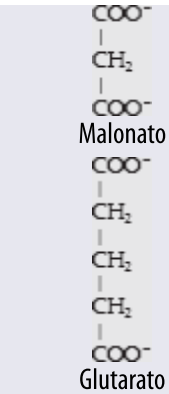
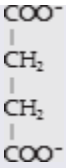
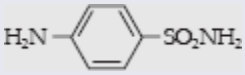
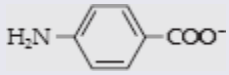
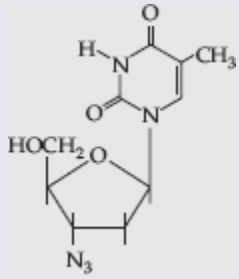
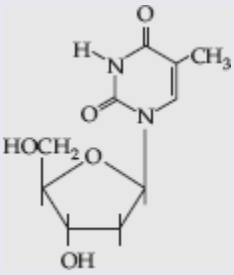
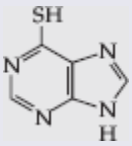
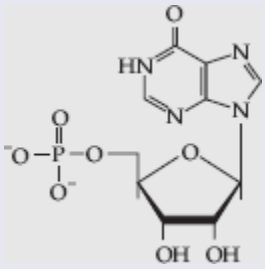
que é uma variante da equação de Michaelis-Menten, na qual o K_M está trocado pelo K_M^{ap}. Fica evidente que as variáveis mencionadas afetam o valor de K_M e não de $V_{máx}$, e que quanto maior a concentração do inibidor competitivo, maior o K_M^{ap}(Figura 5.12).

A transformação de Lineweaver-Burk aplicada à última equação está apresentada na Figura 5.14. A comparação do valor de K_M^{ap} com o valor do K_M tem muita utilidade na determinação do tipo de inibidor — competitivo ou não competitivo.

Um exemplo clássico de inibição competitiva é a ação de *malonato* sobre a reação catalisada pela *succinato desidrogenase* (Tabela 5.11). O malonato e outros compostos com estrutura semelhante ao succinato inibem competitivamente a enzima.

Tabela 5.11 Inibidores competitivos de algumas enzimas, seus substratos naturais e as moléstias em cujo tratamento são empregados.

Inibidor	Substrato	Enzima

 Malonato Glutarato	 Succinato	Succinato desidrogenase
 Sulfanilamida	 *p*-Aminobenzoato (PABA)	Di-hidropteroato sintase
 AZT (3′-azido-2′-desoxitimidina)	 Desoxitimidina	Transcriptase reversa
 6-Mercaptopurina	 Inosina monofosfato (IMP)	Adenilossuccinato sintetase

Os inibidores competitivos têm largo emprego terapêutico, porque inibem reações que ocorrem específica ou preferencialmente no microrganismo parasita (bactérias ou vírus) e não existem no organismo hospedeiro. Este é o caso da *sulfanilamida* (Tabela 5.11), um quimioterápico do grupo das *sulfonamidas*, utilizadas no combate a infecções bacterianas. Muitas bactérias patogênicas sintetizam *ácido fólico* (Seção 17.2.2) e o substrato de uma das etapas da via de síntese é o *p-aminobenzoato* (*PABA*). A sulfanilamida atua como inibidor competitivo da enzima que catalisa essa etapa, bloqueando a síntese de ácido fólico. A

deficiência desse composto torna a bactéria incapaz de reproduzir-se. Essa via não ocorre no organismo humano, para o qual o ácido fólico é uma vitamina, a vitamina B_9 (Tabela 5.13).

Outro exemplo é o *AZT* (*3′-azido-2′-desoxitimidina*), um análogo estrutural da desoxitimidina que inibe a DNA polimerase-RNA dependente (*transcriptase reversa*), necessária para a replicação do vírus *HIV* (de ***H**uman **I**mmunodeficiency **V**irus*), causador da *AIDS* (de ***A**cquired **I**mmune **D**eficiency **S**yndrome*). O tratamento atual da AIDS emprega uma combinação de agentes antivirais (*coquetel*) que inclui inibidores da transcriptase reversa e da protease do HIV, outra proteína-chave para a construção das partículas virais.

Os inibidores competitivos são ainda utilizados na quimioterapia de diversos tipos de câncer. Neste caso, a célula neoplásica comporta-se como o agressor do organismo; seu metabolismo é diferente do da célula normal sob vários aspectos, incluindo uma velocidade de multiplicação muito maior, o que implica síntese de ácidos nucleicos intensa. Por isto, análogos estruturais de intermediários das vias de síntese de nucleotídios são os fármacos de escolha; um exemplo é a *6-mercaptopurina*, que impede a síntese de nucleotídios purínicos. Os quimioterápicos atuarão mais intensamente sobre as células cancerosas, mas também serão atingidos tecidos normais que se dividem rapidamente, como a medula óssea (que produz as células sanguíneas), a mucosa intestinal, os folículos capilares, as células germinativas masculinas etc.

5.6.2 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 grupamentos 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 frequentes 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).

A reação do inibidor não competitivo com a enzima pode ser representada por:

$$E + I_{NC} \rightleftharpoons EI_{NC}$$

Vê-se, pelo equilíbrio, que há sempre uma fração de enzimas ligadas ao inibidor e inativas. 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, enquanto, 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. Sendo assim, o fato da ligação do inibidor não competitivo à molécula de enzima ser reversível não diminui seu poder de ação. Como o sítio de ligação do inibidor não competitivo é diferente do sítio ativo, em alguns casos é possível a ligação concomitante de inibidor e substrato à enzima, formando um complexo ternário ESI_{NC}, incapaz de gerar produto.

Na presença de um inibidor não competitivo, tudo se passa como se efetivamente houvesse uma concentração menor de enzimas. 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 velocidade máxima da reação também será reduzida. Ainda mais, já 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.

As características descritas permitem prever, para o inibidor não competitivo (Figura 5.13), uma cinética diferente da do inibidor competitivo. 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 que conservam a mesma afinidade pelo seu substrato.

No caso da inibição não competitiva, a constante de dissociação do complexo EI_{NC} 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. A equação de Michaelis-Menten passa a ser:

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

A Figura 5.14 apresenta a transformação de Lineweaver-Burk aplicada a esta equação, em comparação com as transformações para a cinética da reação na presença de inibidor competitivo e na ausência de inibidores.

São exemplos de inibidores não competitivos os íons de metais pesados como Hg^{-+}, Pb^{-+} e Ag^{+}, que reagem com grupos SH das proteínas. Os inibidores não competitivos têm amplo espectro de ação o que torna sua ingestão, direta ou indireta (por alimentos contaminados), extremamente tóxica. Muitos casos de intoxicação por Hg^{-+} ocorrem em mineração de ouro, onde o mercúrio é usado na extração do metal. O despejo de resíduos deste processo em rios é uma fonte considerável de poluição ambiental.

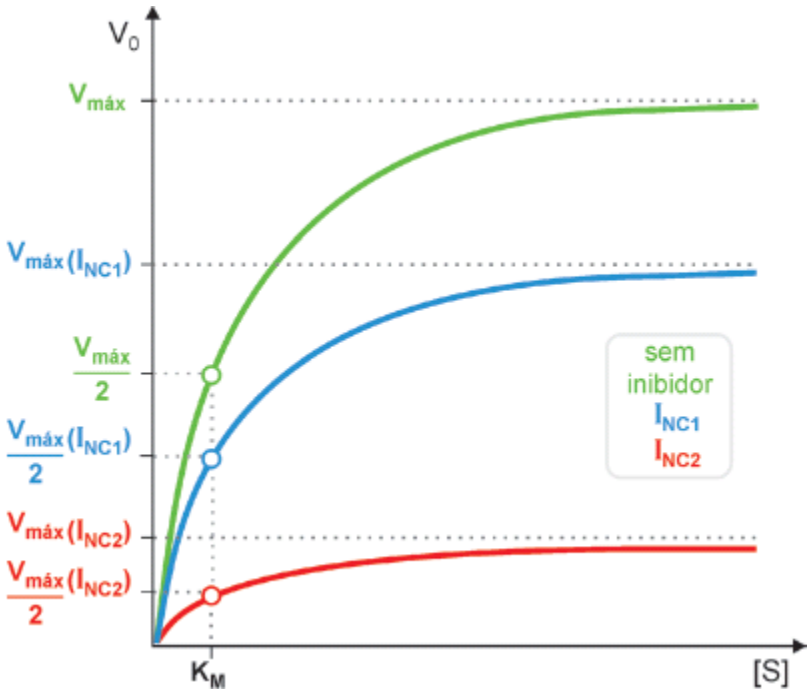


Figura 5.13 Efeito de duas concentrações de inibidor não competitivo ($I_{NC1} < I_{NC2}$) sobre a velocidade da reação enzimática. O valor do K_M permanece inalterado, mas as velocidades máximas decrescem com o aumento da concentração do inibidor.

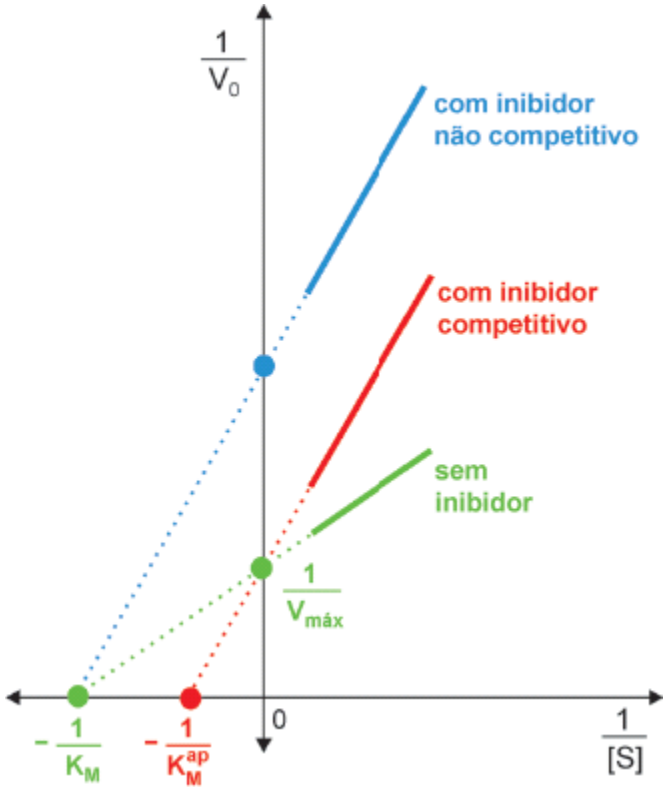


Figura 5.14 Transformação de Lineweaver-Burk para a reação enzimática sem inibidor e em presença de inibidores competitivo e não competitivo.

5.6.3 Antimetabólitos

Análogos de substratos são "venenos" naturais ou medicamentos

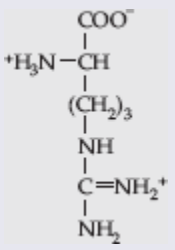
Uma classe importante e extremamente variada de compostos tem sua ação relacionada com a atividade enzimática. São os *antimetabólitos* ou *análogos de substratos*, que, como o nome indica, têm fórmula estrutural semelhante à de substratos naturais, ligam-se ao centro ativo e, ao contrário dos inibidores competitivos, geram produtos. Estes produtos são diferentes do produto gerado pelo substrato e, por não serem aceitos como substrato

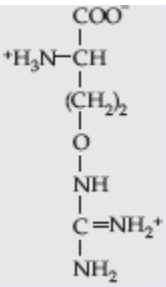
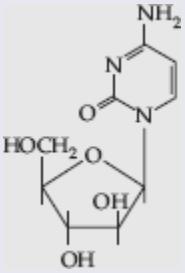
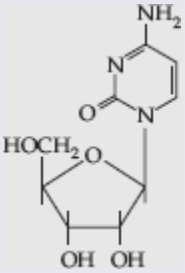
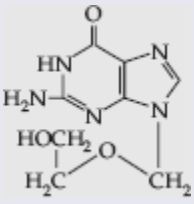
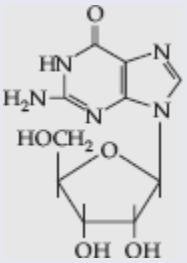
pela enzima seguinte, ou por serem instáveis ou por qualquer outro motivo, a via metabólica sobre a qual interferem fica interrompida.

Muitos antimetabólitos constituem um mecanismo de defesa de plantas contra a ingestão de suas folhas e sementes por insetos, pássaros e mamíferos. Entre esses compostos tóxicos, estão os análogos de aminoácidos, sendo conhecidos mais de 300. Estes análogos, nos organismos herbívoros, são incorporados no lugar dos aminoácidos "certos" e as proteínas resultantes são inativas. Um exemplo é a *canavanina*, um análogo de arginina (Tabela 5.12). Outras plantas venenosas sintetizam *fluoroacetato*, um composto extremamente tóxico, que acarreta o bloqueio do ciclo de Krebs (Seção 10.1). O fluoroacetato, análogo de acetato, 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. Em 2004, foram constatados muitos casos letais de envenenamento de animais no Zoológico de São Paulo por fluoroacetato, componente de venenos contra ratos, atualmente de comercialização proibida.

Diversos quimioterápicos são constituídos por análogos de nucleosídios, que interrompem a replicação do DNA. É o caso de *citosina arabinosídio*, inserida no DNA em lugar de citosina, particularmente utilizada no tratamento de leucemias e linfomas; *acicloguanosina* (*aciclovir*), empregada no combate ao vírus herpes, é introduzida pela DNA polimerase do vírus no seu DNA, no lugar de guanosina, mas não é reconhecida pela DNA polimerase da célula hospedeira, residindo nesta diferença a sua eficácia.

Tabela 5.12 Antimetabólitos e os substratos que substituem.

Antimetabólitos	Substratos
	

 Canavanina	Arginina
 Citosina arabinosídio	 Citidina
 Acicloguanosina	 Guanosina

5.7 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 resultantes 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
2. Controle da atividade da enzima, efetuado por mudanças estruturais da molécula enzimática e que redundam em alterações da velocidade de catálise.

A interferência hormonal sobre o nível de enzimas-chave do metabolismo e o controle da atividade enzimática por regulação alostérica e modificação covalente são analisados nos Capítulos 19 e 20.

Outros dois processos de regulação enzimática, de ocorrência mais restrita, estão descritos a seguir.

Zimogênios são formas inativas de enzimas

Certas enzimas, cujo local de ação é extracelular (plasma, trato digestório), são sintetizadas na forma de precursores inativos, chamados *zimogênios*. Para que um zimogênio adquira propriedades de enzima, é necessária a hidrólise de determinadas ligações peptídicas, com a consequente 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.

Isoenzimas e isoformas são versões diferentes de uma mesma enzima

Existem enzimas que catalisam a mesma reação, mas que apresentam estruturas diversas, dependendo do tecido ou organela em que ocorrem em um organismo — são as isoenzimas e as isoformas. *Isoenzimas* resultam de vários *loci* gênicos ou de genes alelos de um mesmo *locus*: cada uma tem seu *locus* gênico próprio. *Isoformas* resultam de modificações pós-

transcricionais (clivagem proteolítica, modificação covalente de aminoácidos etc.) de uma estrutura proteica comum.

Frequentemente, as isoenzimas resultam de combinações diferentes de subunidades comuns. A *lactato desidrogenase* (*LDH*, de ***l****actate* ***deh****ydrogenase*), por exemplo, é constituída por quatro subunidades de dois tipos: subunidade H (de ***H****eart*, coração em inglês) e M (de **M**úsculo), que podem associar-se de maneiras variadas. As formas HHHH e HHHM são abundantes no coração, enquanto a forma MMMM predomina em músculos esqueléticos e fígado. Outros tecidos apresentam diferentes composições de subunidades.

Diversas enzimas têm isoenzimas que se apresentam em diferentes isoformas, como a hexoquinase, a creatina quinase e a fosfatase alcalina. Os transportadores de glicose (GLUT — Seção 19.6.3) e as cadeias pesadas da miosina (Seção 22.5) também ocorrem em várias isoformas.

Frente a uma determinada situação fisiológica, as isoenzimas ou isoformas de órgãos distintos podem tornar-se ativas ou inativas, permitindo a resposta adequada do particular órgão onde se localizam (Seção 20.2). Adicionalmente, o padrão característico de isoenzimas nos tecidos tem grande utilidade na prática médica: a detecção de um tipo de isoenzima no plasma e, consequentemente, a identificação do seu tecido de origem, é um procedimento largamente empregado no diagnóstico e acompanhamento de diversas doenças.

5.8 Cofatores enzimáticos

Cofatores são imprescindíveis para a atividade de inúmeras enzimas

A maioria das enzimas necessita 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*.

Íons metálicos como Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}e Co^{2+} costumam fazer parte da estrutura da enzima ou por ligarem-se a cadeias laterais de aminoácidos, frequentemente pertencentes ao sítio ativo da enzima, ou por estarem presentes em grupos prostéticos como, por exemplo, o heme (Seção 3.2).

Outros íons metálicos como Na^+, K^+, Mg^{-+}, Mn^{-+}e Ca^{-+} associam-se fraca e reversivelmente à enzima, ao substrato ou à coenzima. É o caso de reações catalisadas por quinases, que utilizam como coenzima o complexo ATP-Mg^{-+}: na ausência de Mg^{-+}, o ATP não se liga à enzima.

As coenzimas atuam como aceptores de átomos ou grupos funcionais do substrato em uma dada reação e como doadores destes mesmos grupos ao participarem de outra reação e, por isto, diz-se que as coenzimas são *transportadoras* de determinados grupos (Tabela 5.13). Durante a catálise, coenzima e substrato acham-se alojados no centro ativo da enzima, consistindo a reação na remoção de um grupo químico do substrato e sua transferência para a coenzima, ou vice-versa. Fica evidente que as coenzimas não apenas sofrem modificações em sua estrutura ao participar de uma reação enzimática, mas *são necessárias em quantidades estequiométricas em relação ao substrato*. Todavia, o fato de as coenzimas serem 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 distinção entre substrato e coenzima. Um critério diferencial é o fato de, em reações metabólicas subsequentes, o substrato sofrer novas alterações, enquanto a coenzima volta à sua forma original. A coenzima pode encontrar-se covalentemente ligada à molécula enzimática, constituindo um *grupo prostético*, como a flavina adenina dinucleotídio (FAD), uma coenzima transportadora de hidrogênio. Ou a coenzima pode ser uma molécula “livre”, reunindo-se à enzima apenas no momento da catálise, como acontece com a nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+).

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 seu precursor, deve então ser obtido da dieta, constituindo uma *vitamina*. As vitaminas são compostos orgânicos sintetizados por plantas ou microrganismos, indispensáveis ao crescimento e às funções normais dos animais superiores. Ao contrário de carboidratos, proteínas e lipídios, são requeridos na dieta em pequenas quantidades (microgramas ou miligramas diários), já que são precursores de coenzimas,

cujas concentrações celulares são muito pequenas, por serem constantemente recicladas.

As necessidades vitamínicas diferem segundo as espécies. A *vitamina C* (*ácido ascórbico*), por exemplo, é necessária aos primatas; a maioria dos mamíferos é dotada de vias de síntese de ácido ascórbico, que, assim, não é uma vitamina para estes animais. Os seres humanos precisam de várias outras vitaminas. No extremo oposto, *Escherichia coli*, uma bactéria comum no trato intestinal humano, é capaz de multiplicar-se em uma solução contendo apenas uma fonte de carbono (glicose), uma fonte de nitrogênio (NH_4^+) e sais minerais. A partir destas substâncias, é 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 (Tabela 5.13) — tiamina (vitamina B_1), riboflavina (B_2), nicotinamida (B_3), ácido pantotênico (B_5), 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 menos conhecida.

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

Tabela 5.13 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 dinucleotídio (FAD)	Hidrogênio	Riboflavina (B_2)
Nicotinamida adenina dinucleotídio ($NAD^{\geqslant}$)	Hidreto	Nicotinamida (B_3)

Coenzima A	Acila	Ácido pantotênico (B_5)
Piridoxal-fosfato	Amino	Piridoxina (B_6)
Biotina	CO_2	Biotina (B_7)
Tetraidrofolato	Carbono	Ácido fólico (B_9)
Metilcobalamina	Metil	Cobalamina (B_{12})

Bibliografia

Bruice TC, Benkovic SJ: Chemical basis for enzyme catalysis. *Biochemistry* **39**: 6267-6274, 2000.

Brunton LL et al. (editors): Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th ed. McGraw-Hill, 2011.

Burtis CA, Ashwood ER (editors): *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 5th ed. W.B. Saunders Company, 2001.

Chandrasekar J, Silverman SK: Catalytic DNA with phosphatase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (14): 5315-5320, 2013.

Cornish-Bowden A: *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 3rd ed. Portland Press, 2004.

Cornish-Bowden A, Cardenas ML: Metabolic analysis in drug design. *C R Biol* **326** (5): 509-515, 2003.

Deichmann U, Schuster S, Mazat JP, Chornish-Bowden A: Commemorating the 1913 Michaelis-Menten paper Die Kinetik der Invertinwirkung: three perspectives. *FEBSJ* **281** (2):435-463, 2014.

DeRose VJ: Two decades of RNA catalysis. *Chem Biol* **9** (9): 961-969, 2002.

Eisenthal R, Danson M (editors): *Enzyme Assays: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford University Press, 2002.

Eisenthal R *et al*.: Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends Biotechnol* **25** (6): 247-249, 2007.

Frauenfelder H: What determines the speed limit on enzyme catalysis? *Nat Chem Biol* **4** (1): 21-22, 2008.

Harman JG *et al*. (editors): *Goodman & Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill, 2000.

Marangoni AG: *Enzyme Kinetics. A Modern Approach*. Wiley-Interscience, 2002.

Michaelis L, Menten ML: Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* (*Biochemische Zeitschrift*) **49**: 333-369, 1913.

Michaelis L, Menten ML, Johnson KA, Goody RS: The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **50** (39):8264-8269, 2011.

OceanofPDF.com

Parte 2

Estrutura de Carboidratos e Lipídios; Membranas

6 Estrutura de Carboidratos e Lipídios
7 Membranas

OceanofPDF.com

6 Estrutura de Carboidratos e Lipídios

6.1 Estrutura de carboidratos

Os *carboidratos* (ou *hidratos de carbono*) são poli-hidroxialdeídos ou poli-hidroxicetonas, ou substâncias que, hidrolisadas, originam estes compostos. Apresentam, em geral, a fórmula empírica $(CH_2O)_n$, da qual deriva a sua nomenclatura, que, todavia, é inadequada: muitos carboidratos não apresentam esta fórmula geral (como a glicosamina, que contém um grupo amino) e existem compostos com esta fórmula que não são carboidratos (ácido lático, por exemplo). Carboidratos com sabor doce, como sacarose, glicose e frutose, comuns na alimentação humana, são chamados *açúcares*. Os carboidratos são classificados segundo o número de unidades componentes em monossacarídios, oligossacarídios e polissacarídios.

Monossacarídios (Figura 6.1) constituem o tipo mais simples de carboidrato, chamados *aldoses* ou *cetoses*, segundo o grupo funcional, aldeído ou cetona, que apresentam. De acordo com seu número de átomos de carbono, são designados trioses, tetroses, pentoses, hexoses ou heptoses. É costume adotar nomes que combinem a função e o número de carbonos do monossacarídio. Assim, há duas trioses: o gliceraldeído, uma *aldotriose*, e a di-hidroxiacetona, uma *cetotriose*. O gliceraldeído apresenta um carbono (C_2) quiral, dando origem a dois enantiômeros: D e L. Os monossacarídios biologicamente importantes apresentam configuração D, ou seja, têm a hidroxila do carbono quiral mais distante do carbono 1 em posição idêntica à do D-gliceraldeído.

As aldoses e cetoses exibem propriedades típicas de aldeídos e cetonas, como a capacidade de reduzir agentes oxidantes fracos: são chamados *açúcares redutores*.

As representações lineares dos monossacarídios na Figura 6.1 são apenas didáticas, porque as ligações entre os carbonos da molécula não têm ângulos de 180º, mas muito menores. Resultam, então, "dobramentos" da cadeia de carbonos, que aproximam uma das hidroxilas ao grupo carbonila (C = O), tanto nas aldoses como nas cetoses. Esta aproximação propicia a reação entre os dois grupos[1], resultando em uma estrutura cíclica, encontrada nos monossacarídios com cinco ou mais átomos de carbono. No caso da molécula de *glicose*, a ligação do carbono 1 é feita, mais frequentemente, com a hidroxila ligada ao carbono 5, formando um anel hexagonal e ficando o carbono 6 excluído do anel (Figura 6.2 a). Na estrutura resultante, o carbono 1 torna-se assimétrico, possibilitando a existência de dois isômeros, nos quais a hidroxila ligada a este carbono pode ficar situada abaixo ou acima do plano do anel; as formas correspondentes são designadas α e β, respectivamente. A molécula de frutose estabelece, preferencialmente, um anel pentagonal, por ligação dos carbonos 2 (grupo carbonila) e 5; há também duas formas possíveis, α e β, referindo-se, entretanto, à configuração do carbono 2 (Figura 6.2 b). 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%.

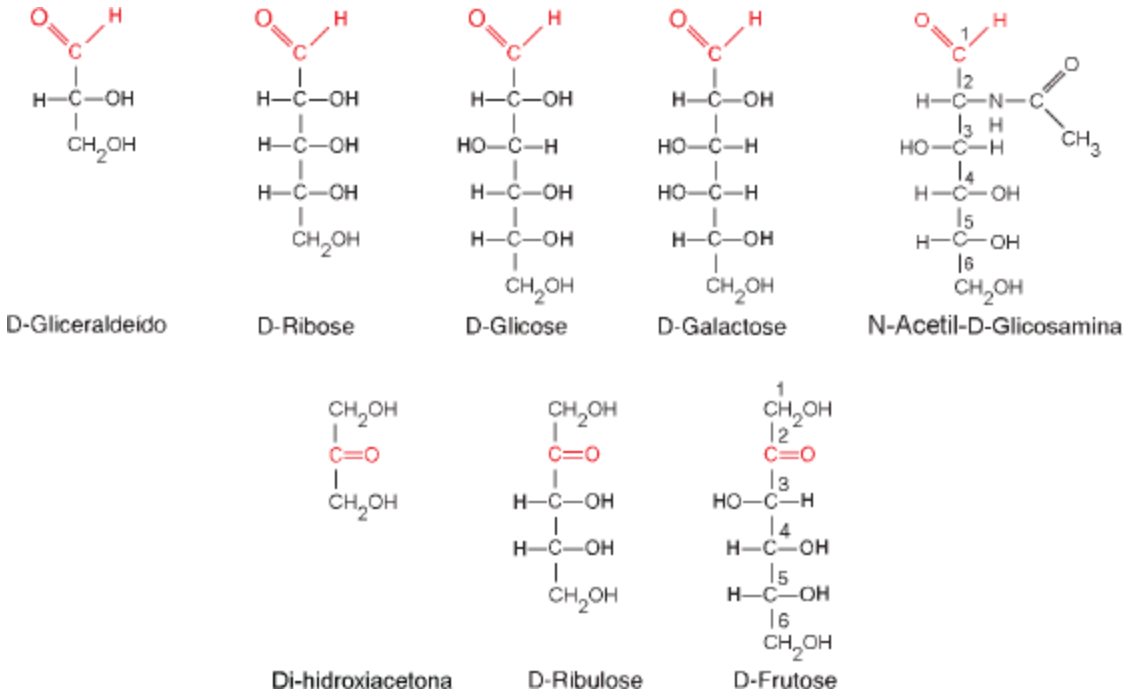


Figura 6.1 Monossacarídios.

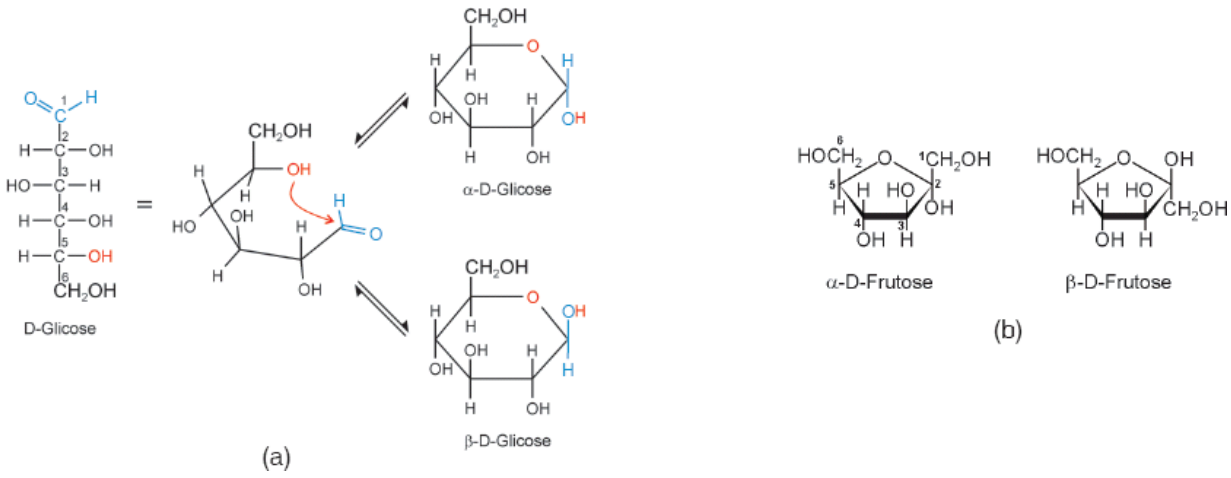
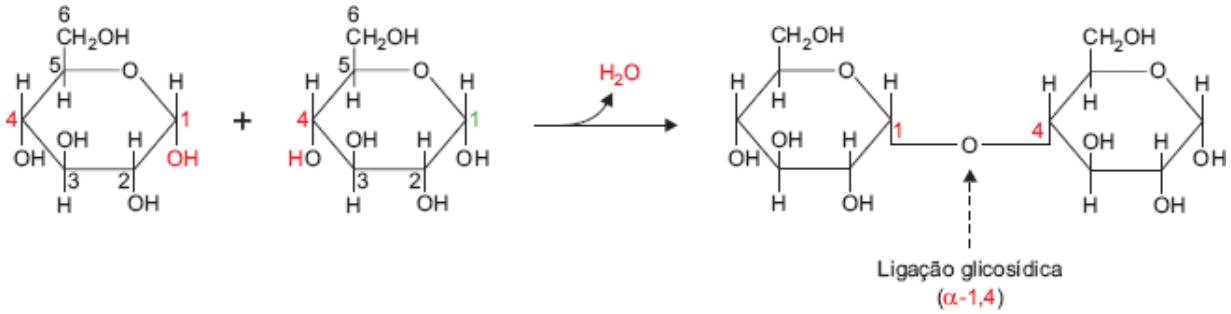


Figura 6.2 a) Conversão da forma em cadeia aberta da molécula de glicose na forma cíclica — o grupo aldeído do carbono 1 reage com o grupo hidroxila do carbono 5, formando um hemiacetal cíclico hexagonal, que pode existir como dois isômeros, α e β. b) Nas fórmulas α e β da D-Frutose, o hemiacetal cíclico é constituído por cinco átomos, resultante da ligação dos carbonos 2 e 5.

Na realidade, os átomos que compõem o anel das formas cíclicas dos monossacarídios não se situam no mesmo plano, como mostrado na Figura 6.2. As moléculas tendem a assumir outras conformações de menor conteúdo energético — a conformação mais frequente da glicose é denominada “cadeira” (Figura 6.3). Ainda assim, as fórmulas planas serão adotadas neste texto, por facilitarem a visualização das reações sofridas pelos monossacarídios.

Oligossacarídios são carboidratos formados por um pequeno número de monossacarídios unidos por ligações glicosídicas. Estas ligações são, *teoricamente*, formadas entre duas hidroxilas de duas moléculas de monossacarídios, pela exclusão de uma molécula de água:



Assim como a ligação peptídica **não** se forma diretamente entre dois aminoácidos, a ligação glicosídica **não** se forma diretamente entre dois monossacarídios. O esquema representa um processo composto de várias reações. A ligação glicosídica mostrada é designada α-*1,4* por ter sido estabelecida entre o carbono 1, com configuração α, e o carbono 4.

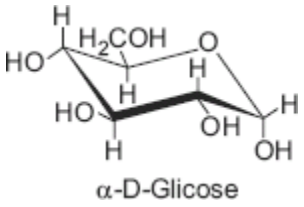


Figura 6.3 Conformação em “cadeira” da α-D-Glicose.

Os oligossacarídios mais comuns são os *dissacarídios*, que incluem a *sacarose* — formada por glicose e frutose, unidas por ligação α-1,2 — e a *lactose*, constituída de glicose e galactose, unidas por ligação β-1,4 (Figura

6.4). Note-se que a sacarose não é um açúcar redutor, porque os grupos redutores dos monossacarídios que a formam estão envolvidos na ligação glicosídica (C_1 da glicose e C_2 da frutose); a lactose, com o carbono 1 do resíduo de glicose livre, comporta-se como um açúcar redutor.

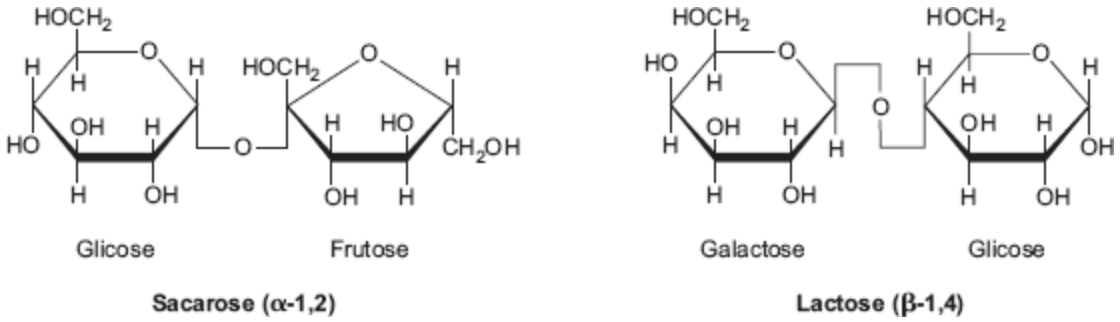


Figura 6.4 Estrutura dos dois dissacarídios mais comuns.

Polissacarídios são polímeros constituídos de centenas ou milhares de resíduos de monossacarídios, mais comumente a glicose. Podem formar cadeias lineares, como na *celulose* e na *quitina*, ou cadeias ramificadas, como no *amido* e no *glicogênio*. Na celulose, as unidades de glicose são polimerizadas por ligações glicosídicas entre os carbonos 1 (com configuração β) e 4: ligações β-1,4; na quitina, o mesmo tipo de ligações é estabelecido entre resíduos de N-acetil-glicosamina. O amido e o glicogênio contêm cadeias de glicose similares, mas a organização supramolecular das cadeias para formar grânulos é totalmente diferente nos dois polissacarídios.

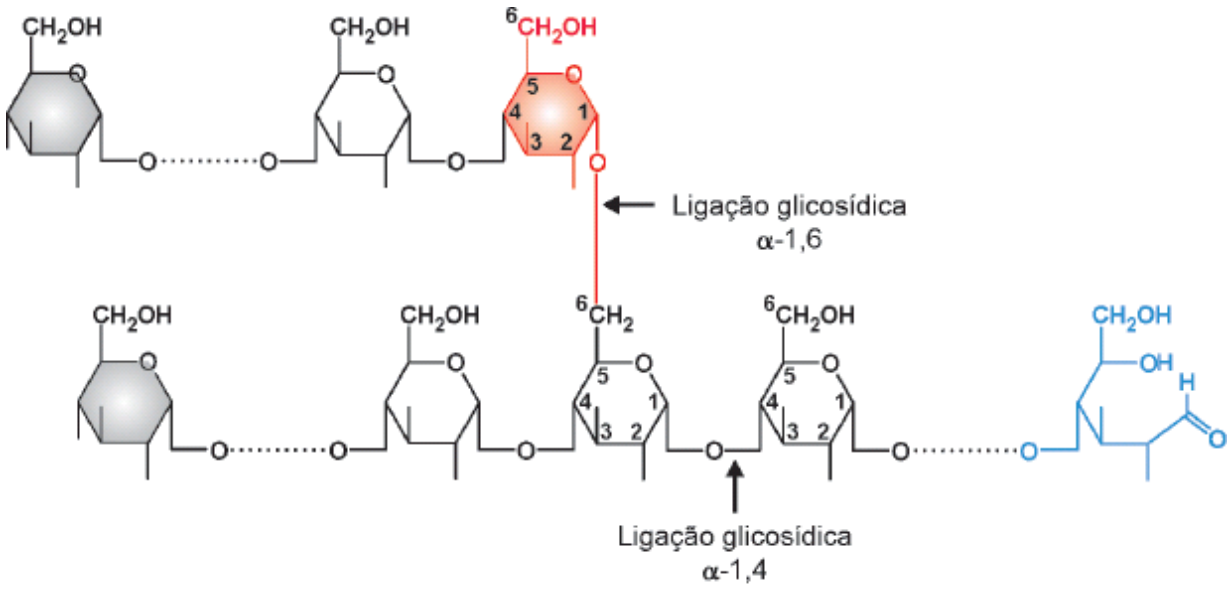
O amido é composto de duas frações: *amilose* e *amilopectina*, que correspondem, respectivamente, a cerca de 20 e 80% do amido na maioria das plantas. A amilose é composta por cadeias lineares de resíduos de glicose unidos pelos carbonos 1 (com configuração α) e 4: ligações α-1,4. A amilopectina, a fração principal, contém cadeias lineares mais curtas que a amilose, e contendo ramificações formadas por ligações entre os carbonos 1 e 6: ligações α-1,6. A extremidade da amilopectina que tem o resíduo de glicose com o carbono 1 (do grupo aldeído, redutor) livre é chamada *redutora*; as inúmeras extremidades restantes são chamadas *não redutoras*, por terem resíduos de glicose com o carbono 1 comprometido em ligações glicosídicas α-1,4 (Figura 6.5 a). A arquitetura interna do grânulo de amido

é caracterizada por lamelas concêntricas semicristalinas de amilopectina, intercaladas por camadas amorfas de amilose. A estrutura tridimensional do grânulo ainda não é totalmente conhecida.

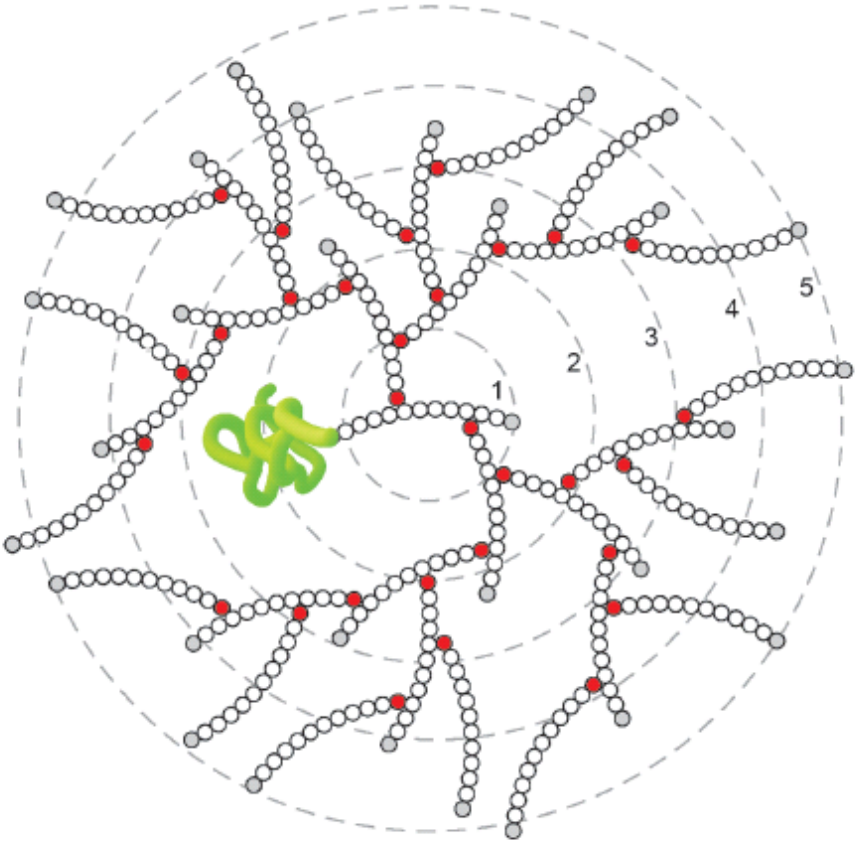
Nas plantas superiores, grânulos de amido são encontrados nas folhas, em *cloroplastos*, onde ocorre a fotossíntese, e nos tecidos não fotossintéticos, em organelas especializadas, denominadas *amiloplastos*. Alimentos importantes para os seres humanos são constituídos por órgãos de armazenamento de amido das plantas cultivadas, tais como as sementes de cereais (arroz, milho, trigo etc.), tubérculos e raízes (batata, mandioca etc.) e feijões e ervilhas.

As cadeias de glicogênio assemelham-se às da amilopectina, embora sejam mais ramificadas. Como na amilopectina, as unidades de glicose estabelecem ligações α-1,4 nos segmentos lineares, e ligações α-1,6 nas ramificações. O glicogênio também apresenta uma única *extremidade redutora* que se liga à glicogenina, a proteína que inicia a síntese do glicogênio (Seção 13.1); todas as outras são *extremidades não redutoras*. A molécula de glicogênio assemelha-se a uma esfera, composta por camadas concêntricas de cadeias ramificadas, basicamente, e de cadeias lineares periféricas; são no máximo 12 camadas e, em média, sete (Figura 6.5 b).

O glicogênio é armazenado nas células animais como grânulos citosólicos, que constituem unidades funcionais dinâmicas: as enzimas necessárias ao seu metabolismo associam-se aos grânulos ou deles se dissociam, dependendo do conteúdo celular do carboidrato.



(a)



(b)

Figura 6.5 a) Cadeia de amilopectina, com duas porções lineares e uma ramificação. Os resíduos de glicose das extremidades não redutoras estão assinalados em *cinza*; aquele que inicia a ramificação, em *vermelho*, e o resíduo da única extremidade redutora, em *azul*. b) Modelo bidimensional da estrutura do glicogênio, mostrando apenas 5 camadas concêntricas de cadeias de glicose. A estrutura de cor *verde* simboliza a glicogenina (Seção 13.1).

O amido é o carboidrato mais abundante da dieta dos seres humanos, seguido por sacarose e lactose. Consequentemente, o principal produto da digestão dos carboidratos é a glicose, secundada por pequenas quantidades de frutose e galactose. Carboidratos componentes de fibras dietéticas, como a celulose, por exemplo, não podem ser digeridos pelos seres humanos, que não dispõem de enzimas capazes de catalisar a hidrólise das ligações β-1,4 deste polissacarídio. Apesar disto, a presença de fibras na alimentação resulta em efeitos fisiológicos benéficos (Seção 18.2.3).

As funções dos carboidratos são bastante diversificadas, incluindo a sustentação (celulose nos vegetais, quitina nos animais) e a reserva (glicogênio nos animais, amido nos vegetais), além de poderem estar ligados a lipídios e proteínas, formando os glicolipídios e as glicoproteínas, componentes de membranas (Seção 7.3).

6.2 Estrutura de lipídios

Os lipídios (*lipos*, em grego, significa gordura) constituem uma classe de compostos caracterizados por sua alta solubilidade em solventes orgânicos e por serem praticamente insolúveis em água. Apresentam estrutura bastante variada e exercem diversas funções biológicas, como reservas de energia e componentes de membranas e outras estruturas celulares; eles próprios ou seus derivados têm também função de vitaminas e hormônios. São indispensáveis na dieta dos seres humanos, por incluírem os ácidos graxos essenciais (Seção 16.6) e as vitaminas lipossolúveis.

6.2.1 Ácidos graxos

Os *ácidos graxos* são ácidos monocarboxílicos, geralmente com uma cadeia carbônica longa, com número par de átomos de carbono e sem ramificações, podendo ser saturada ou conter uma insaturação (*ácidos graxos monoinsaturados*) ou duas ou mais insaturações (*ácidos graxos poli-insaturados*). O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia carbônica, a parte apolar (Figura 6.6).

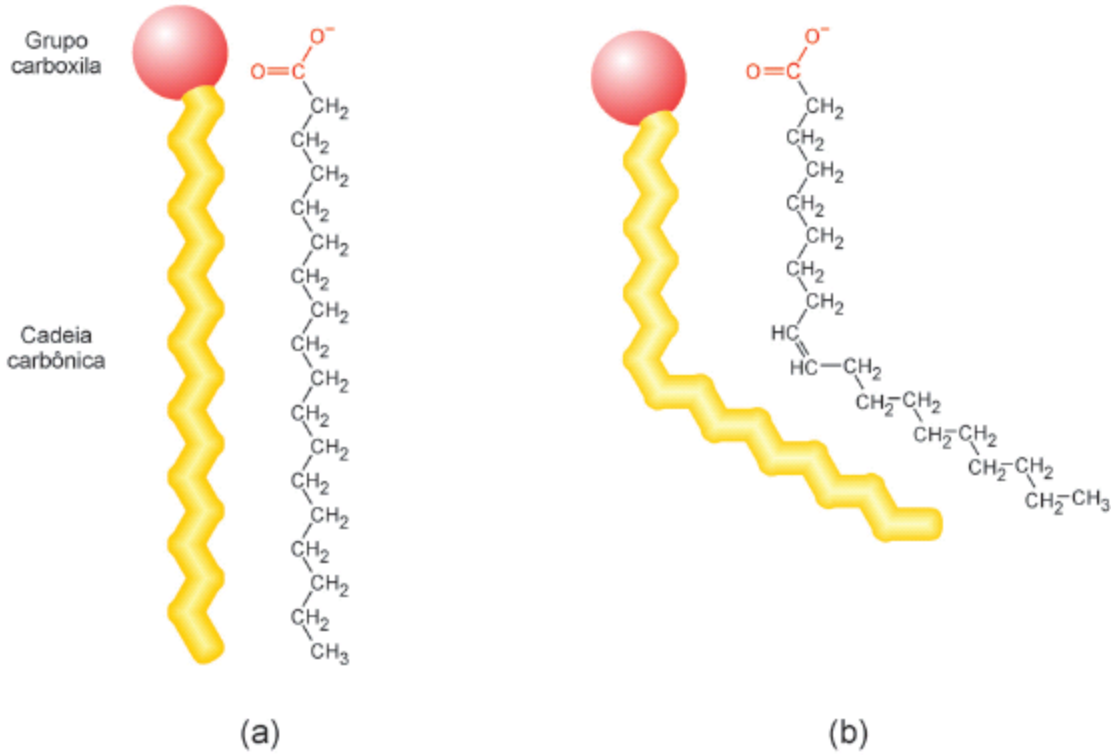


Figura 6.6 Estrutura de dois ácidos graxos com 18 carbonos: ácido esteárico, saturado (a) e ácido oleico, insaturado (b). A presença da dupla ligação *cis* resulta em uma dobra na molécula. À esquerda das fórmulas estruturais, estão as suas representações tridimensionais.

Os nomes triviais dos ácidos graxos[2], em geral, derivam-se das fontes onde são encontrados em abundância. Assim, ácido palmítico do óleo de palma (ou azeite de dendê), ácido oleico do óleo de oliva, linoleico e linolênico do óleo de linhaça etc. Os ácidos graxos mais comuns são os de 16 e 18 carbonos (Tabela 6.1). Os átomos de carbono podem ser indicados por números ou por letras. A numeração inicia-se no grupo carboxila (carbono 1 ou C_1) e aumenta em direção à extremidade oposta, formada

pelo grupo metila. No sistema de denominação por letras, o carbono 2 é o carbono α, o carbono 3 é o carbono β e assim por diante, e o carbono do terminal CH_3 é o carbono ω (ômega, a última letra do alfabeto grego), também denominado carbono *n* (Figura 6.7).

Para a identificação da posição das duplas ligações na cadeia carbônica, empregam-se diferentes sistemas de representação.

No sistema *delta* (Δ), adota-se a numeração convencional dos átomos de carbono, a partir da extremidade carboxila e todas as duplas ligações do ácido graxo são identificadas. Cada dupla ligação é representada pelo símbolo Δ, seguido pelo número do átomo de carbono mais próximo da carboxila (C_1) que participa da dupla ligação. Por exemplo, uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 10 é representada por Δ9 ou Δ^9.

Tabela 6.1 Ácidos graxos naturais mais comuns.

Saturados	Número de átomos de carbono
Mirístico	14
Palmítico	16
Esteárico	18
Araquídico	20
Lignocérico	24

Insaturados		Número de insaturações	Sistemas de abreviação		
			Δ	ω	*n*
Palmitoleico	16	1	16:1 Δ9	16:1 ω-7	16:1 *n*-7
Oleico	18	1	18:1 Δ9	18:1 ω-9	18:1 *n*-9
Linoleico	18	2	18:2 Δ9,12	18:2 ω-6	18:2 *n*-6
α-Linolênico [1]	18	3	18:3 Δ9,12,15	18:3 ω-3	18:3 *n*-3
γ-Linolênico [1]	18	3	18:3 Δ6,9,12	18:3 ω-6	18:3 *n*-6
Araquidônico	20	4	18:4 Δ5,8,11,14	18:4 ω-6	18:4 *n*-6

[1]A denominação usualmente adotada para as duas espécies de ácido linolênico não obedece às regras de nomenclatura estabelecidas e segue um critério peculiar: quando a dupla ligação mais próxima da extremidade metila é do tipo ω-3, o ácido é o α-linolênico e quando é do tipo ω-6, é o γ-linolênico, porque a ligação ω-6 dista três carbonos (“contados” como α, β e γ) da dupla ligação ω-3.

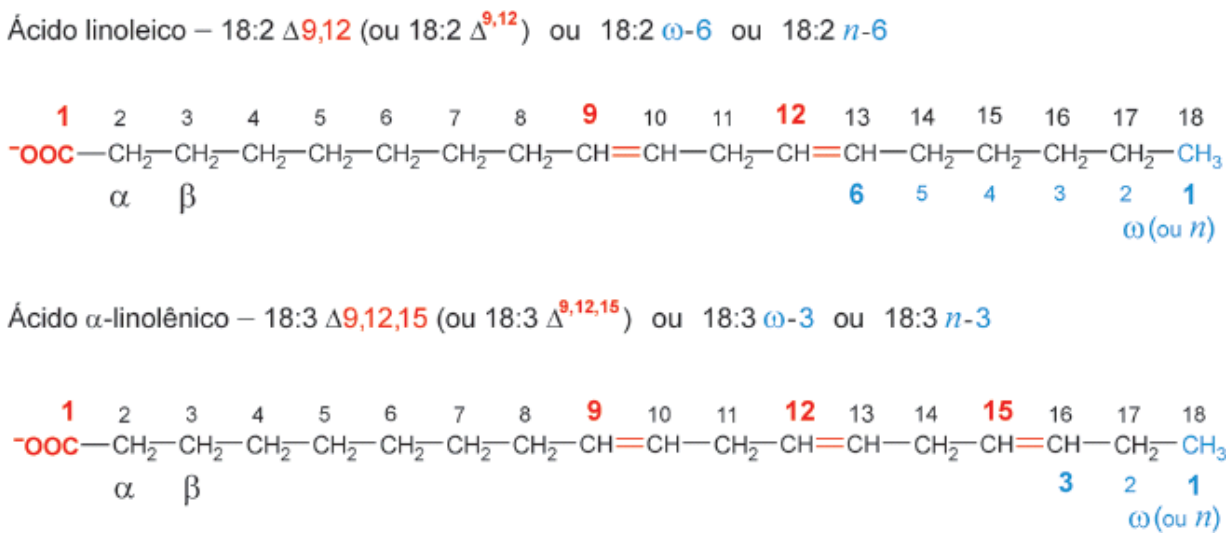


Figura 6.7 Sistemas de representação dos ácidos graxos insaturados, ilustrados por esquemas dos ácidos linoleico e α-linolênico — estão indicados os números e as letras atribuídos aos carbonos, a posição das duplas ligações e as diferentes abreviações dos ácidos graxos, de acordo com os sistemas vigentes.

O sistema ω e o sistema *n* diferem unicamente pela letra (ω ou *n*) atribuída ao carbono do grupo CH_3. Nos dois sistemas, a contagem dos átomos de carbono inicia-se no grupo CH_3, cujo carbono (carbono ω ou carbono *n*) passa a ser o de número 1 e apenas uma dupla ligação do ácido graxo é identificada. A dupla ligação mais próxima da extremidade metila recebe um número igual ao número do átomo de carbono mais próximo do carbono ω (ou *n*) que forma a dupla ligação, numerando-se os carbonos sempre a partir do carbono ω (ou *n*). Assim, ácidos graxos do tipo ω-3 (ou *n*-3) têm uma dupla ligação entre os carbonos 3 e 4 e aqueles do tipo ω-6 (ou *n*-6) têm uma dupla ligação entre os carbonos 6 e 7 (Figura 6.7).

O sistema Δ permite identificar a posição de *todas* as insaturações presentes no ácido graxo, especificando, sem ambiguidade, cada molécula, enquanto os sistemas ω e *n* revelam apenas a posição da dupla ligação mais

próxima do grupo metila terminal. As designações ω-3 e ω-6 geralmente não são acompanhadas da indicação do número de átomos de carbono e nem do número de insaturações, de modo que englobam duas famílias de ácidos graxos e não apenas um deles.

Um ácido graxo costuma ser representado por uma abreviação que indica o número de átomos de carbono, seguido por dois-pontos, o número de duplas ligações e a posição das insaturações na cadeia de carbono, posição esta que pode ser mostrada segundo um dos sistemas descritos, sendo o sistema *delta* (Δ), o mais adequado. O *ácido linoleico,* que tem 18 carbonos e duas insaturações, uma entre os carbonos 9 e 10 e a outra entre os carbonos 12 e 13, pode ser abreviado por:

18:2 Δ9,12 (ou 18:2 $\Delta^{9,12}$) ou 18:2 ω-6 ou 18:2 *n*-6

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 por meio de interações hidrofóbicas (Figura 6.8 a). Os ácidos graxos *insaturados* naturais têm, quase sempre, duplas ligações com configuração geométrica *cis*, isto é, os átomos de hidrogênio dispõem-se do mesmo lado da dupla ligação (Figura 6.6 b) — a dupla ligação *cis* produz uma dobra rígida na cadeia, o que determina a formação de agregados menos compactos e, portanto, menos estáveis (Figura 6.8 b). 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 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 ruptura parcial de interações intermoleculares. De modo geral, a temperatura de fusão dos ácidos graxos diminui com o número de insaturações e aumenta com o comprimento da cadeia, como mostram os exemplos da Tabela 6.2.

O ácido esteárico (saturado) e o ácido oleico (uma insaturação), ambos com 18 carbonos, têm pontos de fusão muito diferentes. Por outro lado, o ponto de fusão do ácido esteárico é pouco maior do que o ponto de fusão do ácido palmítico, que tem dois carbonos a menos. Assim, a presença de uma

dupla ligação em ácidos graxos com o mesmo número de carbonos reduz drasticamente o ponto de fusão, enquanto um número menor de carbonos leva a um decréscimo menor — o efeito das insaturações é maior do que aquele do comprimento da cadeia.

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. O grau de fluidez das membranas biológicas depende, então, do tipo de ácido graxo presente nos seus lipídios estruturais.

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 (Figura 6.9).

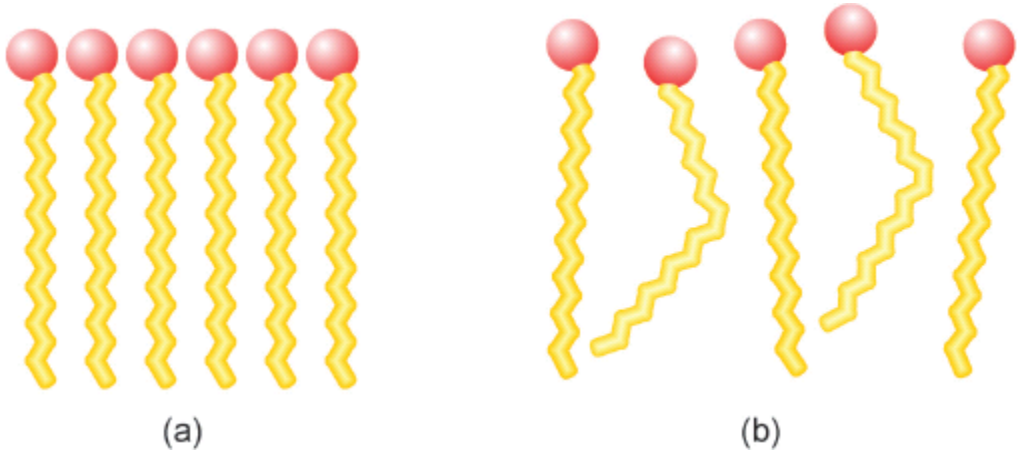


Figura 6.8 Interação entre moléculas de ácidos graxos saturados (a) e entre saturados e insaturados (b). A presença de duplas ligações reduz o grau de interação entre moléculas vizinhas.

Tabela 6.2 Temperatura de fusão de ácidos graxos.

Ácido graxo	Número de carbonos	Número de insaturações	Temperatura de fusão (°C)
Esteárico	18	0	69,6

Oleico	18	1	13,4
Palmítico	16	0	63,1

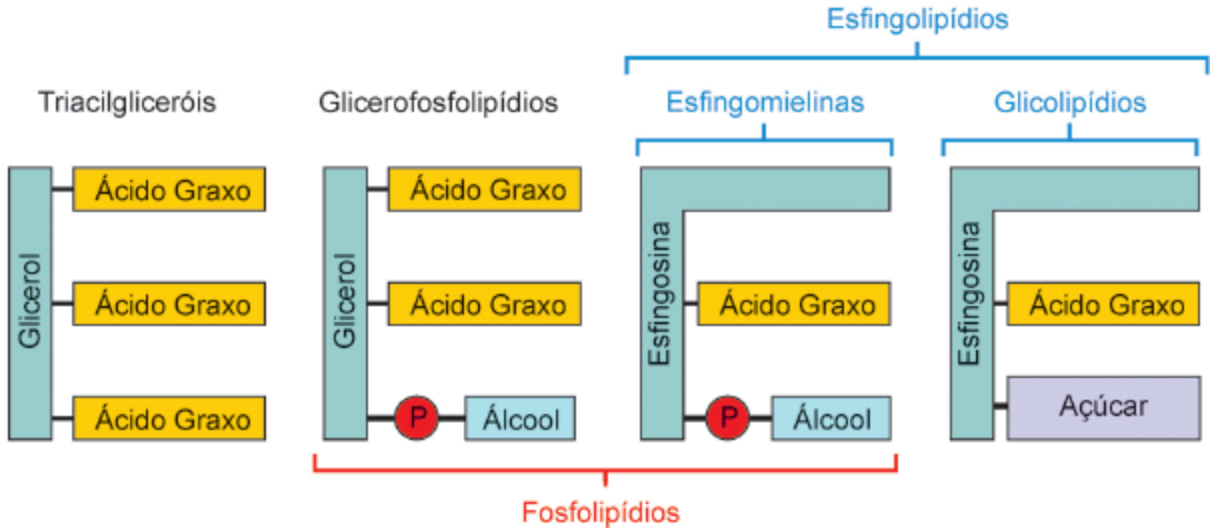


Figura 6.9 Esquema geral de lipídios que contêm ácidos graxos. Ⓟ = grupo fosfato.

6.2.2 Triacilgliceróis

Os lipídios mais abundantes na natureza são os *triacilgliceróis* (também denominados *triglicerídios* ou *triglicérides*), constituídos por três moléculas de ácidos graxos esterificadas a uma molécula de glicerol, ou seja, apresentam três grupos *acila*[3] ligados a glicerol (Figura 6.10). Compostos contendo um grupo acila (*monoacilgliceróis*) ou dois destes grupos (*diacilgliceróis*) e glicerol encontram-se em quantidades pequenas nas células, existindo como intermediários de vias de síntese e degradação de lipídios.

As *gorduras animais* e os *óleos vegetais* são misturas de triacilgliceróis, que diferem na sua composição em ácidos graxos e, consequentemente, 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 por 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 está analisado na Seção 18.2.4.

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 (Seção 2.8) é largamente empregado em laboratórios de pesquisa, para a solubilização de lipídios e para o isolamento de proteínas.

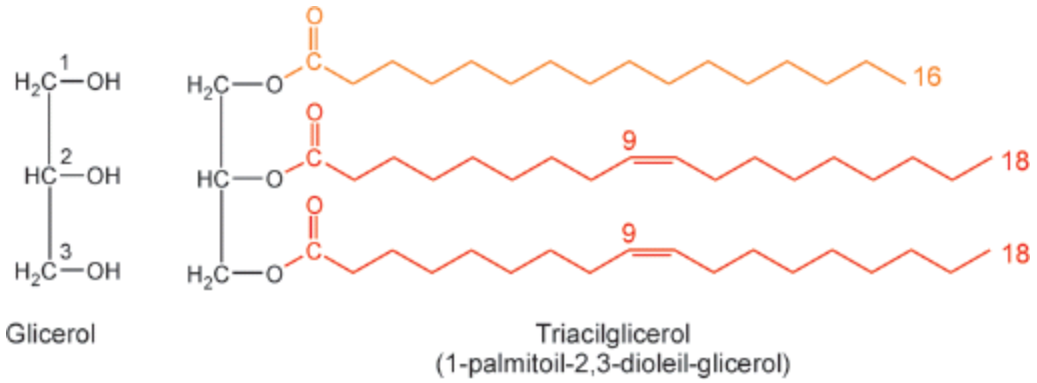


Figura 6.10 Triacilglicerol formado pela esterificação de um ácido palmítico e dois ácidos oleicos ao glicerol. Por simplificação, foi omitida a forma angular das cadeias insaturadas.

Os triacilgliceróis são reservas de energia

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. O seu caráter fortemente hidrofóbico permite o armazenamento nas células sob forma praticamente anidra, ou seja, sem moléculas de água adsorvidas, as quais aumentariam muito o peso da reserva de energia (Tabela 21.2). Os triacilgliceróis constituem a maneira mais eficiente de armazenar energia

nos seres vivos. 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, de localização subcutânea e visceral, que atua também como isolante térmico, na proteção contra choques mecânicos e na sustentação de órgãos.

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 um componente menor de membranas celulares, atua como intermediário da síntese de triacilgliceróis (Seção 16.7) 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 Figura 6.11). Os diferentes lipídios resultantes têm seus nomes derivados dos substituintes do fosfatidato; por exemplo, *etanolamina* e *colina* originam, respectivamente, *fosfatidiletanolamina* (também denominada *cefalina*) e *fosfatidilcolina* (ou *lecitina*). Em alguns glicerofosfolipídios, o ácido fosfatídico está ligado a outro ácido fosfatídico através de uma molécula de glicerol; são chamados de *difosfatidilgliceróis* ou *cardiolipinas*, por terem sido descobertos em músculo cardíaco. Os membros de cada categoria 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.

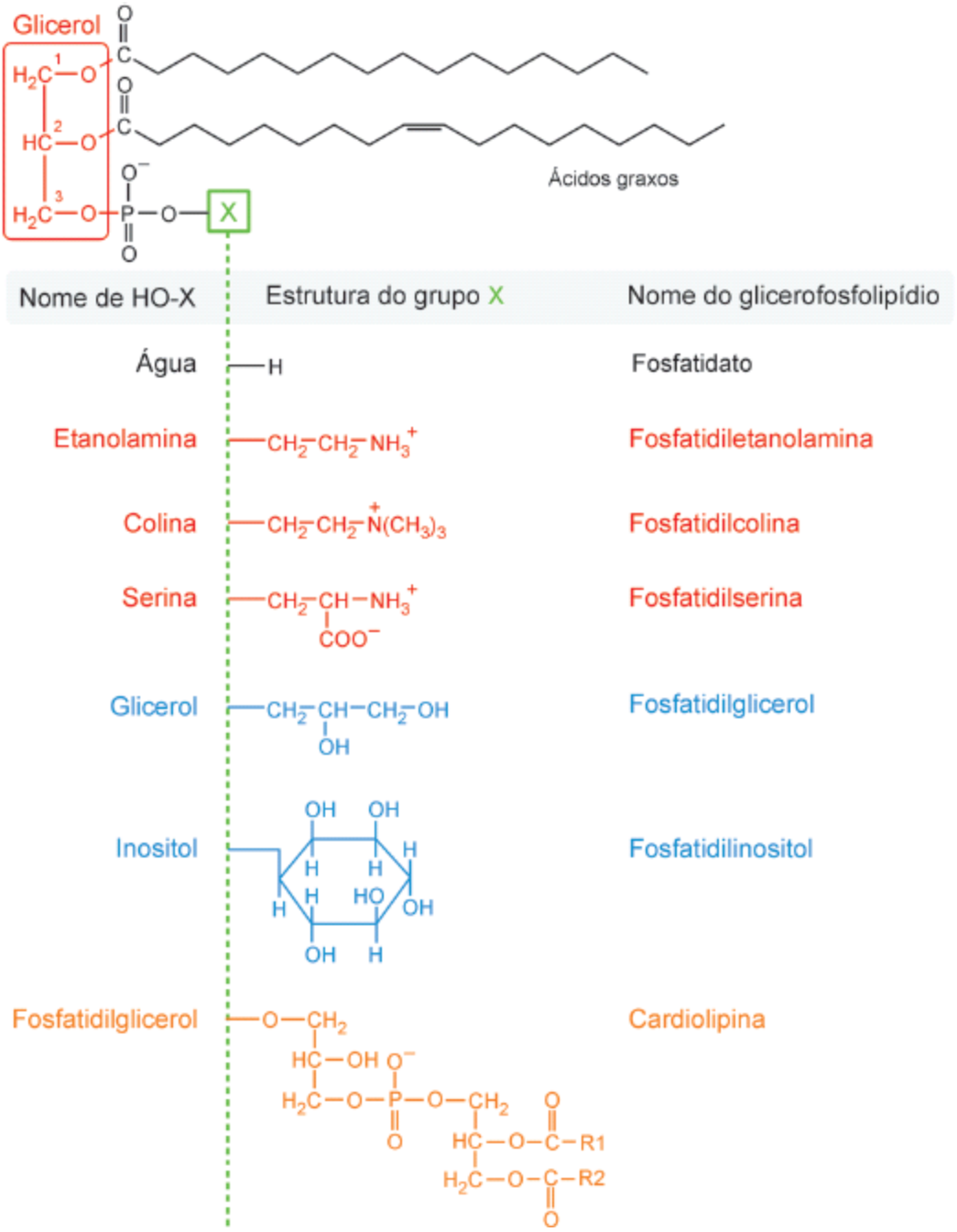


Figura 6.11 Glicerofosfolipídios. A porção hidrofílica de sua molécula consta do grupo fosfato unido por ligação éster a um outro grupo polar, variável, representado por **X**; as cadeias carbônicas dos ácidos graxos esterificados ao glicerol constituem a porção hidrofóbica.

Por conterem fosfato, os glicerofosfolipídios e as esfingomielinas (descritas na seção seguinte) são denominados ***fosfolipídios*** (Figura 6.9).

6.2.4 Esfingolipídios

A estrutura geral dos *esfingolipídios* (Figura 6.12) assemelha-se à dos glicerofosfolipídios. Todavia, os esfingolipídios não contêm glicerol e seu esqueleto básico é formado por um aminoálcool contendo uma longa cadeia de hidrocarboneto, que, mais frequentemente, é a *esfingosina*. O grupo amino da esfingosina liga-se a um ácido graxo por uma ligação amídica, originando *ceramida*. A ligação de uma estrutura polar ao carbono 1 da ceramida forma os esfingolipídios, que, de acordo com a natureza da estrutura polar, podem ser classificados em três tipos: esfingomielinas, cerebrosídios e gangliosídios.

Nas *esfingomielinas*, descobertas na bainha de mielina que envolve os axônios de neurônios, a porção polar é uma *fosforilcolina*. A presença do grupo fosfato nas esfingomielinas permite classificá-las, juntamente com os glicerofosfolipídios, como ***fosfolipídios*** (Figura 6.9).

Nos *cerebrosídios*, a ceramida liga-se a um açúcar, que pode ser glicose ou galactose. Os *gangliosídios* são ainda mais complexos, por apresentarem uma região polar composta por oligossacarídios, às vezes ramificados, com a inclusão de açúcares aminados nas extremidades. Os cerebrosídios e os gangliosídios são encontrados predominantemente no cérebro, ocorrendo em quantidades menores nos outros tecidos. São referidos conjuntamente, como ***glicolipídios*** (Figura 6.9).

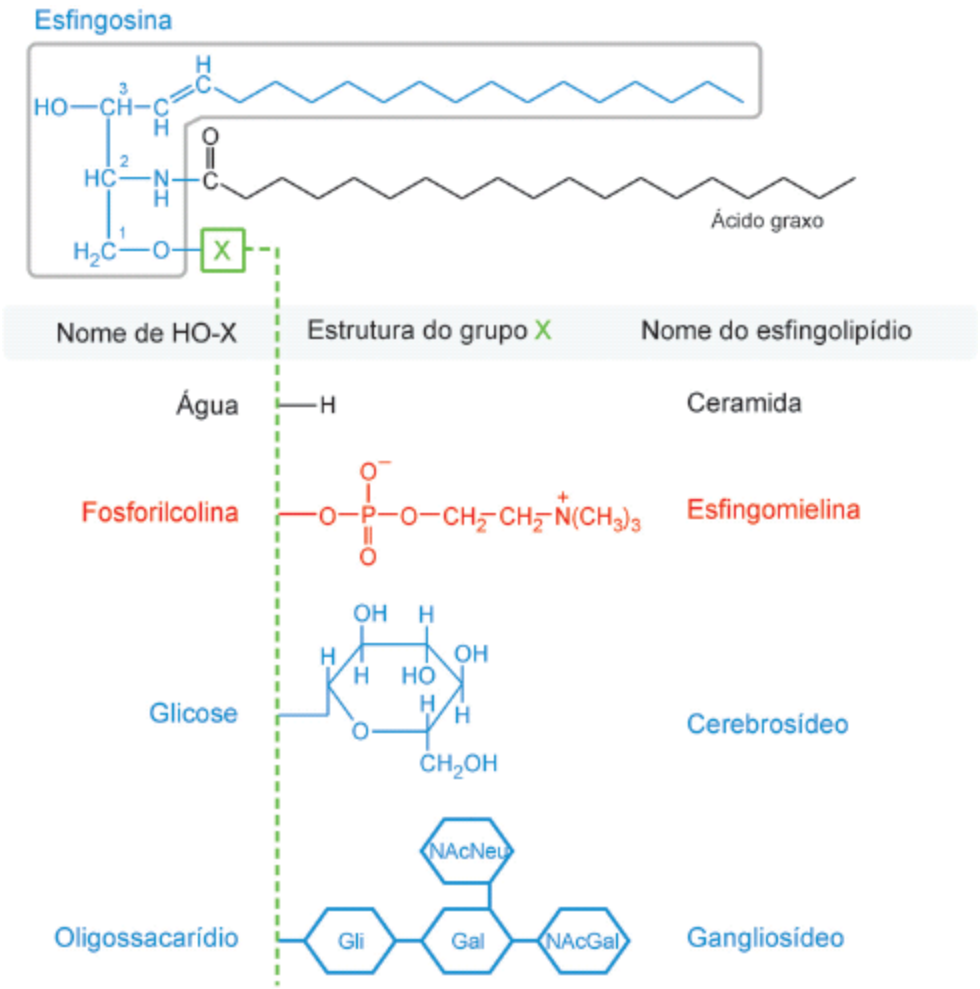


Figura 6.12 Esfingolipídios. Os membros desta classe de lipídios diferem quanto ao grupo polar (simbolizado por **X**) ligado à ceramida; a porção apolar da molécula dos esfingolipídios é formada pelas cadeias carbônicas da esfingosina e do ácido graxo, os componentes da ceramida. Os monossacarídios componentes da cadeia de oligossacarídios dos gangliosídios são: glicose (Gli), galactose (Gal), N-acetil-galactosamina (NAcGal) e ácido N-acetilneuramínico ou ácido siálico (NAcNeu).

6.2.5 Esteroides

Os *esteroides* são lipídios que apresentam um núcleo tetracíclico característico em sua estrutura. O composto-chave deste grupo é o *colesterol* (Figura 6.13), não apenas por ser o esteroide mais abundante dos tecidos animais, como por servir de precursor à síntese de todos os outros

esteroides, que incluem *hormônios esteroides* (hormônios sexuais e do córtex das glândulas suprarrenais), *sais biliares* e *vitamina D*. O colesterol tem, ainda, uma função estrutural importante nas membranas de células animais.

O colesterol, no organismo humano, é transportado pelas lipoproteínas plasmáticas, geralmente ligado a ácidos graxos insaturados, como o ácido linoleico, formando *ésteres de colesterol* — a ligação éster forma-se entre o grupo hidroxila do colesterol e a carboxila do ácido graxo; esta também é a forma de armazenamento de colesterol dentro das células. Apesar de desempenhar funções absolutamente essenciais, o colesterol é muito conhecido por sua associação com a *aterosclerose* (Seção 20.8).

Nos vegetais, o teor de colesterol é, em média, 100 vezes menor do que nos animais — em óleos vegetais é tão baixo que, para fins dietéticos, é considerado igual a zero. As plantas contêm quantidades consideráveis de outros esteroides, os *fitoesteroides*, que diferem do colesterol quanto aos substituintes da cadeia lateral.

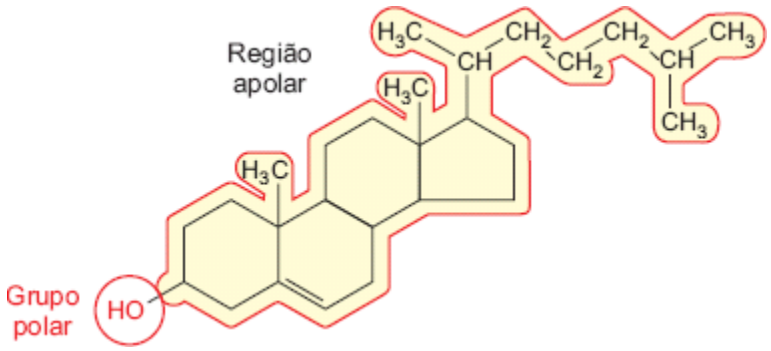


Figura 6.13 Estrutura do colesterol. O grupo hidroxila — parte polar da molécula — pode ligar-se a um ácido graxo, formando um éster de colesterol, uma molécula mais apolar que o colesterol.

6.2.6 Lipídios anfipáticos

Os lipídios anfipáticos são componentes estruturais de membranas

Diferentemente dos triacilgliceróis, os glicerofosfolipídios, os esfingolipídios e o colesterol são *anfipáticos* (ou *anfifílicos*) por

apresentarem na molécula uma porção polar, hidrofílica, e uma porção apolar, hidrofóbica.

Nos fosfolipídios — glicerofosfolipídios e esfingomielinas — a porção hidrofílica é composta pelo grupo fosfato, que apresenta carga negativa em pH fisiológico, e seus substituintes, também polares, que podem ter carga positiva (colina e etanolamina), carga positiva e negativa (serina) ou não apresentar carga (inositol) (Figuras 6.11 e 6.12). Os glicolipídios — cerebrosídios e gangliosídios — contêm açúcares hidrofílicos, que podem não apresentar carga (glicose e galactose) ou apresentar carga positiva devido à presença de grupos amino (Figura 6.12).

A região hidrofóbica dos glicerofosfolipídios e esfingolipídios é representada pelas cadeias de hidrocarboneto dos ácidos graxos e da esfingosina.

A molécula do colesterol exibe um caráter fracamente anfipático, porque o grupo hidroxila é polar e o restante da molécula — os anéis esteroídicos e a cadeia lateral alifática — é apolar (Figura 6.13).

Os lipídios anfipáticos, principalmente os fosfolipídios, são elementos estruturais importantes das membranas biológicas (Capítulo 7). O colesterol, por apresentar um sistema de anéis que compõem um plano rígido, interfere na fluidez das membranas celulares.

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 (o transporte de lipídios através de membranas encontra-se na Seção 7.4.2). Nos seres humanos, os lipídios apolares associam-se a lipídios anfipáticos e proteínas, formando as *lipoproteínas plasmáticas*. Já 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 e absorvidos no intestino, e daqueles sintetizados endogenamente, sobretudo no fígado.

As lipoproteínas plasmáticas (Figura 6.14) 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*[4] e classificadas em A, B, C, D, E, cada classe contendo vários subtipos. Além de elementos estruturais importantes que atribuem polaridade às lipoproteínas, atuam como ativadoras de enzimas que participam do metabolismo dessas partículas e constituem os ligantes dos receptores de lipoproteínas, situados na superfície celular dos tecidos.

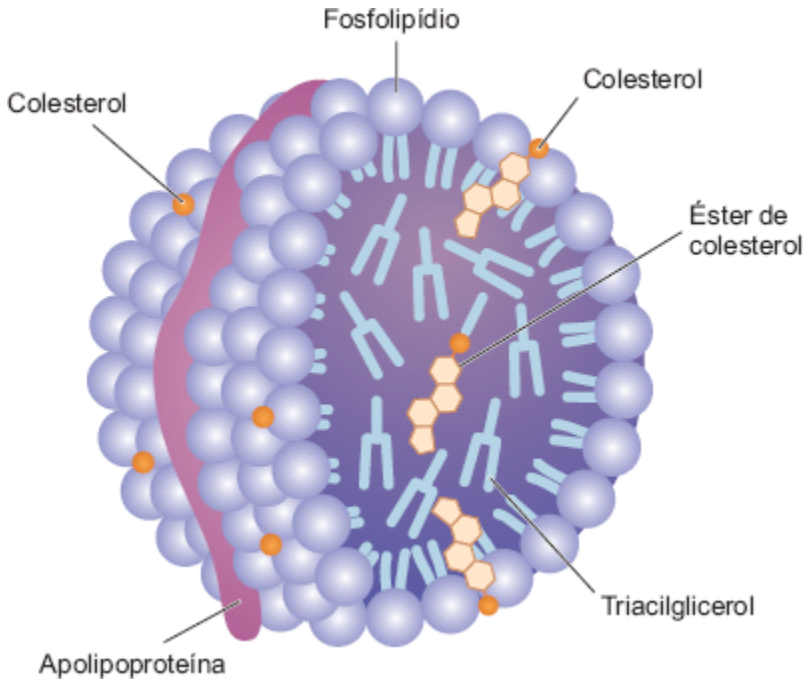


Figura 6.14 Esquema geral das lipoproteínas plasmáticas. O modelo aplica-se a todas as classes de lipoproteínas, lembrando que elas diferem quanto à proporção entre os lipídios transportados (Tabela 6.3) e quanto ao tipo de apolipoproteína associada à monocamada periférica. (Adaptada de Lieberman M, Marks AD: Mark's Basic Medical Biochemistry — A Clinical Approach, 4th ed. Lippincott Wiliams & Wilkins, 2013, p. 590 — Fig. 32.8.)

As lipoproteínas plasmáticas são classificadas segundo a sua densidade, que é tanto menor quanto maior for o seu teor de lipídios (Tabela 6.3). O diâmetro das lipoproteínas decresce de 10^3 nm nos quilomícrons até 10 nm nas HDL. A composição dessas partículas sofre modificações contínuas, devido à troca de moléculas de lipídios e de apolipoproteínas, por meio de processos ainda não totalmente elucidados. Segue-se uma descrição sucinta das principais classes de lipoproteínas.

Tabela 6.3 Composição das lipoproteínas plasmáticas.

				Porcentagem dos lipídios totais			
Lipoproteína	Densidade ($g \cdot cm^{-3}$)	Proteínas (%)	Lipídios (%)	Fosfolipídios	Colesterol	Triacilgliceróis	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

Os dados apresentados são os valores médios de indivíduos normais. As apolipoproteínas foram omitidas.

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* (***V**ery **L**ow **D**ensity **L**ipoproteins*) têm origem hepática e transportam triacilgliceróis e colesterol para os outros tecidos; originam as *IDL* (***I**ntermediate **D**ensity **L**ipoproteins*) e as *LDL* (***L**ow **D**ensity **L**ipoproteins*), 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 (Seção 7.4.2).

As *HDL* (***H**igh **D**ensity **L**ipoproteins*) têm função oposta à das LDL, atuando na remoção de colesterol dos tecidos para o fígado.

A atuação das lipoproteínas no transporte de lipídios está analisada nas Seções 18.2.4 e 20.8.

Bibliografia

Ball S, Morell MK: From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 207-233, 2003.

Behrman EJ, Gopalan V: Cholesterol and plants. *J Chem Educ* **82** (12): 1791-1793, 2005.

Curi R *et al*.: *Entendendo a Gordura — Os Ácidos Graxos.* Editora Manole Ltda., 2002.

Fahy E *et al*.: Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta* **1811** (11): 637-647, 2011.

Lomako J *et al*.: Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1673**: 45-55, 2004.

Silbernagel G *et al*.: Plant sterols and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **24** (1): 12-17, 2013.

Zeqiraj E *et al*.: Structural basis for the recruitment of glycogen synthase by glycogenin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111** (28): E2831-E2840, 2014.

[1] Álcoois podem reagir com o grupo carbonila de aldeídos ou de cetonas formando *hemiacetais* ou *hemicetais*, respectivamente. Nos monossacarídios, a reação intramolecular de um grupo hidroxila com um grupo aldeído (de uma aldose) ou com um grupo cetona (de uma cetose) forma um hemiacetal ou um hemicetal, cíclicos.

[2] Os ácidos graxos são, tradicionalmente, denominados na forma ácida, não ionizada; todavia, deve-se lembrar que a carboxila dos ácidos graxos (pK_a 4-5) permanece desprotonada no pH fisiológico.

[3] *Acila* é a designação genérica para grupos derivados de ácidos graxos, por retirada do grupo OH; acetila, propionila e palmitoila, por exemplo, são as designações para os grupos derivados dos ácidos acético, propiônico e palmítico, respectivamente.

[4] O termo *apolipoproteínas* origina-se do grego *apó*, que significa separação, e designa a proteína na sua forma livre, não associada a lipídios.

OceanofPDF.com

7 Membranas

As células eucarióticas, constituintes dos animais, vegetais, protozoários, fungos e da maioria das algas, além de serem envolvidas pela membrana plasmática, apresentam sistemas internos de membranas, que delimitam organelas subcelulares, como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vários tipos de vacúolos, incluindo lisossomos. Organelas 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 permite mudanças na forma da célula e, em alguns casos, sua locomoção. Lipídios e proteínas componentes da membrana plasmática participam de processos metabólicos fundamentais.

A coordenação do metabolismo 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

Lipídios anfipáticos, quando adicionados a um meio aquoso, tendem a agregar-se, organizando-se espontaneamente em estruturas plurimoleculares. Estas estruturas maximizam as interações hidrofóbicas entre as cadeias carbônicas, isolando-as da água, e deixam 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 (Figura 7.1).

Lipídios e seus derivados com uma única cadeia carbônica, como ácidos graxos, sabões e detergentes, devido à forma cônica e afilada de suas moléculas, constituem, preferencialmente, *micelas* (Figura 7.1 a). Nestas estruturas esféricas, as cadeias de hidrocarboneto dispõem-se no interior, separadas da água, e os grupos polares posicionam-se na superfície externa, interagindo com o solvente. A formação de micelas é uma etapa importante na digestão dos lipídios da dieta.

As moléculas dos glicerofosfolipídios e esfingolipídios têm uma forma cilíndrica, devido à presença de duas cadeias apolares. Tal estrutura favorece sua agregação mais estável em uma camada dupla de moléculas, a *bicamada lipídica* (Figura 7.1 b). As moléculas de lipídios alinham-se lado a lado, compondo duas monocamadas; as cadeias carbônicas das monocamadas agrupam-se frente a frente, de modo a criar um domínio hidrofóbico no meio da bicamada; os grupos hidrofílicos dispõem-se na superfície das duas faces da bicamada, interagindo com a água. O colesterol pode intercalar-se entre os lipídios anfipáticos que constituem as bicamadas lipídicas.

Bicamadas lipídicas tendem a converter-se em estruturas fechadas, que são mais estáveis, por não apresentarem caudas hidrofóbicas expostas ao solvente, como acontece na periferia das bicamadas planas. Denominam-se *lipossomos* essas vesículas esféricas sintéticas constituídas por uma bicamada lipídica contínua, delimitando uma cavidade interna preenchida por solvente (Figura 7.1 c). Podem ser produzidos com moléculas de um

único tipo ou de diferentes tipos de lipídios anfipáticos. Os lipossomos têm sido empregados como modelos para o estudo de bicamadas lipídicas e membranas.

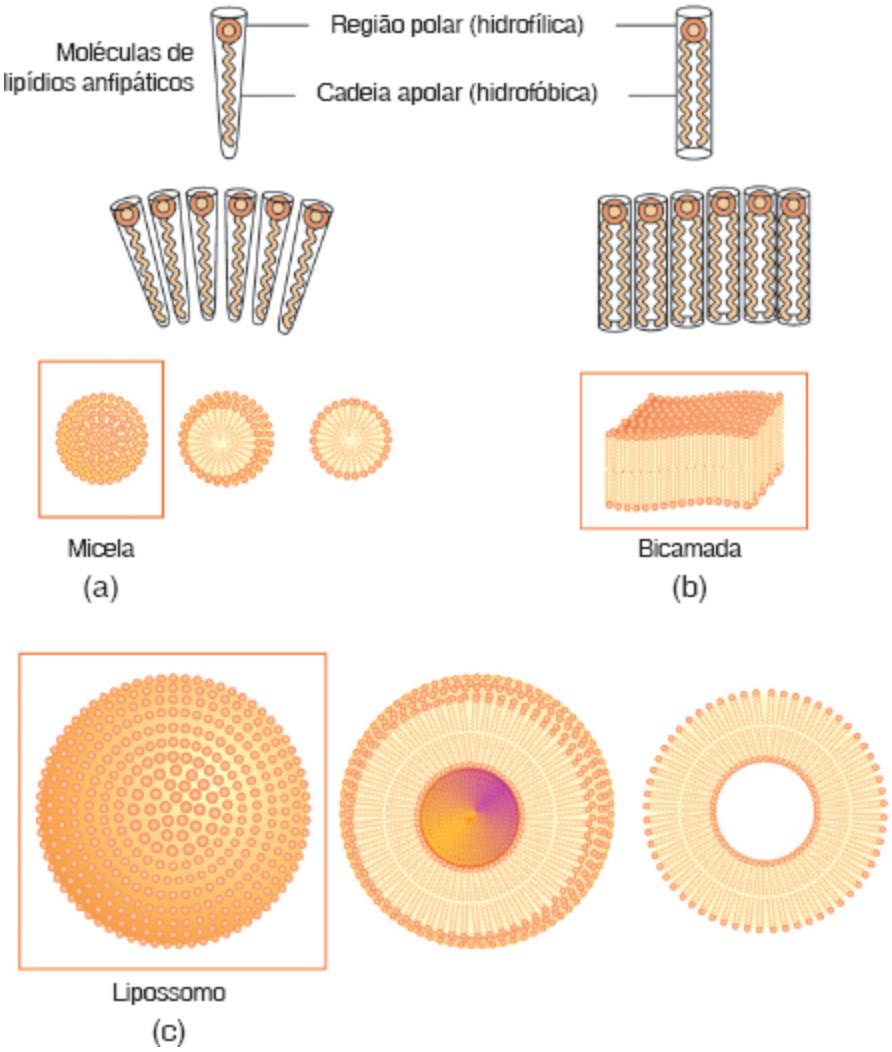


Figura 7.1 Estruturas formadas por lipídios anfipáticos em meio aquoso. a) Micelas são formadas por moléculas de lipídios com uma única cadeia carbônica, cadeias estas que se localizam no interior dessas estruturas. b) A bicamada lipídica é uma estrutura bidimensional na qual as cadeias carbônicas formam 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. c) Lipossomo é uma vesícula oca, resultante do fechamento de uma bicamada lipídica, dotada de uma cavidade central preenchida por solvente.

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 centro hidrofóbico da bicamada (Seção 7.4.1).

A bicamada lipídica isola o conteúdo 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 constituem uma via importante para a administração de medicamentos. Estas substâncias são encapsuladas em lipossomos, que são transportados pela circulação até os tecidos; por fusão das vesículas com a membrana plasmática, os fármacos são introduzidos diretamente nas células. O preparo de lipossomos específicos para o tecido-alvo pretendido permite evitar a atuação inespecífica de agentes farmacológicos, reduzindo a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis.

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

As bicamadas lipídicas sofrem 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 saturadas e longas, o inverso acontecendo em relação a ácidos graxos com cadeias insaturadas e curtas (Seção 6.2.1).

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 proteínas que atuem como seus transportadores. As proteínas desempenham inúmeras outras funções características de cada membrana.

A proporção proteína: lipídio das membranas pode variar de 4:1 (membrana interna de mitocôndrias e membrana plasmática de bactérias) a 1:4 (bainha de mielina), mas, em muitos casos, ela é próxima de 1:1. O conteúdo de lipídios das membranas de mamíferos depende do estado nutricional e da idade do animal; nos seres humanos, a composição dos lipídios anfipáticos das membranas de muitos tecidos pode ser alterada pela dieta. Nas plantas, bactérias e animais ectotérmicos, varia com as condições do meio ambiente: luz, temperatura, pH, salinidade etc.

Glicolipídios e glicoproteínas respondem pelo teor de carboidratos das membranas, que é, geralmente, baixo.

Resumindo, enquanto os lipídios presentes nas membranas biológicas são responsáveis por 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.

Os fosfolipídios são os componentes mais abundantes das membranas

A bicamada das membranas dos seres vivos é composta por uma mistura complexa e heterogênea de lipídios anfipáticos. Todavia, a comparação entre diferentes membranas (Tabela 7.1) permite algumas generalizações.

Nos organismos superiores, as membranas celulares são construídas, basicamente, com fosfolipídios (glicerofosfolipídios e esfingomielinas). Os glicerofosfolipídios estão presentes em quantidades muito maiores que as

esfingomielinas, sendo fosfatidilcolina, o lipídio mais abundante (exceto na membrana plasmática). Além dos fosfolipídios, o colesterol é um componente importante das membranas eucarióticas; nas membranas plasmáticas é o lipídio presente na maior concentração, sendo encontrado em pequenas quantidades nas membranas intracelulares. As membranas mitocondriais, especialmente a interna, 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.

Tabela 7.1 Composição em lipídios de membranas celulares.

	Porcentagem dos lipídios totais (%)									
	Fosfolipídios									
Membrana	F	FC	FE	FS	FI	FG	DFG	EM	GL	C
Plasmática[1]	1,0	18	15	9,0	4,0	—	—	16	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	17	8,0	—	—	—	7,0	26	26
Escherichia coli[3]	—	—	80	—	—	15	5,0	—	—	—
Bacillus megaterium[3]	—	—	69	—	—	30	1,0	—	—	—

F = fosfatidato; FC = fosfatidilcolina; FE = fosfatidiletanolamina; FS = fosfatidilserina; FI = fosfatidilinositol; FG = fosfatidilglicerol; DFG = difosfatidilglicerol (cardiolipina); EM = esfingomielina; GL = glicolipídios (cerebrosídios e gangliosídios); C = colesterol. [1]Membranas de hepatócitos de rato. [2]Cérebro de rato. [3]Membrana plasmática.

As membranas plasmáticas de bactérias caracterizam-se pela presença de poucos tipos de glicerofosfolipídios, predominando fosfatidiletanolamina

e proporções menores de fosfatidilglicerol e cardiolipina; 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 grau de insaturação e o comprimento das cadeias carbônicas dos seus lipídios estruturais e, também, com a temperatura. Seres vivos cuja temperatura flutua com a do meio ambiente — plantas, bactérias e animais ectotérmicos — 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 endotérmicos é sempre maior que a temperatura de transição de suas membranas: as membranas dos mamíferos são líquidas a 37°C. Em resumo, as membranas dos seres vivos são fluidas, com consistência semelhante à da parafina líquida.

O colesterol, nas células de mamíferos, constitui um fator adicional importante de regulação das propriedades físico-químicas das membranas. Suas moléculas intercalam-se na bicamada lipídica, a hidroxila interagindo com os grupos polares dos fosfolipídios e os anéis esteroídicos com as cadeias carbônicas. Os anéis hidrofóbicos, de estrutura plana e rígida, orientam-se paralelamente aos fosfolipídios e induzem o alinhamento e a redução da movimentação das cadeias carbônicas dos fosfolipídios; o resultado é o aumento da rigidez e da espessura da membrana. Todavia, como a molécula de colesterol não alcança o centro da bicamada — o anel tetracíclico associa-se, em média, com os primeiros 10 carbonos das cadeias de hidrocarboneto dos fosfolipídios — é a porção periférica da membrana que se torna mais densa. A intensidade de tais efeitos depende ainda da estrutura dos fosfolipídios: a interação do colesterol com as cadeias saturadas é maior do que com as insaturadas. Essas alterações são relativas e o estado fluido, característico das membranas biológicas, permanece.

Diversas condições patológicas são relacionadas com alterações da consistência de membranas. No alcoolismo crônico, há um aumento significativo do teor de colesterol da membrana plasmática das hemácias, o que reduz a fluidez da membrana. Estas células são menos resistentes à hemólise e adquirem uma forma anormal, o que ocasiona a sua destruição

pelo baço prematuramente, resultando em um estado anêmico. O álcool e determinados agentes farmacológicos, como os anestésicos, também atuam diretamente nas membranas do sistema nervoso central, alterando o seu estado físico.

O colesterol participa da formação de *lipid rafts* e cavéolas

A consistência fluida das membranas biológicas não existe em toda a sua extensão. Na década de 1990, verificou-se a existência de domínios na membrana plasmática, formados por interação entre moléculas de colesterol (abundante nessa membrana) e de esfingomielinas (contêm cadeias acila saturadas, que se associam fortemente com o anel esteroídico), além de determinadas proteínas integradas. Esses domínios destacam-se por sua estrutura mais rígida e compacta que o restante da membrana e foram chamados de *rafts* (plataformas). *Cavéolas* são um tipo especial de *rafts*, formadas por depressões da membrana plasmática revestidas internamente pela proteína *caveolina*; as cavéolas medeiam o transporte por endocitose (Seção 7.4.2). A função de *rafts* e cavéolas seria tornar mais eficientes os sistemas de transporte e de transdução de sinal (Seção 19.3) das membranas biológicas.

As duas monocamadas 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 espontânea 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: as duas monocamadas são constituídas por lipídios diferentes. As membranas plasmáticas de células animais são especialmente assimétricas: fosfatidilcolina e esfingomielina são encontradas predominantemente na monocamada externa e fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina, na

monocamada interna; os glicolipídios localizam-se apenas na monocamada externa.

A passagem de lipídios de uma monocamada para outra ocorre em determinadas situações e é catalisada por famílias de enzimas denominadas *flipases*.

7.2.1 Modelo do mosaico fluido

A estrutura das membranas biológicas — a disposição das proteínas na bicamada lipídica — é descrita pelo modelo do *mosaico fluido* (Figura 7.2), proposto por Singer e Nicholson em 1972. Segundo o modelo, os componentes interagem por meio de ligações não covalentes e podem difundir-se lateralmente em um meio de consistência líquida.

O grau de interação de proteínas com a bicamada lipídica é variável. Muitas proteínas de membrana estão imersas na bicamada lipídica, associando-se fortemente às cadeias apolares dos lipídios, por meio de interações hidrofóbicas. Estas proteínas, chamadas *integradas*, são extraídas somente após ruptura da membrana por tratamento com detergentes, solventes orgânicos etc.; ainda assim, são obtidas com moléculas de lipídios aderidas e são insolúveis em água.

A maioria das proteínas integradas estende-se transversalmente na membrana graças à presença de três domínios em sua estrutura: dois domínios hidrofílicos terminais, ricos em aminoácidos polares, e um domínio hidrofóbico central, com predominância de aminoácidos apolares. 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 e folha β pregueada. 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*, associa-se à superfície da membrana por ligações de hidrogênio ou interações iônicas, estabelecidas com grupamentos polares dos lipídios da bicamada. Estas

ligações podem ser rompidas por procedimentos que não perturbam significativamente a estrutura da membrana, como o tratamento com ureia ou soluções salinas concentradas. Após extração, as proteínas periféricas são solúveis em água e o exemplo clássico é o citocromo *c*. Algumas proteínas periféricas associam-se a regiões de proteínas integradas expostas em uma das faces da membrana; outras se ligam 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 antígenos de superfície têm, via de regra, uma porção externa maior que o segmento intramembrana. Em outros casos, a cadeia polipeptídica pode atravessar várias vezes a bicamada lipídica, formando estruturas que viabilizam o transporte de metabólitos através de membranas (Seção 7.4).

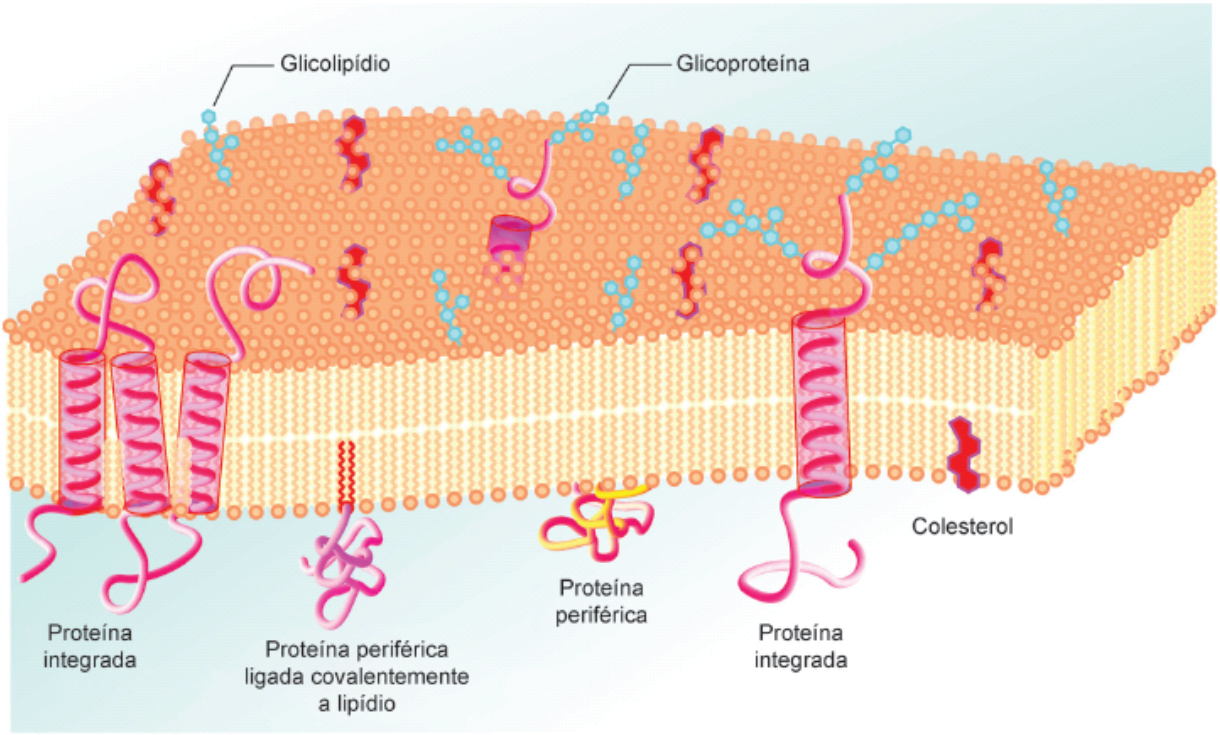


Figura 7.2 Esquema de uma membrana plasmática, baseado no modelo do mosaico fluido. Os oligossacarídios de glicoproteínas e glicolipídios projetam-se para o exterior da célula. A proporção entre o tamanho das

moléculas não é a verdadeira. Para simplificar o esquema, todas as cadeias carbônicas dos fosfolipídios foram representadas como sendo saturadas.

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: a membrana apresenta uma distribuição assimétrica de proteínas (Seção 7.3.2), como acontece com os fosfolipídios. A movimentação lateral de proteínas, em algumas circunstâncias, pode ser restringida. Nas hemácias, as proteínas integradas têm sua mobilidade reduzida por estarem ligadas ao citoesqueleto citoplasmático, formado por microfilamentos de actina, espectrina e outras proteínas.

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

7.3 Funções de componentes da membrana plasmática

7.3.1 Fosfolipídios e colesterol

Os fosfolipídios da membrana plasmática, além de sua função estrutural, são precursores de moléculas reguladoras. Nas fosfatidilcolinas, a fosfolipase A2 catalisa a hidrólise da ligação éster da posição 2 da molécula de glicerol, liberando ácido araquidônico ou outros ácidos graxos, que são precursores de *eicosanoides* (Seção 16.6.1), compostos mediadores de inúmeros processos fisiológicos e patológicos.

O fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, um componente minoritário da membrana plasmática, por ação da fosfolipase C, origina derivados que atuam como mensageiros em um importante sistema de transdução de sinal, ativado por hormônios (Seção 19.3).

O colesterol é precursor de hormônios esteroides nas glândulas suprarrenais e gônadas, e de sais biliares no fígado (Seção 16.8). A maior parte (40 a 80%) do colesterol total de células de mamíferos está contida na membrana plasmática. A síntese de hormônios esteroides inicia-se na

membrana interna da mitocôndria, para onde deve ser transportado o colesterol da membrana plasmática; esse sistema de mobilização compreende uma série de etapas ainda mal caracterizadas, que envolvem várias organelas e proteínas carregadoras.

7.3.2 Glicoproteínas e glicolipídios

Os carboidratos presentes nas membranas de células eucarióticas ocorrem como cadeias de oligossacarídios 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 complexo de Golgi. Sua estrutura é muito variada, podendo conter dezenas de resíduos de açúcares, organizados em cadeias ramificadas. A grande diversidade de configuração dos oligossacarídios 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 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 oligossacarídios 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 também são glicoproteínas da membrana plasmática.

A "idade" das proteínas plasmáticas é indicada pela ausência de determinados açúcares na sua porção carboidrato. Proteínas com 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 oligossacarídio a uma proteína recém-sintetizada define 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, como ácidos graxos e esteroides, a moléculas pequenas como as dos gases oxigênio, CO_2 e nitrogênio, e à água.

A maioria das moléculas solúveis em água não pode atravessar livremente as membranas por simples difusão, devido ao caráter hidrofóbico da bicamada lipídica. Apesar disto, íons (H^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Cl^-) e metabólitos polares (lactato, açúcares, nucleotídios, aminoácidos) estão em fluxo constante através das membranas celulares, graças a sistemas de transporte, constituídos por proteínas integradas.

Um sistema de transporte são os *canais*, formados por proteínas com subunidades ou motivos em α-hélice ou folha β pregueada (Figura 7.3 a), que se organizam de modo a formar um tubo, preenchido por água, possibilitando a livre passagem de íons ou moléculas polares. A proteína que constitui o canal não se liga aos compostos transferidos.

Outras proteínas transportadoras, denominadas *permeases* ou *translocases* (Figura 7.3 b), ligam-se reversivelmente a um composto específico de um lado da membrana e transportam-no para o outro. O transporte por permeases obedece a uma cinética semelhante à descrita por

Michaelis-Menten para a reação enzimática (Seção 5.5): 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 específicas e inibidas competitivamente por análogos estruturais do metabólito que transportam e não competitivamente por reagentes que se ligam a grupos essenciais da proteína transportadora.

As permeases podem ser *cotransportadoras*, ou seja, o transporte de uma molécula depende da transferência simultânea de outra molécula, no mesmo sentido (*simporte*) ou no sentido oposto (*antiporte*); são *uniportadoras* quando transportam apenas um composto. Exemplos desses tipos de permeases são encontrados na descrição das vias metabólicas.

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 por ATP ou pelo gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons acoplado à cadeia de transporte de elétrons. Permeases que medeiam transporte ativo são a Na^+/K^+-ATPase (Seção 8.1.2) e as translocases que efetuam o transporte de metabólitos através da membrana interna da mitocôndria (Seção 11.10).

Determinadas permeases apresentam motivos estruturais irregulares, denominados *hélices descontínuas* (Figura 7.3 c), formadas por sequências α-*hélice-peptídio distendido*-α-*hélice*. Estas estruturas são encontradas nas *aquaporinas*, que formam canais para o transporte de água, em translocases antiportadoras de íons, como a *Ca^{2+}-ATPase*, e nas bombas de prótons do Complexo I da cadeia respiratória (Seção 11.2).

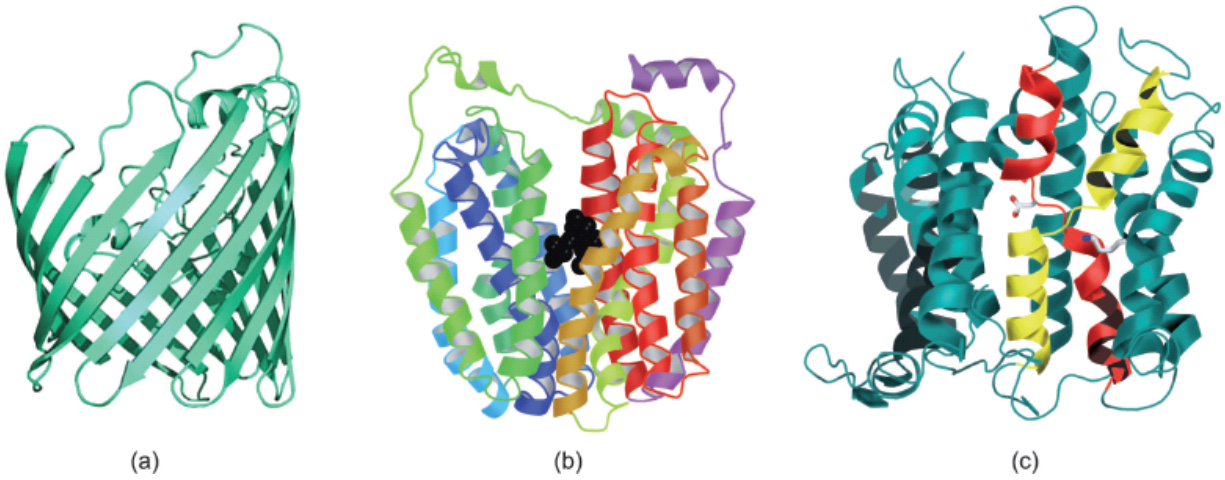


Figura 7.3 Sistemas transportadores de membrana. a) Canal formado por uma porina, com estrutura em β-barril. b) Lactose permease de *Escherichia coli*, formada por um feixe de 12 α-hélices transmembrana; um homólogo de lactose, representado por esferas pretas, liga-se à cavidade hidrofílica interna. c) Translocase antiportadora, constituída por várias α-hélices e duas hélices descontínuas, representadas em *vermelho* e *amarelo*.

7.4.2 Transporte de macromoléculas e partículas: endocitose e exocitose

O transporte de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídios) 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 *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 seletivo, 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 (Seção 6.2.7), na forma esterificada.

O transporte por endocitose (Figura 7.4) inicia-se com a adsorção das LDL às células, graças à ligação de sua apolipoproteína a um receptor específico, presente 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 *endossomos*, organelas 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. Aquela que contém as LDL funde-se com um lisossomo, onde seus componentes são hidrolisados: as apolipoproteínas originam aminoácidos e os ésteres de colesterol produzem 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. O colesterol que excede as necessidades celulares é reesterificado para armazenamento como gotículas intracelulares.

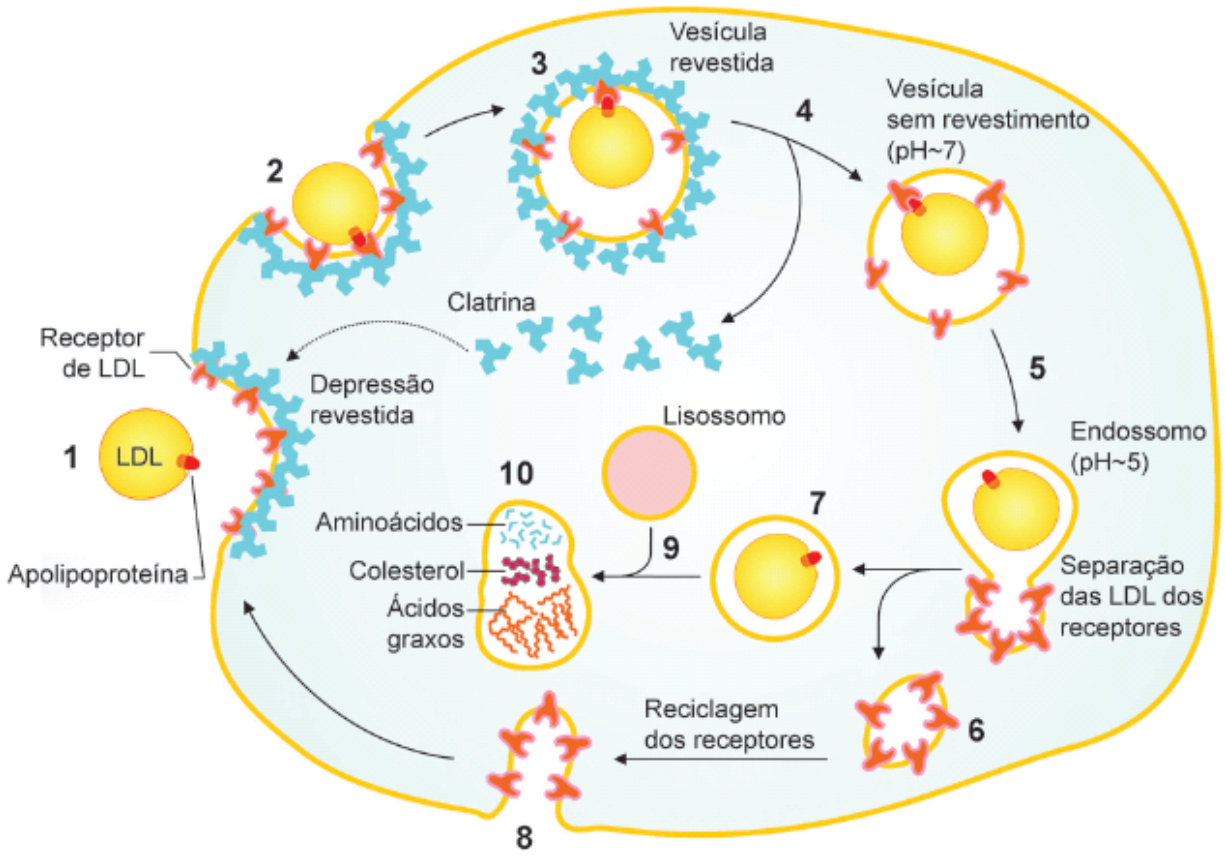


Figura 7.4 Transporte de colesterol das LDL plasmáticas para dentro da célula por endocitose adsortiva. LDL liga-se, por sua apolipoproteína, a seu receptor da membrana plasmática, em uma depressão revestida (1). Por invaginação (2), a depressão forma uma vesícula revestida (3) que, em seguida, perde o invólucro de clatrina (4). A vesícula resultante funde-se com um endossomo (5), cujo pH ácido determina a dissociação entre as LDL e os 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 apolipoproteínas, e ácidos graxos e colesterol, a partir dos ésteres de colesterol (10).

As membranas de muitas bactérias contêm estruturas extremamente complexas capazes de transportar macromoléculas. Esses nanomotores

acoplam a energia química fornecida pelo ATP ao trabalho mecânico, como acontece na *transformação gênica*. A transformação é um processo natural de aquisição de informação genética a partir de DNA exógeno, no qual DNA do meio externo é introduzido no citoplasma da célula bacteriana. A transformação permite a transferência de informação genética entre células bacterianas, sendo responsável pela disseminação de determinadas características como a resistência a antibióticos.

Bibliografia

Alberts B *et al*.: *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Publishing, 2002.

Cabezon E *et al*.: Membrane-associated nanomotors for macromolecular transport. *Curr Opin Biotechnol* **23** (4): 537-544, 2012.

Lingwood, D, Simons K: Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327** (5961): 46-50, 2010.

Lodish H *et al*.: *Molecular Cell Biology*, 5th ed. W. H. Freeman & Company, 2004.

Maturu P *et al*.: Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na^+/K^+-ATPase activity in chronic alcoholics. *Mol Cell Biochem* **339**: 35-42, 2010.

Ohvo-Rekilä H *et al*.: Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* **41**: 66-97, 2002.

Singer SJ: Some early history of membrane molecular biology. *Annu Rev Physiol* **66**: 1-27, 2004.

Singer SJ, Nicolson GL: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175** (23): 720-731, 1972.

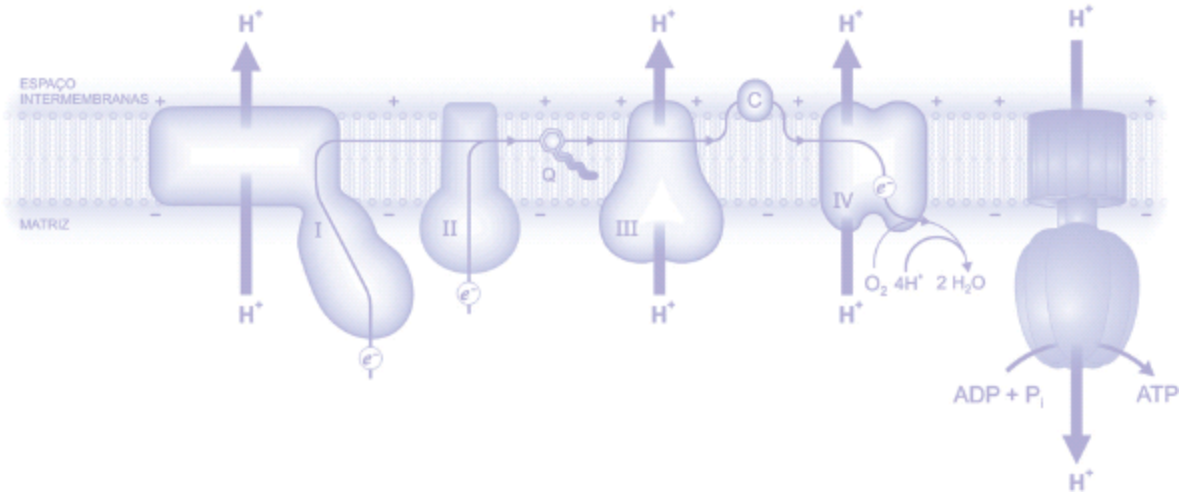
Steck TL, Lange Y: Cell cholesterol homeostasis: mediation by active cholesterol. *Trends Cell Biol* **20**: 680-687, 2010.

OceanofPDF.com

Parte 3

Metabolismo: Vias Principais

8 Introdução ao Metabolismo
9 Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA
10 Ciclo de Krebs
11 Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa
12 Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato
13 Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose
14 Gliconeogênese
15 Fotossíntese
16 Metabolismo de Lipídios
17 Metabolismo de Aminoácidos
18 Nutrição — Os Substratos das Vias Metabólicas



OceanofPDF.com

8 Introdução ao Metabolismo

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

Para manterem-se vivos e desempenharem as funções biológicas, os organismos necessitam continuamente de energia. Qualquer organismo vivo constitui, no seu conjunto, um sistema estável de reações químicas e de processos físico-químicos mantidos afastados do equilíbrio — esta condição contraria a tendência termodinâmica 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 pode ser comparado ao conteúdo líquido de um reservatório, 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* (Capítulo 15), 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, quimio*lito*tróficos. A maioria dos microrganismos e todos os animais são, entretanto, quimio*organo*tróficos, por necessitarem oxidar substâncias orgânicas.

As substâncias oxidáveis utilizadas pelos seres humanos estão presentes nos seus alimentos, sob a forma de carboidratos, lipídios e proteínas. Há também reservas endógenas de carboidratos e lipídios, que são oxidadas nos intervalos 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 à forma reduzida (Figura 8.1). A reoxidação das coenzimas é obtida pela transferência dos ($H^+ + e^-$) para o oxigênio molecular, que é então convertido a água (Seção 11.2). Parte da energia derivada desta oxidação é utilizada para sintetizar um composto rico em energia, a *adenosina trifosfato* (*ATP*), a partir de *adenosina difosfato* (*ADP*) e *fosfato inorgânico* (HPO_4^{2-} a pH 7,4). É a energia química do ATP a que será usada para promover os processos biológicos que consomem energia. Em resumo, para que a energia derivada da oxidação dos alimentos possa ser usada pelas células, ela deve estar sob a forma de ATP.

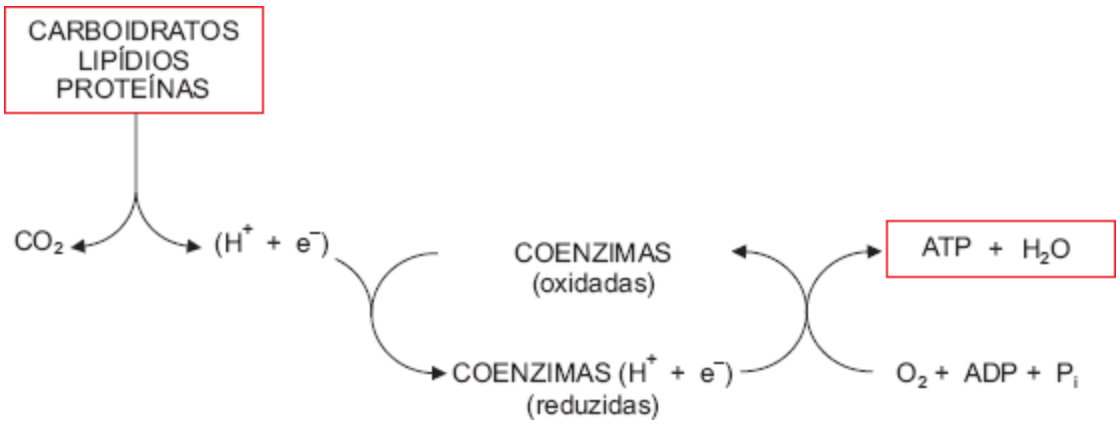


Figura 8.1 Esquema simplificado do processo de obtenção de energia em organismos quimiorganotróficos: a oxidação de nutrientes leva à redução de coenzimas que são oxidadas por O_2, produzindo ATP. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4).

O aproveitamento da energia do ATP é feito associando a remoção de seu grupo fosfato terminal aos processos que requerem energia (Figura 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), luminosos (bioluminescência) etc.

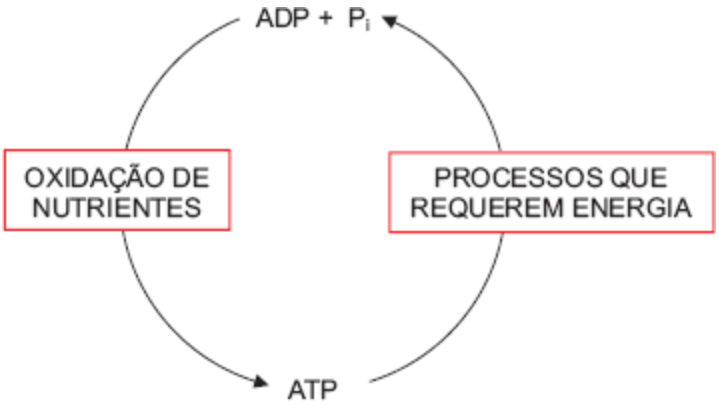


Figura 8.2 Os processos biológicos utilizam a energia do ATP, sintetizado por oxidação de nutrientes.

8.1 Funções do ATP

8.1.1 Função termodinâmica do ATP

O ATP é referido como a moeda energética universal dos seres vivos. A forma com que o ATP cumpre seu papel de fornecedor de energia ***não*** consiste na retirada de seu grupo fosfato terminal por simples hidrólise (Capítulo 4).

A reação de hidrólise tem um valor de $\Delta G^{o'}$ negativo, mostrando ser termodinamicamente viável, em condições padrão (concentração de todos os componentes iguais a 1 M).

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i + H^+ \qquad \Delta G^{o'} = -31\ kJ \cdot mol^{-1}$$

Entretanto, as concentrações usualmente encontradas nas células são muito distantes das condições padrão. Adicionalmente, a velocidade desta reação, não catalisada, é convenientemente baixa. Existem enzimas que catalisam a hidrólise de ATP, mas não indiscriminadamente: são as *ATPases*, que têm sua atividade rigorosamente controlada. Se assim não fosse, a ação destas enzimas tornaria qualquer célula inviável, já que este composto imprescindível, uma vez produzido, seria prontamente hidrolisado. Além disso, e mais importante, a hidrólise de ATP libera

apenas calor, uma forma de energia que não pode ser aproveitada pelas células.

O mecanismo de utilização da energia do ATP comumente envolve a transferência do grupo fosfato terminal para moléculas aceptoras (X):

$$ATP + X \longrightarrow X\text{–}\textcircled{P} + ADP \qquad \textcircled{P} = PO_3^{2-}$$

Esta transferência possibilita efetuar transformações importantes nas células, como a síntese de compostos fosforilados que não podem ser produzidos por reação com fosfato inorgânico. Seguem-se alguns exemplos para entender como a energia do ATP é aproveitada.

O metabolismo de glicose, em todas as células, inicia-se com a transformação deste açúcar em glicose 6-fosfato. A glicose 6-fosfato poderia ser obtida partir de glicose e fosfato:

$$\text{Glicose} + \text{Fosfato} \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \qquad \Delta G^{o\prime} = +14\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Mas, o valor positivo do $\Delta G^{o\prime}$ desta reação informa sobre sua inviabilidade. O recurso biológico para contornar a dificuldade termodinâmica deste caminho é empregar *outra* reação, da qual participa o ATP, e que é termodinamicamente viável:

$$\text{Glicose} + ATP \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + ADP + H^+ \qquad \Delta G^{o\prime} = -17\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Costuma-se dizer, com pouco rigor, que o ATP "doa" energia para tornar possíveis reações energeticamente inviáveis. Ora, se a reação é energeticamente inviável ela não ocorre. Não há forma de o ATP "doar" energia para a reação ocorrer, por duas razões: (1) a hidrólise do ATP libera energia como calor, que não pode ser aproveitado e, (2) se o ATP participar, a reação será outra, com valor próprio de $\Delta G^{o\prime}$. Como mostra o exemplo anterior, o ATP não "doa" energia, ele apenas participa de uma reação exequível.

Outro exemplo são as sínteses. Suponha-se a reação de condensação de A e B, com valor de $\Delta G^{o\prime}$ desfavorável para a síntese:

$$A + B \longrightarrow A\text{–}B \qquad \Delta G^{o\prime} > 0 \qquad (1)$$

Este problema é contornado pela participação do ATP. Um caminho possível é a transferência do grupo fosfato terminal do ATP para o composto A, reação esta termodinamicamente viável:

$$\text{A} + \text{ATP} \longrightarrow \text{A-fosfato} + \text{ADP} \qquad \Delta G^{o\prime} < 0 \qquad (2)$$

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

$$\text{A-fosfato} + \text{B} \longrightarrow \text{A–B} + \text{Fosfato} \qquad \Delta G^{o\prime} < 0 \qquad (3)$$

O resultado da soma das reações (2) e (3) é:

$$\text{A} + \text{B} + \text{ATP} \longrightarrow \text{A–B} + \text{ADP} + \text{Fosfato} \qquad \Delta G^{o\prime} < 0 \qquad (4)$$

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 e fosfato “doou” energia para o processo. Como já foi enfatizado, tal conversão liberaria energia apenas como calor. O que de fato ocorreu foram as reações intermediárias (2) e (3) que resultaram no produto desejado.

Muitos processos celulares estão incluídos neste modelo. A hidrólise de proteínas, liberando seus aminoácidos, por exemplo, é termodinamicamente viável e processa-se rotineiramente no trato digestório, catalisada por enzimas específicas. Do ponto de vista termodinâmico, a explicação é simples: o conteúdo energético dos reagentes (proteína 1 água) é maior do que o conteúdo energético do conjunto de aminoácidos produzidos. Ou seja, o estado inicial tem um conteúdo energético maior do que o do estado final e o $\Delta G^{o\prime}$ da transformação é negativo.

$$\text{Proteína} + n\,\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{enzimas}} n\,\text{Aminoácidos} \qquad \Delta G^{o\prime} < 0$$

Naturalmente, a síntese de proteínas não ocorre no sentido oposto ao da reação apresentada (Seção 2.3). O processo é muito mais complexo e requer

a participação de ribossomos, ácidos ribonucleicos, proteínas, enzimas e do ATP, que torna a síntese termodinamicamente possível:

$$n\ \text{Aminoácidos} + n\ \text{ATP} \xrightarrow{\text{aparato de síntese proteica}} \text{Proteína} + n\ \text{ADP} + n\ H_2O \qquad \Delta G^{o} < 0$$

Com esta equação geral, teórica, fica preservado o princípio termodinâmico de espontaneidade, porque o conteúdo energético do primeiro membro é maior do que o do segundo, revelando o valor negativo de $\Delta G^{o'}$. O mesmo mecanismo é verificado em qualquer outra síntese (de lipídios, glicogênio etc.).

8.1.2 Outras funções do ATP

Além de viabilizar transformações que não ocorreriam sem a sua participação, o ATP atua nos seguintes processos:

I. Modulação da atividade de enzimas, que pode processar-se de duas maneiras:
   1. Interação com enzimas alostéricas (Seção 19.2.1), por meio de ligações *não covalentes*, modificando sua conformação, de modo a diminuir sua atividade e, consequentemente, a velocidade das reações por elas catalisadas. Sendo ligações reversíveis, a fração de enzimas afetadas depende da concentração celular de ATP. Trata-se de um importante recurso para a regulação de vias metabólicas, possibilitando restringir a velocidade de utilização de substratos por vias oxidativas quando a carga energética celular é alta, derivando-os para vias de síntese de polímeros de armazenamento.
   2. Fosforilação de enzimas por transferência do grupo fosfato terminal (γ) do ATP: neste caso há formação de uma ligação *covalente*, éster fosfórico, entre uma hidroxila da cadeia lateral de aminoácidos da enzima e o grupo fosfato do ATP. A reação é irreversível e catalisada por enzimas denominadas *proteína quinases*[1]. A fosforilação altera a estrutura espacial da proteína, modificando a sua atividade, mas as alterações

não são definitivas. Para devolver a enzima ao estado original, há dois casos a serem destacados:

2a. o grupo fosfato é removido por hidrólise, catalisada por *proteína fosfatases*, liberando ADP e fosfato e restaurando a conformação anterior da enzima.

2b. a própria proteína aceptora tem atividade enzimática de ATPase, quer dizer, é capaz de catalisar a hidrólise do ATP. Esta é uma situação comum a proteínas formadoras de canais de membranas, como é o caso da bomba de sódio e potássio (Na^+/K^+-ATPase), responsável pelo transporte destes íons através da membrana plasmática. A ligação do ATP à proteína provoca mudança de sua conformação; em virtude de sua atividade ATPásica, esta mudança é temporária, e a alternância entre as duas conformações da proteína é a responsável pelo transporte dos íons. Processo análogo ocorre na contração muscular, em que a ligação do ATP à miosina é seguida de sua hidrólise pela capacidade ATPásica da proteína.

II. Neurotransmissão — O ATP, embora tenha localização predominantemente intracelular, pode ser liberado de neurônios, denominados *purinérgicos*, e de células não neuronais, sob condições fisiológicas ou quando há lise celular por injúria mecânica, estresse oxidativo etc. Uma vez no espaço extracelular, o ATP pode ligar-se a receptores da superfície celular, os *receptores purinérgicos*, e atuar como neurotransmissor ou modulador da proliferação e diferenciação celulares.

Existem diversos tipos de receptores purinérgicos, que são específicos para outros nucleotídios purínicos (ADP, UTP etc.), e também para nucleosídios como a adenosina (Seção 19.4). Os receptores purinérgicos são amplamente distribuídos em células e órgãos de mamíferos e medeiam alterações funcionais diversas. Um exemplo é a agregação de plaquetas induzida pela interação de alguns nucleotídios purínicos com receptores purinérgicos dessas células. A aplicação terapêutica decorrente desta descoberta foi o desenvolvimento de antagonistas desses nucleotídios, que bloqueiam os receptores purinérgicos, impedindo a adesão de plaquetas.

São agentes antiplaquetários, como clopidogrel, ticagrelor etc., empregados no tratamento de tromboembolismos (infarto do miocárdio) e outros distúrbios da coagulação sanguínea.

8.2 Macronutrientes

Os compostos químicos dos organismos originam-se de moléculas precursoras do meio ambiente

Até aqui foi enfatizada a dependência dos organismos quanto à obtenção de energia, proveniente da luz ou de substâncias oxidáveis. 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, ela permanece. De fato, 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 conseguida 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 contém substâncias que lhe são características e só ele mesmo pode produzir, o que deve ser obtido do meio são os precursores destas substâncias. 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, como bactérias e fungos, a etapa de separação dos componentes processa-se exteriormente, por ação de enzimas hidrolíticas secretadas para o meio ambiente; para os animais superiores, esta etapa é cumprida pela digestão. Em ambos os casos, as substâncias complexas são

resolvidas até seus elementos constituintes que são então absorvidos e distribuídos para as células do organismo; intracelularmente, dá-se a reorganização dos elementos precursores segundo o padrão peculiar do ser vivo em questão.

Todo esse processo de obtenção, armazenamento e utilização de energia, e a transformação de precursores conseguidos do meio em compostos característicos de cada organismo, é efetuado por uma intrincada rede de milhares de reações químicas e constitui o *metabolismo*. As reações que compõem o metabolismo organizam-se em *vias metabólicas*, que são sequências definidas de reações enzimáticas específicas. As vias metabólicas funcionam de modo inter-relacionado e extremamente coordenado. No próximo capítulo, será analisada uma primeira via metabólica, a *glicólise* ou *via glicolítica*.

Os mamíferos não produzem proteínas a partir de carboidratos ou lipídios

Três tipos de compostos orgânicos — carboidratos, lipídios e proteínas — constituem, em massa, os componentes mais importantes dos alimentos; por esta razão são chamados *macronutrientes*. No processo digestivo, os macronutrientes são degradados até suas unidades constituintes, as principais sendo:

Carboidratos ——→ Glicose
Lipídios ——→ Ácidos graxos
Proteínas ——→ Aminoácidos

Ao longo dos próximos capítulos, será descrito o metabolismo destes compostos. Antes disto, é necessário fazer algumas considerações de ordem geral, que permitirão uma visão integrada das vias metabólicas a serem analisadas posteriormente.

Nesta abordagem preliminar, pretende-se responder às seguintes perguntas, relativas aos macronutrientes:

1. Já que o organismo contém carboidratos, lipídios e proteínas, é obrigatória a ingestão dos três tipos de macronutrientes?
2. Ou algum deles pode ser sintetizado a partir de outro?

3. Se este for o caso, quais os tipos (ou qual o tipo) de macronutrientes imprescindíveis na dieta?

Supondo que indivíduos recebessem em sua dieta ***apenas*** carboidratos, ***ou*** lipídios, ***ou*** proteínas (sem outras restrições dietéticas), quais deles sobreviveriam? A resolução destas questões pode ser obtida pela análise das possibilidades de interconversão dos diferentes tipos de nutrientes. Para tanto está apresentado na Figura 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 (Seção 9.2), ou seja, à coenzima A ligada ao grupo acetila. Estão indicados 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 pelos 10 aminoácidos mostrados na Figura 8.3).

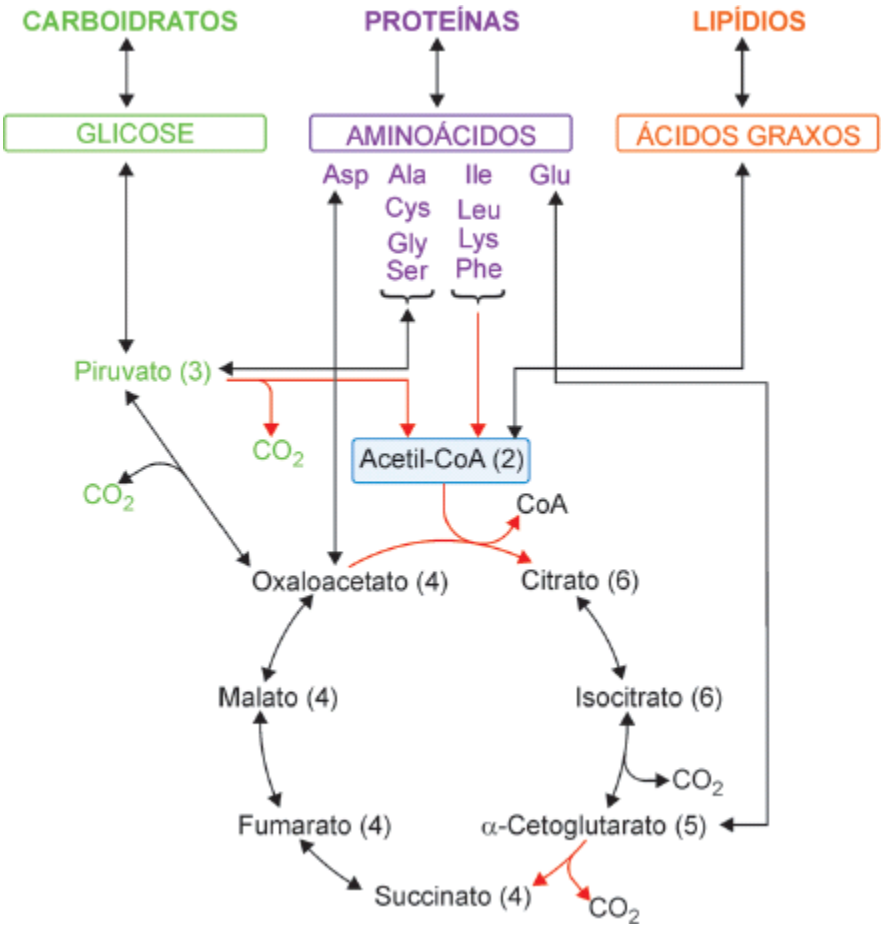


Figura 8.3 Mapa simplificado de parte do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. As setas indicam, em alguns casos, reações e, em outros, etapas de vias metabólicas compostas por várias reações. As reações ou etapas irreversíveis estão assinaladas em vermelho.

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

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

As resoluções são conseguidas com as informações contidas na Figura 8.3, na qual deve-se observar que:

- A maioria das reações é reversível, mas algumas são irreversíveis, a saber:

  Piruvato → Acetil-CoA
  Acetil-CoA + Oxaloacetato → Citrato + CoA
  α-Cetoglutarato → Succinato
  Ile, Leu, Lys, Phe → Acetil-CoA

- As degradações de carboidratos, lipídios e proteínas convergem para um composto comum, a acetil-CoA.

Pode-se, então, construir a tabela a seguir, mostrando as etapas percorridas em cada conversão possível.

Conversões	Possível?	Etapas
a. Proteína → Glicose	Sim	1. Ala, Cys, Ser, Gly → Piruvato → Glicose2. Asp → Oxaloacetato → Piruvato → Glicose
b. Proteína → Ácido graxo	Sim	1. Ala, Cys, Ser, Gly → Piruvato → Acetil-CoA → Ácido graxo2. 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:

d. Glicose → Proteína. Na Figura 8.3 vê-se que a glicose pode originar apenas alguns aminoácidos (Glicose → Piruvato → Ala, Cys, Gly, Ser), não havendo via possível para a obtenção de Ile,

Leu, Lys e Phe. Na ausência do conjunto completo de aminoácidos, a síntese de proteínas é inviável.

e. Ácido graxo → Glicose. Igualmente impossível é a síntese de glicose a partir de ácido graxo. Na sua degradação, os ácidos graxos são convertidos a acetil-CoA, com *dois* átomos de carbono; este composto condensa-se com oxaloacetato (*quatro* carbonos), formando um composto de *seis* carbonos, o citrato, e liberando a coenzima A (CoA). Por reações subsequentes, o citrato pode regenerar o oxaloacetato, mas deve-se notar que, nestas reações, há produção de *duas* moléculas de CO_2. Esta sequência de reações pode ser assim resumida:

$$\text{Acetil-CoA (2)} + \text{Oxaloacetato (4)} \longrightarrow \text{Citrato (6)} + \text{CoA}$$

$$\text{Citrato (6)} \longrightarrow \text{Oxaloacetato (4)} + 2\,CO_2$$

Somando-se as duas reações, obtém-se:

$$\text{Acetil-CoA (2)} \rightarrow 2\,Co_2 + \text{CoA}$$

Verifica-se, então, que os dois carbonos do grupo acetila da acetil-CoA são eliminados sob a forma de CO_2 e que não pode haver síntese líquida de oxaloacetato (e, portanto, de glicose) a partir de acetil-CoA.

f. Ácido graxo → Proteína. Por razões análogas às apontadas no item anterior, 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[2]
Carboidratos	Ácidos graxos[2]

Lipídios	—

A pergunta apresentada anteriormente pode ser agora respondida: os indivíduos que recebessem apenas *proteínas* como macronutriente na dieta seriam os únicos a sobreviver.

Apesar do mapa metabólico utilizado ser bastante simplificado, as conclusões dele derivadas são corretas e serão ratificadas ao longo do estudo do metabolismo. Fica 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 com a antecipação de uma informação adicional: os organismos têm reservas de carboidratos e lipídios, mas não de proteínas. Uma exceção são as sementes de alguns vegetais (trigo, centeio, cevada etc.) que contêm alto teor de uma proteína, o glúten.

8.3 Estudo do metabolismo

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

No presente texto, primeiramente serão analisadas as vias metabólicas principais, que, juntamente com esta *Introdução ao Metabolismo* (Capítulo 8), compõem a *Parte 3 | Metabolismo: Vias Principais* (Capítulos 8 a 18). Na *Parte 4 | Regulação do Metabolismo* (Capítulos 19 a 22), serão apresentados inicialmente os mecanismos de que os seres vivos dispõem para controlar o seu metabolismo (Capítulo 19); em seguida, a regulação de cada via metabólica (Capítulo 20) e, por último, a regulação metabólica global, integrada, frente a diferentes situações fisiológicas (Capítulos 21 e 22).

O estudo das vias metabólicas ao longo deste livro adota um padrão de análise destinado a ressaltar os aspectos mais importantes das vias. Assim, em cada caso verifica-se quais são os(as):

1. substratos da via

2. seus produtos
3. enzimas que catalisam as reações
4. compostos necessários para manter a via em funcionamento
5. compostos indispensáveis para que a via possa ser iniciada
6. passos irreversíveis
7. mecanismos de regulação da via.

Da resolução dos itens 1 e 2 deriva-se a *equação geral* da via metabólica. Ela é a equação balanceada, que soma todas as reações que compõem a via e, apesar de não traduzir uma reação química, mostra a transformação geral efetuada pela via em estudo (ver um primeiro exemplo, a equação geral da glicólise, à Seção 9.1).

Adicionalmente, a equação geral mostra quais são os compostos necessários para manter a via em funcionamento (item 4), estando presentes as enzimas que catalisam as reações da via (item 3).

Já para identificar os compostos imprescindíveis para que a via se inicie (item 5), deve-se proceder a um estudo minucioso de todas as etapas que compõem a via.

A análise do item 6 estabelece o sentido em que a via ocorre e, finalmente, a resposta ao item 7 permite entender como ela funciona em diferentes condições fisiológicas.

Bibliografia

Alberty RA: *Thermodynamics of Biochemical Reactions*. Wiley-Interscience, 2003.

Blow N: Metabolomics: Biochemistry's new look. *Nature* **455** (7213): 697-700, 2008.

Friedrich CG *et al*.: Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl Environ Microbiol* **67** (7), 2873-2882, 2001.

Idzko M *et al*.: Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* **509**: 310-317, 2014.

Nawarskas JJ, Clark SM: Ticagrelor: a novel reversible oral antiplatelet agent. *Cardiol Rev* **19** (2): 95-100, 2011.

Satchell D: Purinergic nerves and purinoceptors: early perspectives. *J Autonom Nerv Syst* **81**: 212-217, 2000.

Smith E, Morowitz HJ: Universality in intermediary metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **101** (36):13168-73, 2004.

[1] *Quinases* são enzimas que catalisam a transferência de um grupo fosfato de um composto de alta energia, em geral ATP, para uma molécula aceptora.

[2] Deve-se ressaltar que os ácidos graxos essenciais para os seres humanos (Seção 16.6), não podem ser sintetizados a partir de proteínas ou carboidratos, o que, todavia, não invalida as considerações de caráter geral aqui expostas.

OceanofPDF.com

9 Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA

9.1 Oxidação de glicose

A glicose é, quantitativamente, o principal substrato oxidável para a maioria dos organismos. Sua utilização como fonte de energia pode ser considerada universal e, dos microrganismos aos seres humanos, quase todas as células são capazes de atender a suas demandas energéticas apenas a partir deste açúcar. Para algumas células e órgãos, como hemácias e cérebro, a glicose é imprescindível, por ser o único substrato a partir do qual podem sintetizar ATP.

Apesar de a dieta humana conter pouca glicose livre, quantidades consideráveis deste açúcar são ingeridas sob a forma de amido, sacarose e lactose. Nas dietas mais comuns, 55% dos carboidratos aparecem como amido, 35% como sacarose, 5% como lactose e 5% como glicose e outros monossacarídios. O amido é digerido no trato digestório até glicose, o açúcar que será afinal absorvido e distribuído para os tecidos. A digestão de sacarose e lactose origina, além de glicose, frutose e galactose. A parte inicial da oxidação da glicose está descrita nas seções seguintes; o metabolismo dos outros açúcares encontra-se na Seção 13.3.

A oxidação de glicose a piruvato permite obter ATP; a oxidação do piruvato a CO_2 aumenta muito a produção de ATP

A oxidação total da glicose é um processo exergônico, que libera uma quantidade de energia equivalente a 2.870 kJ · mol^{-1}. Nas células, esta

transformação é estritamente acoplada à síntese de ATP a partir de ADP e P_i, um processo endergônico ($\Delta G^{o\prime} = +31\ kJ \cdot mol^{-1}$). A glicose constitui, então, uma fonte de energia livre, que pode ser conservada como ATP, a principal forma de energia utilizável pelos seres vivos.

A oxidação anaeróbia de glicose a piruvato rende apenas uma pequena parcela — menos de 10% — do total de ATP obtido pela oxidação aeróbia de glicose. Ainda assim, os organismos e as células anaeróbios conseguem suprir, com este processo, toda a sua demanda energética. Nas células aeróbias, o piruvato pode ser totalmente oxidado, trazendo um enorme ganho na formação de ATP.

Um esquema geral da oxidação completa de glicose, até CO_2, está mostrado na Figura 9.1. A etapa inicial, que se processa no citosol, consiste na conversão de uma molécula de glicose (C_6) a duas moléculas de piruvato ($2\ C_3$) por meio de uma sequência de reações denominada *glicólise*, uma via metabólica encontrada em praticamente todos os seres vivos. Seus produtos são, além das duas moléculas de piruvato, ATP e prótons e elétrons ($H^+ + e^-$), que são recebidos por coenzimas.

A posterior oxidação do piruvato é feita no interior da mitocôndria, nas células que dispõem desta organela. Na mitocôndria, o piruvato sofre uma descarboxilação, transformando-se em um composto com dois carbonos (C_2). Este combina-se com um composto de quatro carbonos (C_4), formando um composto de seis carbonos (C_6). Por meio de uma sequência cíclica de reações (ciclo de Krebs), C_6 perde dois carbonos sob a forma de CO_2 e regenera C_4.

A oxidação do piruvato a CO_2 é acompanhada da produção de grande quantidade de prótons e elétrons ($H^+ + e^-$), sempre recebidos por coenzimas. Da oxidação destas coenzimas pelo oxigênio na cadeia respiratória (Seções 11.1 e 11.2), deriva-se a grande produção de ATP conseguida pela oxidação do piruvato e que perfaz cerca de 90% do total obtido com a oxidação completa da glicose.

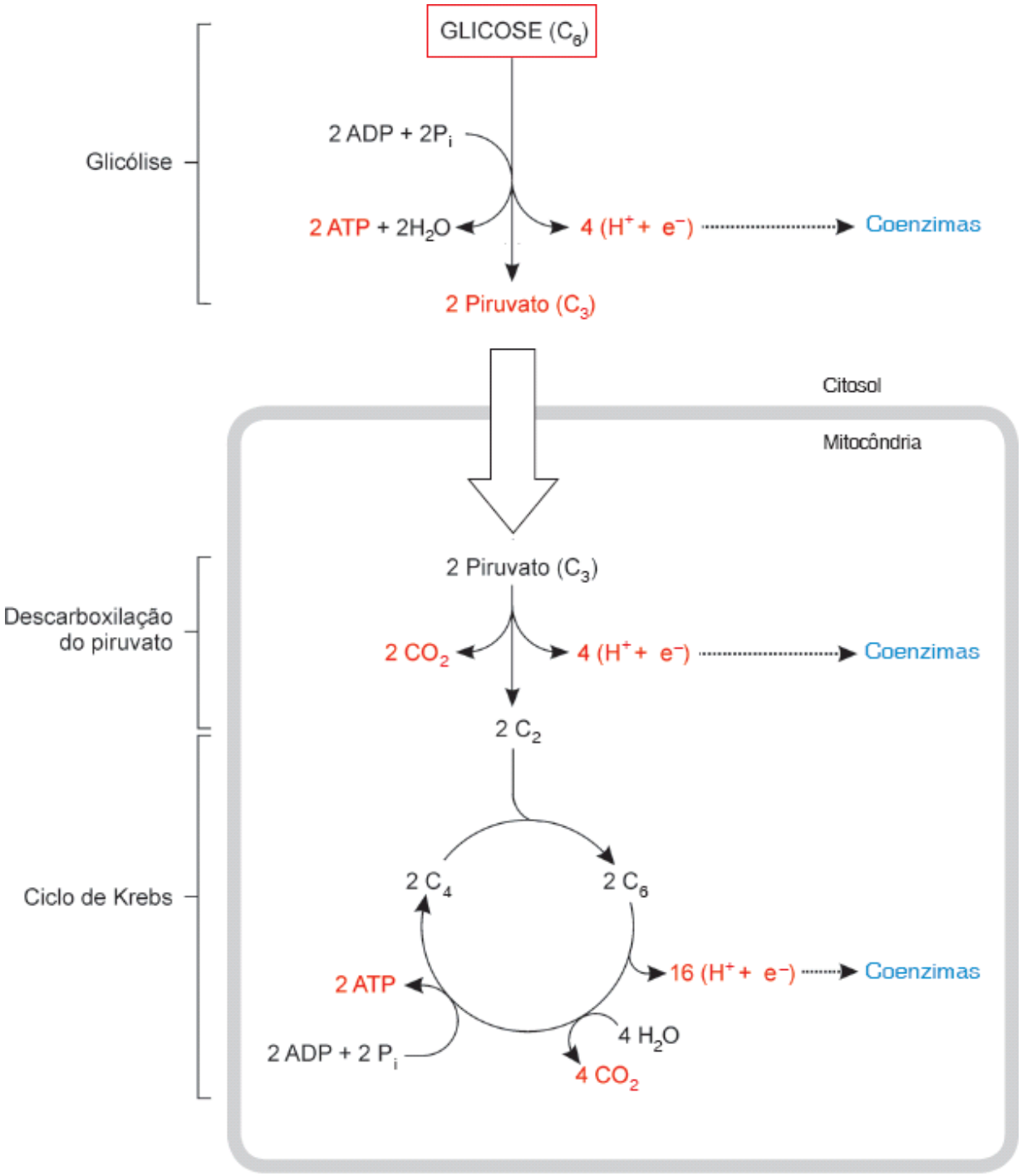


Figura 9.1 Esquema da oxidação completa da glicose. No citosol, a glicose é oxidada a duas moléculas de piruvato que, na mitocôndria, são oxidadas a CO_2. CO_2 e os outros produtos da oxidação da glicose estão destacados em vermelho. Os prótons e elétrons (H^+ + e^-) são incorporados por coenzimas.

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

Nas três etapas da oxidação da glicose — glicólise, descarboxilação do piruvato e 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*) (Figura 9.2), derivadas, respectivamente, das vitaminas nicotinamida (B_3) e riboflavina (B_2). FAD, diferentemente de NAD^+, liga-se covalentemente à molécula proteica, consistindo em um grupo prostético. As proteínas que contêm coenzimas provenientes de riboflavina (FAD ou FMN — Seção 11.2) são designadas *flavoproteínas*.

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. Já o FAD recebe dois elétrons e dois prótons, reduzindo-se a $FADH_2$ (Figura 9.3).

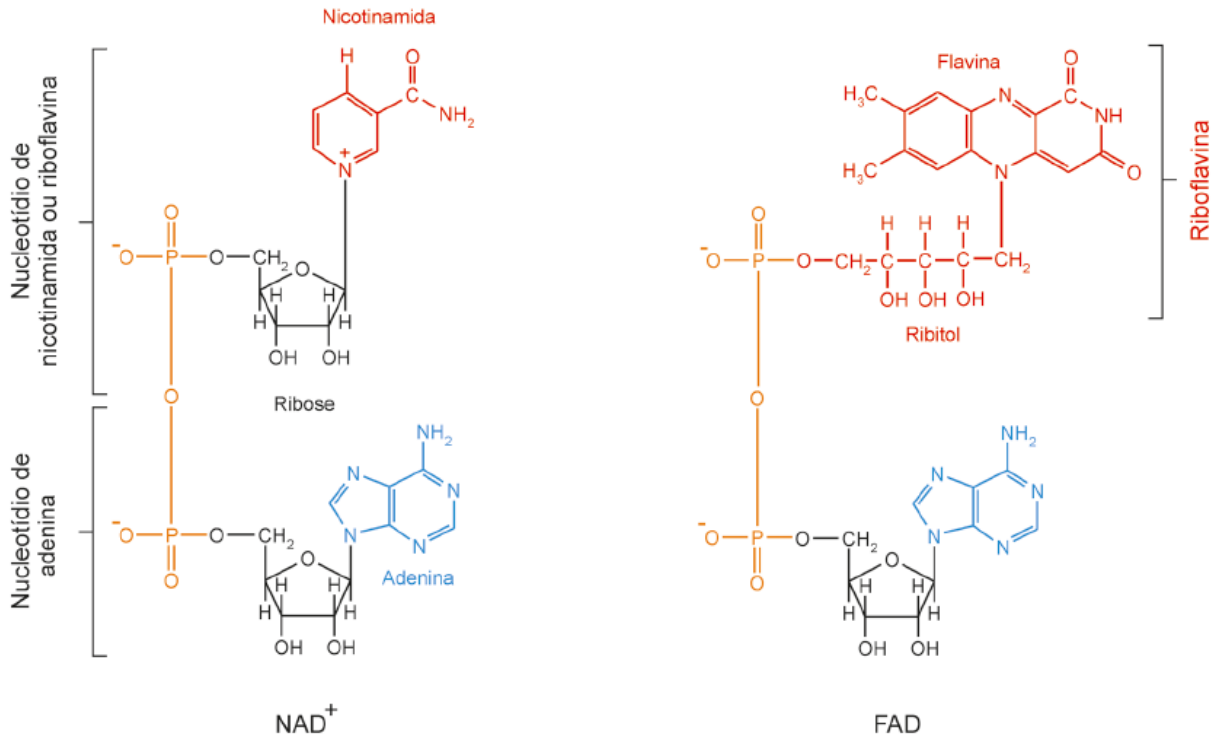


Figura 9.2 Estrutura das formas oxidadas da nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) e da flavina adenina dinucleotídio (FAD). Cada

nucleotídio é formado por uma base nitrogenada cíclica (nicotinamida, flavina ou adenina), uma ribose (ou o poliálcool ribitol) e um grupo fosfato. As vitaminas componentes das coenzimas estão destacadas em vermelho.

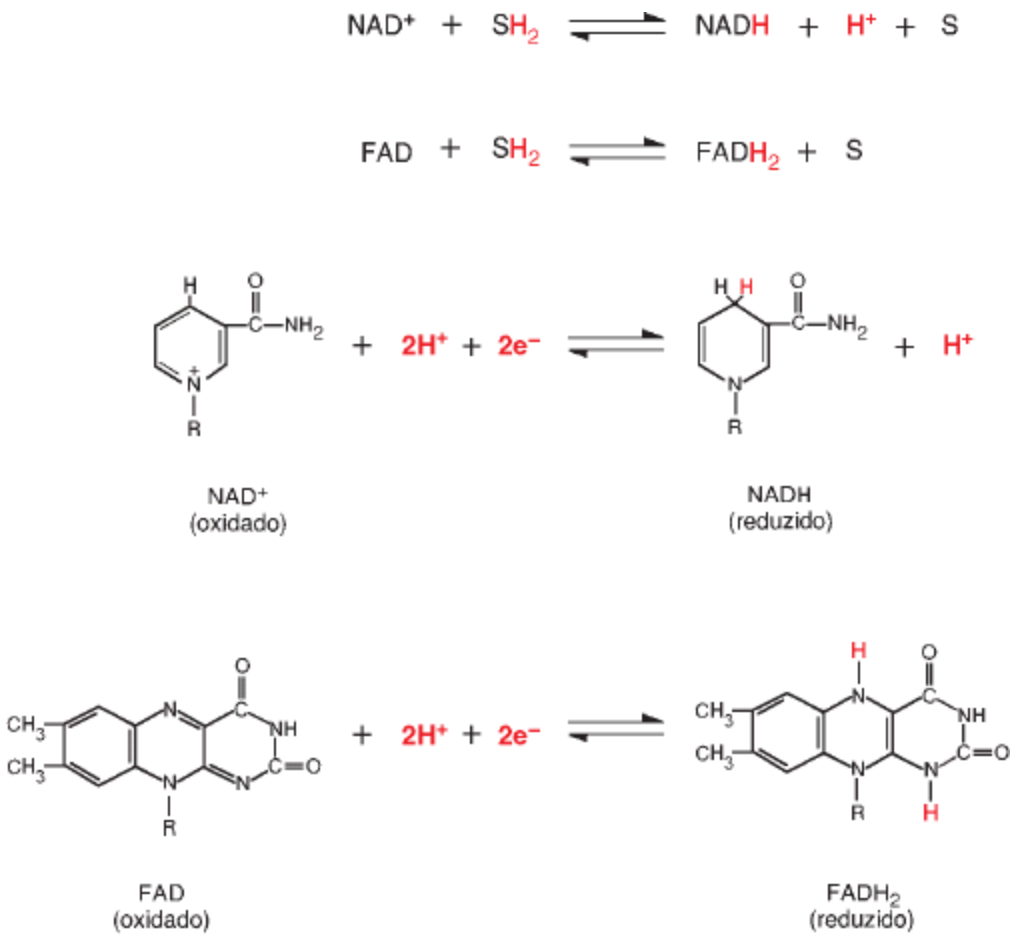


Figura 9.3 Modelos de reações de oxidação-redução catalisadas por desidrogenases que têm NAD^+ e FAD como coenzimas. O substrato reduzido (SH_2) é oxidado, perdendo dois átomos de hidrogênio, e as coenzimas convertem-se às suas formas reduzidas. O NAD^+ recebe dois elétrons e um próton, ficando o segundo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

9.2 Glicólise: oxidação de glicose a piruvato

A glicólise pode ser dividida em etapas correspondentes a seus eventos fundamentais (Figura 9.4):

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

As quatro etapas são cumpridas em 10 reações sequenciais que compõem a glicólise (Figura 9.5).

Etapa I. A primeira reação da glicólise é a conversão de glicose a glicose 6-fosfato. A glicose 6-fosfato, ao contrário da glicose, é incapaz de atravessar a membrana plasmática, o que garante a sua permanência dentro das células. A fosforilação da glicose a partir de glicose e fosfato inorgânico é uma reação inviável, por ter $\Delta G^{o\prime}$ positivo (Capítulo 4). Por isto, os organismos utilizam outra reação, que tem $\Delta G^{o\prime}$ negativo, e na qual o ATP é o doador de grupo fosfato. Esta reação é irreversível e catalisada por *hexoquinases*. As hexoquinases compõem uma família de enzimas ubíquas, que atuam sobre diversas hexoses. Nos tecidos de vertebrados, são encontradas quatro isoenzimas de hexoquinases, denominadas I a IV, que diferem por suas propriedades catalíticas, reguladoras, pela distribuição tecidual e localização intracelular. A hexoquinase IV é a isoenzima predominante em hepatócitos e células β do pâncreas; é comumente chamada de *glicoquinase*, embora não seja específica para glicose, podendo atuar com menor afinidade sobre outras hexoses.

Segue-se a isomerização da glicose 6-fosfato a frutose 6-fosfato, por ação da *fosfoglicoisomerase*, e nova fosforilação, análoga à anterior, também utilizando ATP e também irreversível, catalisada pela *fosfofrutoquinase 1* (*6-fosfofruto-1-quinase*). Forma-se, então, uma hexose com dois grupos fosfato: a frutose 1,6-bisfosfato[1].

Etapa II. A frutose 1,6-bisfosfato é clivada em duas trioses isômeras, di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, por ação da *aldolase*. O gliceraldeído 3-fosfato é o substrato da próxima enzima da via glicolítica, mas as duas trioses fosforiladas são interconvertidas por ação da *triose fosfato isomerase*. A conversão de di-hidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato possibilita que *uma* molécula de glicose (C_6) seja convertida em *duas* moléculas de gliceraldeído 3-fosfato (2 × C_3). *Da reação da triose fosfato isomerase em diante, a via tem todos os seus intermediários duplicados* e todos os carbonos da glicose são convertidos em piruvato.

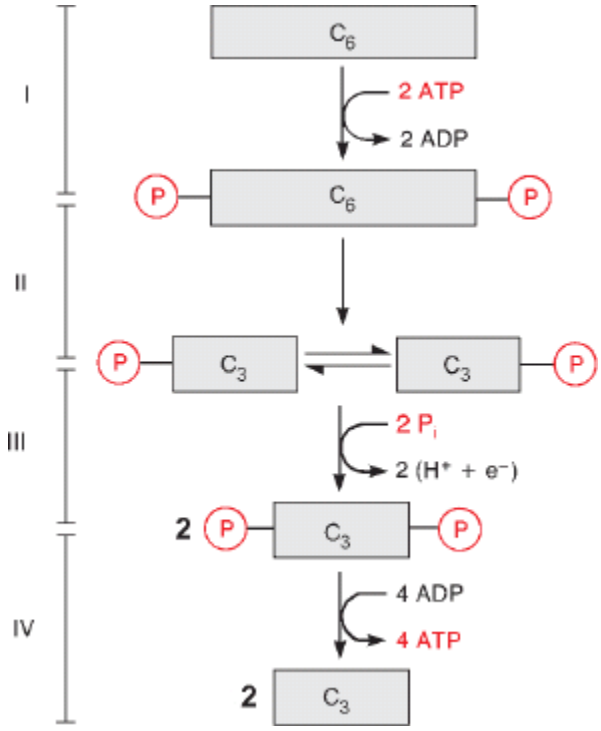


Figura 9.4 Etapas fundamentais da glicólise. O símbolo Ⓟ representa o grupo PO_3^{2-}, C_6 indica hexose e C_3, triose. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4).

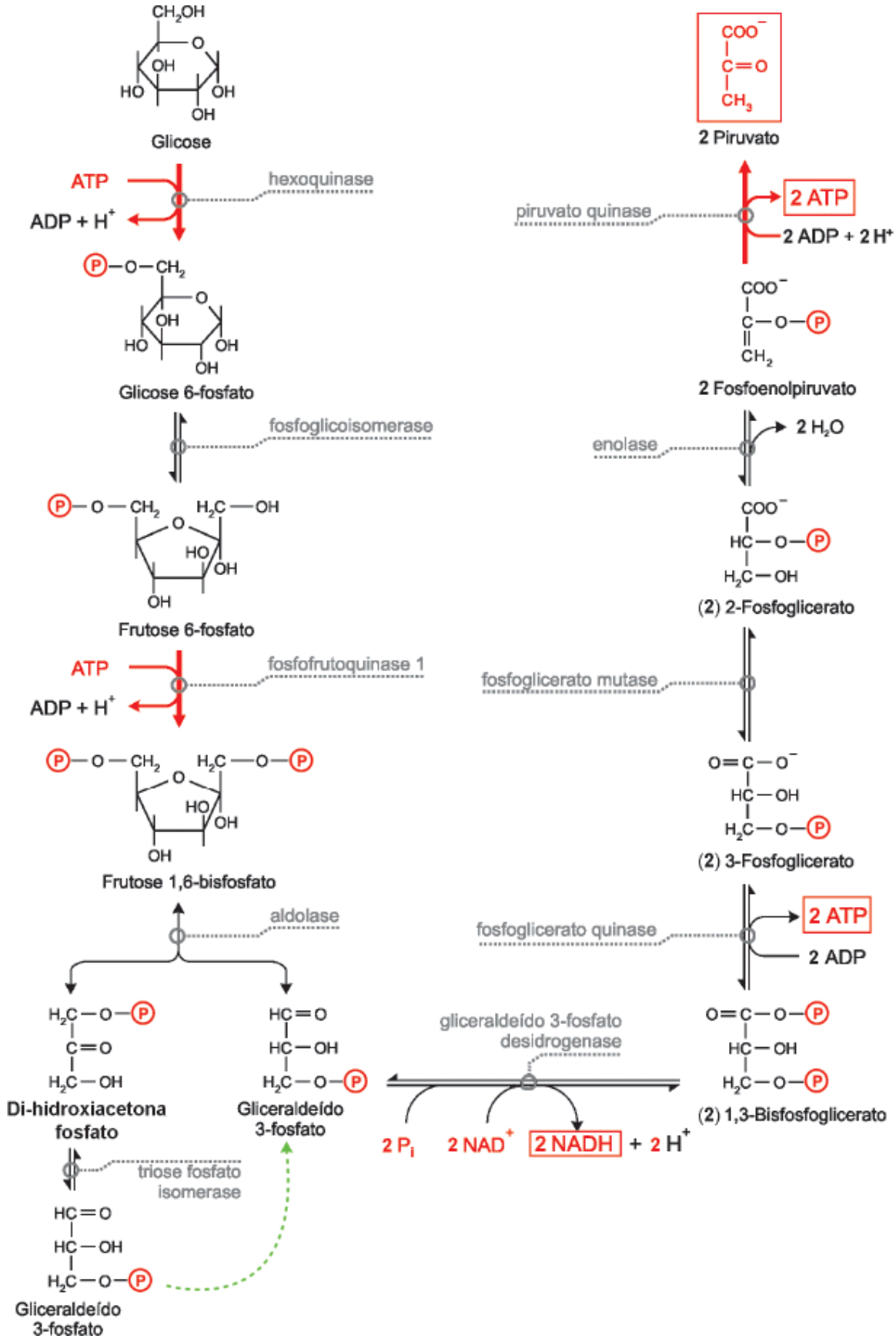
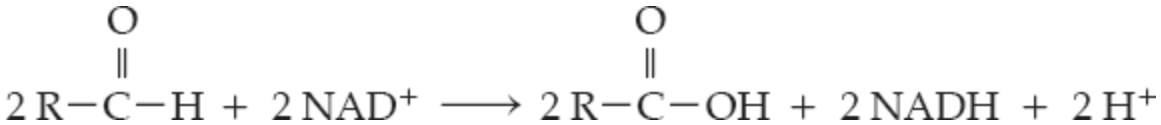

Glicose
ATP
ADP + H+
hexoquinase
Glicose 6-fosfato
fosfoglicoisomerase
Frutose 6-fosfato
ATP
ADP + H+
fosfofrutoquinase 1
Frutose 1,6-bisfosfato
aldolase
Di-hidroxiacetona fosfato
Gliceraldeído 3-fosfato
triose fosfato isomerase
Gliceraldeído 3-fosfato
2 Piruvato
piruvato quinase
2 ATP
2 ADP + 2 H+
2 Fosfoenolpiruvato
enolase
2 H2O
(2) 2-Fosfoglicerato
fosfoglicerato mutase
(2) 3-Fosfoglicerato
fosfoglicerato quinase
2 ATP
2 ADP
(2) 1,3-Bisfosfoglicerato
gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
2 Pi
2 NAD+
2 NADH + 2 H+

Figura 9.5 Via glicolítica. Deve-se notar que a di-hidroxiacetona fosfato converte-se a gliceraldeído 3-fosfato, que prossegue a via glicolítica (seta verde tracejada). A partir de uma molécula de glicose formam-se ***duas*** moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, que originam ***2*** NADH, ***4*** ATP e ***2*** piruvato. As setas vermelhas indicam reações irreversíveis.

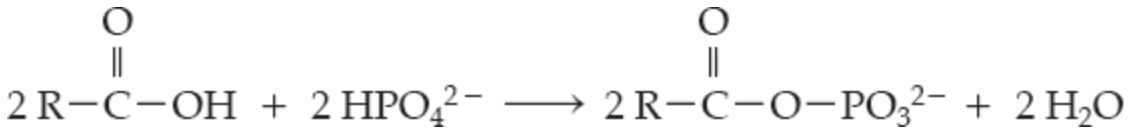
A clivagem de frutose 1,6-bisfosfato e a isomerização de di-hidroxiacetona fosfato em gliceraldeído 3-fosfato são reações com $\Delta G^{o\prime}$ positivo. Isto significa que, nos respectivos equilíbrios, predominam frutose 1,6-bisfosfato e di-hidroxiacetona fosfato, respectivamente. Apesar disto, as duas reações processam-se no sentido da formação de gliceraldeído 3-fosfato, porque a retirada contínua deste composto pelas reações subsequentes torna negativo o sinal de $\Delta G'$ das duas reações com $\Delta G^{o\prime}$ positivo.

Etapa III. As duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato obtidas por fosforilação à custa de 2 ATP são oxidadas e novamente fosforiladas, agora por fosfato inorgânico, formando duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato. Este composto é um anidrido misto de um ácido carboxílico e o ácido fosfórico, um anidrido carboxílico-fosfórico, que é um composto rico em energia (Tabela 4.4, Seção 4.1). Trata-se de uma reação de oxidação-redução/fosforilação complexa, catalisada pela *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase*. Para facilitar a compreensão, a reação pode ser desmembrada em duas reações parciais:

1. oxidação do aldeído (gliceraldeído 3-fosfato) a ácido carboxílico, com redução de NAD^+a NADH, que é termodinamicamente favorável:



2. ligação do ácido carboxílico com o ácido fosfórico (HPO_4^{2-} a pH 7,4), formando um anidrido carboxílico-fosfórico, que é endergônica:



Na realidade, as duas reações ocorrem acopladas, permitindo que parte da energia livre da reação de oxidação do aldeído seja conservada na formação do anidrido carboxílico-fosfórico. O acoplamento é efetuado por um intermediário tioéster, rico em energia, resultante da oxidação do aldeído, que fica ligado à enzima. O mecanismo de ação da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase está esquematizado na Figura 9.6. O gliceraldeído 3-fosfato reage com o grupo sulfidrila de um resíduo de cisteína do centro ativo da enzima (reação 1 na figura), formando-se um tio-hemiacetal[2]; segue-se a oxidação do tio-hemiacetal e a redução de um NAD^+ ligado à enzima, formando o intermediário tioéster (reação 2); o NADH ligado à enzima é trocado por uma molécula livre de NAD^+ (reação 3); o intermediário tioéster reage com fosfato inorgânico, formando 1,3-bisfosfoglicerato e regenerando o grupo SH da enzima (reação 4). A gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é inibida por agentes específicos para grupos SH como o iodoacetato (Seção 5.7).

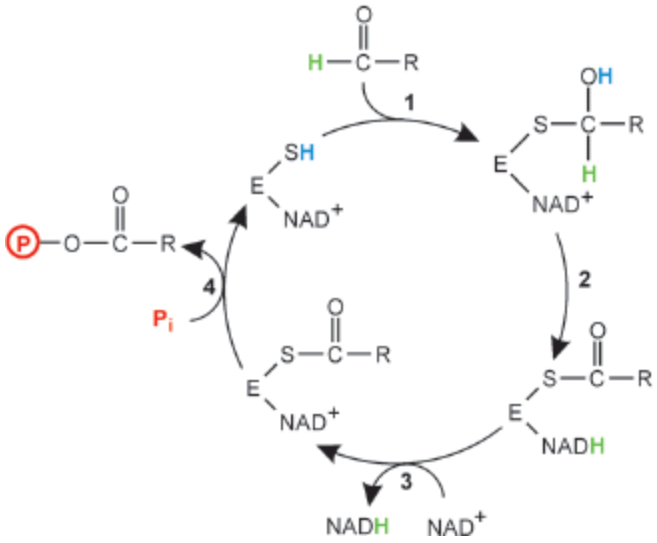


Figura 9.6 Esquema da conversão de gliceraldeído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato, catalisada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. As reações 1 a 4 estão descritas no texto. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4); Ⓟ = PO_3^{2-}.

Etapa IV. Compreende dois eventos de fosforilação de ADP a ATP por compostos com alto potencial de transferência do grupo fosforila: 1,3-bisfosfoglicerato e fosfoenolpiruvato. No primeiro, na reação catalisada pela *fosfoglicerato quinase*, o grupo fosfato da ligação anidrido carboxílico-fosfórico do 1,3-bisfosfoglicerato, uma ligação rica em energia, é 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 inicia-se com a transferência intramolecular do grupo éster fosfato do 3-fosfoglicerato, do carbono 3 para o carbono 2, catalisada pela *fosfoglicerato mutase*[3]. O processo envolve a formação intermediária de um composto bifosforilado, o 2,3-bisfosfoglicerato, originado por doação de um grupo fosfato da própria enzima ao substrato (Figura 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*.

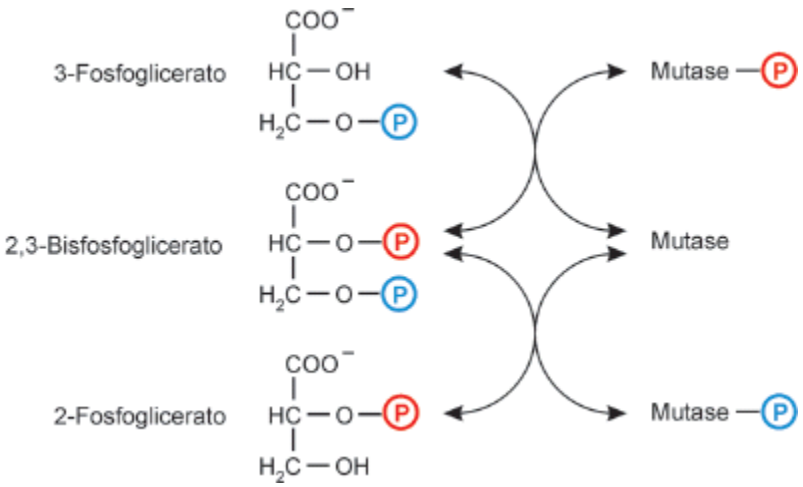


Figura 9.7 Esquema da conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato, com a formação de um intermediário bifosforilado.

Em resumo, na Etapa I ocorrem duas fosforilações por ATP e, na Etapa III, duas por fosfato inorgânico; na Etapa IV, os quatro grupos fosfato são transferidos para ADP, formando quatro ATP – para cada molécula de glicose convertida a duas de piruvato pela glicólise, são produzidos 4 ATP

(2 por triose). Para estabelecer o saldo final de produção de ATP devem ser descontados os 2 ATP consumidos inicialmente.

A equação geral da glicólise é:

$$\text{Glicose} + 2\,\text{ADP} + 2\,P_i + 2\,NAD^+ \longrightarrow 2\,\text{Piruvato} + 2\,\text{ATP} + 2\,H_2O + 2\,\text{NADH} + 2\,H^+ \quad (1)$$

Deve-se lembrar que uma equação geral ***não*** representa uma reação química; é apenas o somatório das reações que compõem a via metabólica, omitindo as reações intermediárias do processo. No caso em questão, 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, há necessidade de ATP.

A equação geral da glicólise evidencia que a oxidação da glicose a piruvato 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, o funcionamento contínuo da glicólise depende da reoxidação do NADH. Os seres vivos regeneram o NAD^+ por dois mecanismos diferentes, segundo a disponibilidade de oxigênio. Em *aerobiose*, utilizam o oxigênio para oxidar o NADH (Capítulo 11); em *anaerobiose*, lançam mão, para o mesmo fim, do processo analisado a seguir.

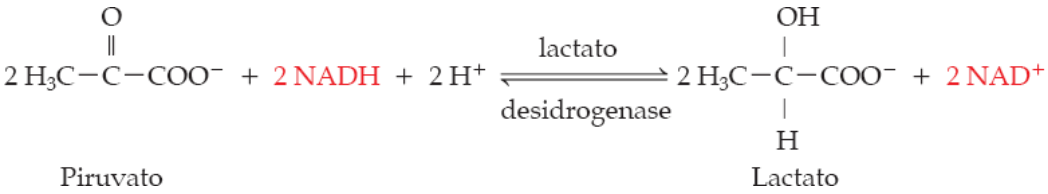
9.2.1 Glicólise anaeróbia: fermentações

Em anaerobiose, o próprio piruvato produzido pela glicólise (ou um composto dele derivado) serve como aceptor dos elétrons do NADH, assegurando o provimento de NAD^+ para a continuidade da via glicolítica. O piruvato é, portanto, o composto a partir do qual a oxidação aeróbia e a anaeróbia da glicose divergem.

A glicólise anaeróbia é chamada *fermentação*. Existem muitos tipos de fermentações que obedecem, entretanto, a um padrão comum: as reações da glicólise, que convertem glicose a piruvato, com produção de NADH, são seguidas por uma segunda etapa, que oxida NADH a NAD^+. As fermentações diferem pelas reações que efetuam a regeneração do NAD^+.

Segundo as enzimas de que a célula dispõe, o piruvato pode ser convertido a compostos diferentes, como lactato, etanol, propionato, butirato etc., que são sempre excretados da célula. As fermentações são designadas segundo o produto final: *fermentação lática*, *alcoólica*, *propiônica* etc. As fermentações são processos autossuficientes, porque independem de outras vias para regenerar a coenzima NAD^+ que utilizam.

Na *fermentação lática*, como acontece nas reações com participação de NAD^+, o piruvato recebe dois elétrons e um próton do NADH e um próton do meio, reduzindo-se a lactato:



(2)

Este é o processo utilizado por diversos microrganismos e por determinadas células e tecidos de mamíferos: hemácias, espermatozoides, medula renal, músculos esqueléticos etc. Quando os músculos esqueléticos realizam contração vigorosa (Seção 22.5), o oxigênio trazido pela circulação torna-se insuficiente para promover a oxidação da grande quantidade de NADH resultante do trabalho muscular e as fibras musculares ficam submetidas a uma anaerobiose relativa. A oxidação do NADH pelo piruvato gera o lactato caracteristicamente produzido por músculos em esforço intenso, permitindo que, pela regeneração do NAD^+, a glicólise possa prosseguir, formando ATP.

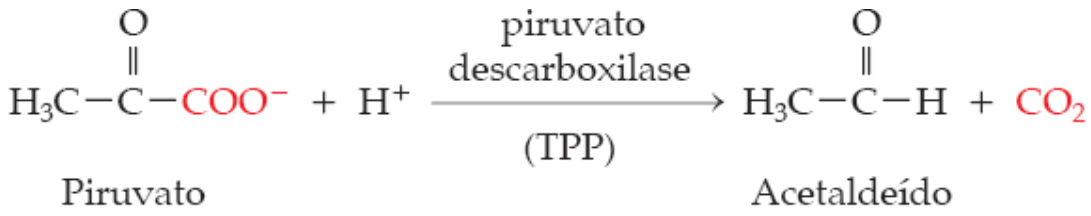
Nas situações de atividade muscular extenuante, costuma-se afirmar, *erroneamente*, que é produzido ***ácido lático***, que ao dissociar-se, causaria *acidose* (aumento da quantidade plasmática de prótons) — a reação da lactato desidrogenase forma lactato e ***não*** ácido lático e a formação de lactato consome prótons e ***não*** os produz. A acidose decorre do transporte conjunto (simporte) de lactato e prótons para o plasma; os prótons originam-se da intensa hidrólise de ATP, vigente nessa situação (Seção 22.4).

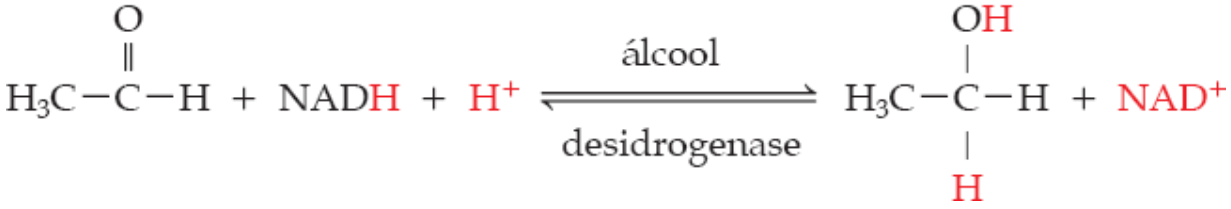
Somando a equação de conversão de glicose a piruvato (equação 1) à de conversão de piruvato a lactato (equação 2), obtém-se a equação geral da fermentação lática:

$$\text{Glicose} + 2\,\text{ADP} + 2\,P_i \longrightarrow 2\,\text{Lactato} + 2\,\text{ATP} + 2\,H_2O \qquad (3)$$

Esta equação geral, como todas, esconde etapas importantes da transformação: além da necessidade de ATP para iniciar a via, fica omitida a participação imprescindível do NAD^+, sem a qual a via não pode ser levada a cabo.

Em certos organismos, como as leveduras e alguns tipos de bactérias, a regeneração do NAD^+ é feita pela *fermentação alcoólica*. Nesta via, o piruvato é descarboxilado, originando acetaldeído, que, servindo como aceptor 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 (Seção 9.2).

A equação geral da fermentação alcoólica é:

$$\text{Glicose} + 2\,\text{ADP} + 2\,P_i \longrightarrow 2\,\text{Etanol} + 2\,CO_2 + 2\,\text{ATP} + 2\,H_2O \qquad (4)$$

O rendimento da glicólise anaeróbia é de 2 mols de ATP por mol de glicose

As fermentações lática e alcoólica resultam na produção líquida de 2 ATP, como mostram as equações 3 e 4. O rendimento da oxidação anaeróbia da glicose é muito menor do que aquele da sua oxidação aeróbia: 2 mols *versus* 38 mols de ATP por mol de glicose. A despeito disto, grande número de microrganismos e também células de eucariotos são capazes de sobreviver à custa da glicólise anaeróbia.

O requerimento de ADP e P_i para a síntese de ATP faz antecipar um aspecto da regulação da glicólise em células de mamíferos. Tendo em vista que as quantidades celulares de ADP são restritas, a continuidade da via fica atrelada à utilização de ATP por processos que requerem energia e originam ADP e P_i.

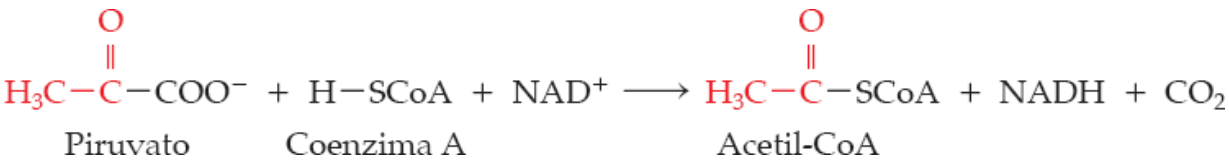
A glicólise, como praticamente todas as vias metabólicas, é estritamente regulada, por intermédio do controle da atividade e da síntese de algumas de suas enzimas.

A descrição completa da regulação da glicólise encontra-se na Seção 20.2.

9.3 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 é transportado do citosol para a mitocôndria (Seção 11.10), onde é transformado em acetil-CoA, conectando a glicólise e o ciclo de Krebs (Figura 9.1). O piruvato deixa de ser o aceptor dos elétrons do NADH produzido pela glicólise e esta coenzima é oxidada pelo oxigênio, o aceptor final de elétrons no metabolismo aeróbio, por um processo indireto (Seção 11.9).

O piruvato origina acetil-CoA, por descarboxilação oxidativa, de acordo com a equação geral:



O processo é irreversível e consiste na transferência do grupo acetila, proveniente da descarboxilação do piruvato, para a *coenzima A* (Figura 9.8). Esta coenzima tem justamente a função de carregadora de grupos acila, aos quais se liga por seu grupo sulfidrila terminal, estabelecendo uma ligação tioéster rica em energia (Tabela 4.3, Seção 4.1). 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 *quatro* vitaminas.

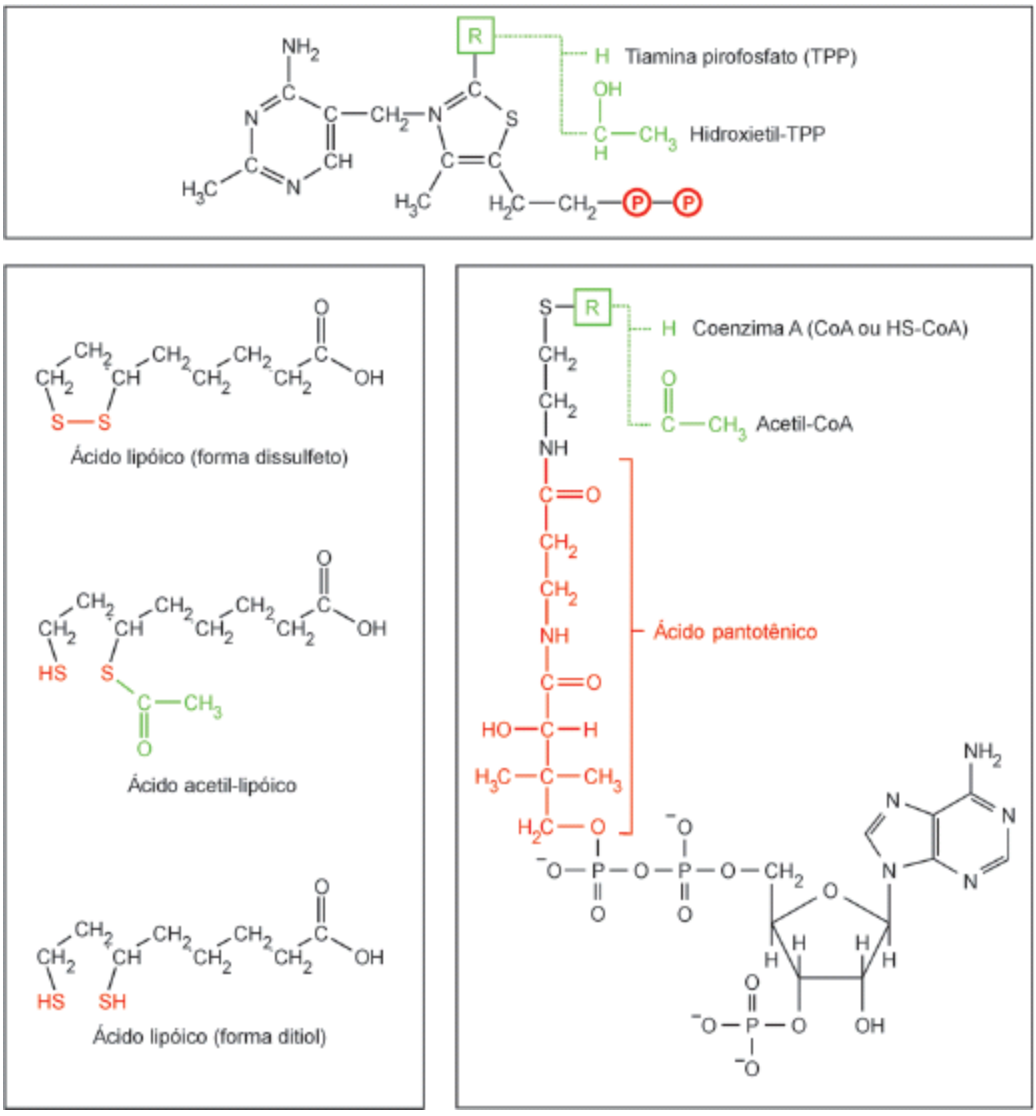


Figura 9.8 Estrutura das coenzimas (exceto NAD^+ e FAD) que participam da oxidação de piruvato a acetil-CoA e dos seus derivados formados nesta reação.

A reação de formação de acetil-CoA a partir de piruvato ocorre em etapas sequenciais, catalisadas por um sistema multienzimático, chamado *complexo piruvato desidrogenase*. O complexo contém três enzimas diferentes —*piruvato desidrogenase, di-hidrolipoil transacetilase* e *di-*

hidrolipoil desidrogenase — e cinco cofatores — *tiamina pirofosfato* (*TPP*), *ácido lipoico*, *coenzima A* (*CoA*), *flavina adenina dinucleotídio* (*FAD*) e *nicotinamida adenina dinucleotídio* (*NAD*$^+$) (Figura 9.8). Dos cinco cofatores, quatro — TPP, CoA, FAD e NAD^+ — são derivados de vitaminas: tiamina (B_1), ácido pantotênico (B_5), riboflavina (B_2) e nicotinamida (B_3), respectivamente. O ácido lipoico é um ácido graxo saturado de oito carbonos, com dois grupos sulfidrila (– SH) que se oxidam reversivelmente, formando uma ligação dissulfeto (– S – S –); o ácido lipoico está covalentemente ligado à extensa cadeia lateral de um resíduo de lisina da di-hidrolipoil transacetilase, o que resulta em um braço longo e flexível, graças ao qual é capaz de interagir com os locais ativos das duas outras enzimas do complexo, funcionando como um transferidor do grupo acetila.

A primeira etapa (Figura 9.9) é a descarboxilação do piruvato e a ligação do grupo hidroxietila ao TPP, catalisada pela piruvato desidrogenase. Esta mesma enzima é responsável pela oxidação do grupo hidroxietila a acetila e sua transferência à forma oxidada (forma dissulfeto) do ácido lipoico, que se reduz a ácido acetil-lipoico. A próxima enzima do complexo, a di-hidrolipoil transacetilase, transfere o grupo acetila para a coenzima A, formando acetil-CoA e a forma dissulfidrila do ácido lipoico. Esta forma reduzida do ácido lipoico é oxidada pela terceira enzima, a di-hidrolipoil desidrogenase, uma flavoproteína contendo FAD, que recebe os prótons e elétrons e os transfere finalmente para o NAD^+, que incorpora um próton e dois elétrons. O NADH formado é oxidado na cadeia de transporte de elétrons (Seção 11.2).

Uma só partícula do complexo piruvato desidrogenase é maior do que um ribossomo e consiste na união, por ligações não covalentes, de dezenas de moléculas de cada uma das três enzimas componentes do complexo. A associação das enzimas permite que essa reação complexa ocorra rápida e coordenadamente. Fazem parte ainda da partícula várias moléculas de enzimas reguladoras.

A regulação da atividade do complexo piruvato desidrogenase está descrita na Seção 20.4.

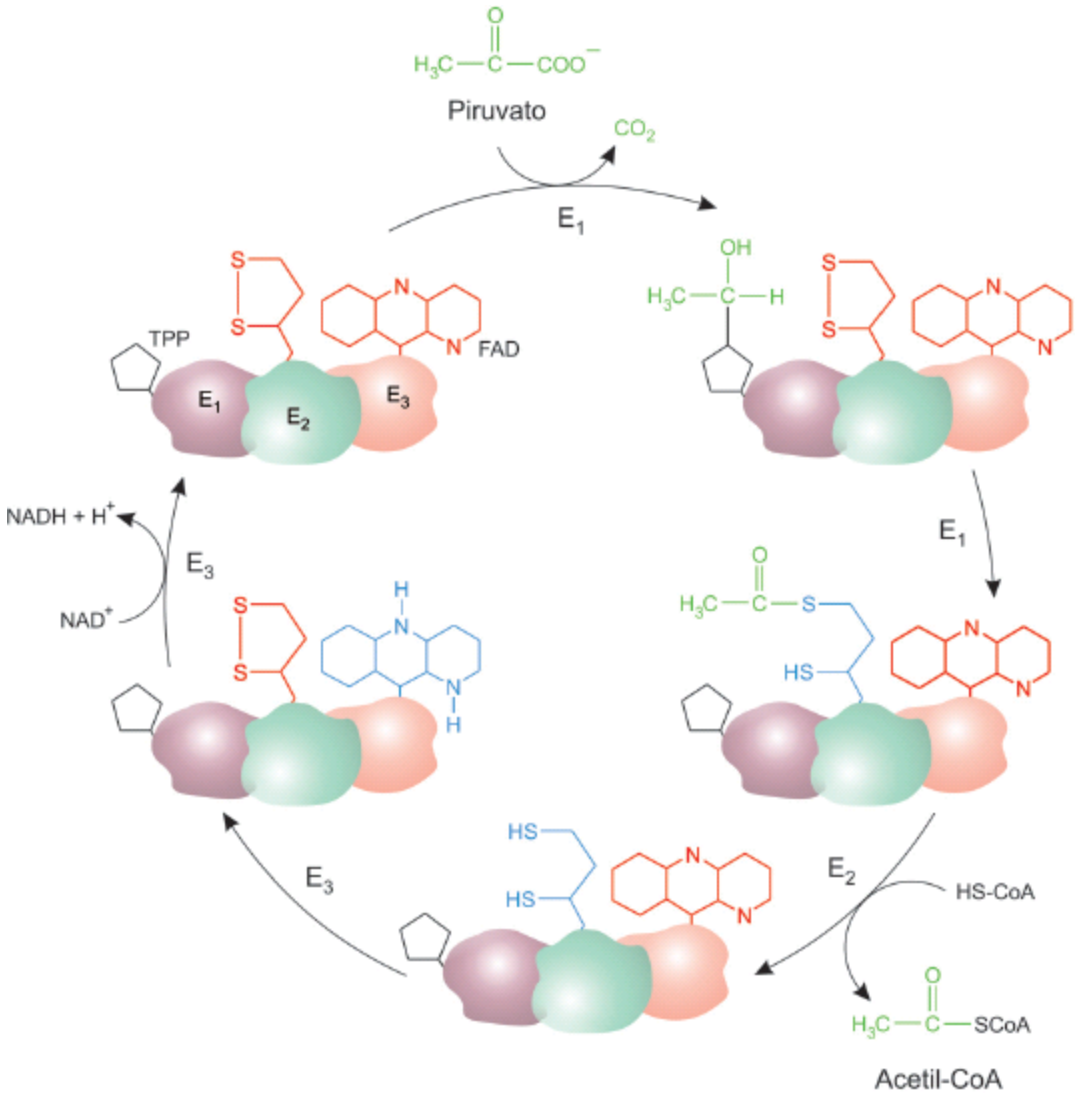


Figura 9.9 Etapas da reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase, onde E_1, E_2 e E_3 representam respectivamente as enzimas: piruvato desidrogenase (TPP), di-hidrolipoil transacetilase (ácido lipoico) e di-hidrolipoil desidrogenase (FAD).

Bibliografia

Büchner E: Alkoholische Gährung ohne Hefezellen (Fermentação alcoólica em lisado de células de levedura). *Ber Dtsch Chem Ges* **30**:117-124, 1897.

Cárdenas ML *et al.*: Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim Biophys Acta* **1401**: 242 -264, 1998.

Dashty M: A quick look at biochemistry: Carbohydrate metabolism. *Clin Biochem* **46** (15): 1339-1352, 2013.

Patel KP *et al*.: The spectrum of pyruvate dehydrogenase complex deficiency: Clinical, biochemical and genetic features in 371 patients. *Mol Genet Metab* **106** (3): 385-394, 2012.

Wilson JE: Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol* **206** (12): 2049-2057, 2003.

[1]A denominação *bisfosfato* é empregada quando dois fosfatos estão ligados a locais diferentes de uma molécula, como na frutose 1,6-bisfosfato. Se os dois fosfatos estão unidos por ligação anidrido fosfórico, trata-se de um *difosfato*, como no ADP (adenosina difosfato).

[2]Álcoois podem reagir com o grupo carbonila de aldeídos formando hemiacetais; no caso de um *tio*álcool (grupo SH da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), origina-se um tio-hemiacetal.

[3]Mutases são um tipo particular de isomerases, que catalisam a transferência de um grupo fosfato de uma posição para outra, na mesma molécula.

OceanofPDF.com

10 Ciclo de Krebs

O piruvato formado a partir de glicose no citosol origina o grupo acetila presente na acetil-CoA mitocondrial (Seção 9.2). Além da glicose, vários aminoácidos, ao serem degradados, produzem piruvato e, portanto, acetil-CoA. Outros aminoácidos e os ácidos graxos produzem acetil-CoA sem a formação intermediária de piruvato (Figura 8.3). A acetil-CoA constitui, portanto, o ponto de convergência do metabolismo degradativo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos e também de etanol. Completando o catabolismo destes compostos, a acetil-CoA, na mitocôndria, é totalmente oxidada a CO_2 pelo ciclo de Krebs, com a concomitante produção de coenzimas reduzidas. Paralelamente a esta oxidação, o ciclo de Krebs produz compostos utilizados como precursores para biossínteses.

10.1 Reações do ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Figura 10.1) inicia-se com a condensação de acetil-CoA e oxaloacetato, formando citrato, uma reação catalisada pela *citrato sintase*[1]. O citrato é isomerizado a isocitrato, com a formação de um intermediário, o *cis*-aconitato, por ação da *aconitase*. A aconitase, nos mamíferos, ocorre como duas isoenzimas, uma mitocondrial, que participa do ciclo de Krebs, e outra citoplasmática. O centro ativo das aconitases inclui um centro ferro-enxofre (Seção 11.2), essencial para a catálise. Quando há baixa disponibilidade de ferro, a isoenzima citoplasmática perde o centro ferro-enxofre e a atividade de aconitase: a apoproteína resultante exibe uma função diferente, a capacidade de ligar-se a RNA, regulando a síntese de

proteínas envolvidas no metabolismo do ferro. A aconitase é um exemplo clássico de contradição do dogma: um gene → uma proteína → uma função.

A *isocitrato desidrogenase* promove a oxidação de isocitrato a α-cetoglutarato, com redução de NAD^+ e liberação de CO_2. No citosol e nas mitocôndrias das células de eucariotos, existem isoenzimas da isocitrato desidrogenase que utilizam $NADP^+$ como coenzima e cuja função seria realmente produzir NADPH, um importante agente redutor utilizado em processos celulares antioxidantes (Seção 12.3) e em sínteses redutoras (Seção 16.5).

O α-cetoglutarato é transformado em succinil-CoA, graças à atuação do complexo α-*cetoglutarato desidrogenase*, semelhante ao complexo piruvato desidrogenase quanto à estrutura e ao mecanismo de reação. Trata-se, em ambos os casos, da descarboxilação oxidativa de um α-cetoácido (piruvato ou α-cetoglutarato) e ligação do grupo remanescente (acetila ou succinila) à coenzima A, formando um tioéster (rico em energia), com participação de TPP, ácido lipoico, FAD e NAD^+, que é reduzido a NADH.

A seguir, succinil-CoA é convertida a succinato, acoplada à síntese de outro composto rico em energia, um nucleosídio trifosfato (NTP) a partir de um nucleosídio difosfato (NDP) e P_i; a reação é catalisada pela *succinil-CoA sintetase* (ou *succinato-CoA ligase*). Existem várias isoenzimas da succinil-CoA sintetase que diferem quanto aos organismos onde são expressas e quanto à especificidade para os nucleotídios sobre os quais atuam: permitem a formação de ATP a partir de ADP e P_i ou de GTP (guanosina trifosfato — Figura 10.2) a partir de GDP (guanosina difosfato) e P_i. A succinil-CoA sintetase encontrada em plantas origina ATP; nas bactérias, dependendo da espécie considerada, pode-se formar ATP ou GTP, ou ambos; em mamíferos, incluindo os seres humanos, as duas isoenzimas são expressas e as suas quantidades relativas variam segundo o tecido. O GTP pode ser utilizado em reações dele dependentes (Seção 14.2), ou pode transferir um grupo fosfato ao ADP, produzindo ATP, por ação da *nucleosídio difosfato quinase*:

$$GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP$$

A próxima reação é catalisada pela única enzima do ciclo de Krebs que é parte integrante da membrana interna da mitocôndria; as demais estão em forma solúvel na matriz mitocondrial. Trata-se de uma flavoproteína, a *succinato desidrogenase*, também denominada *succinato-ubiquinona oxidação-redução* ou *Complexo II* da cadeia respiratória (Seção 11.2).

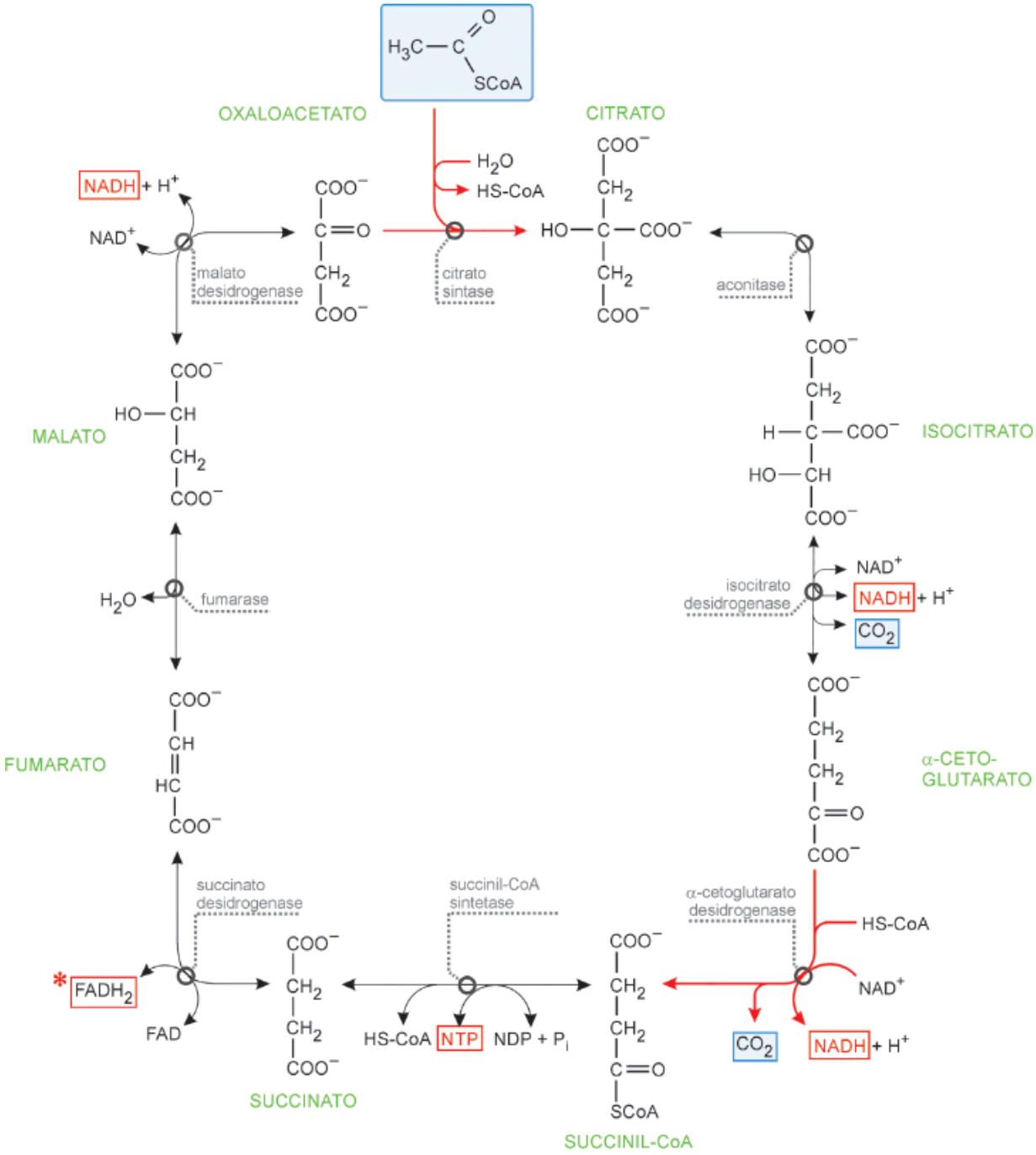


Figura 10.1 Ciclo de Krebs. Na reação da succinil-CoA sintetase, o nucleosídio trifosfato (NTP) pode ser ATP ou GTP e o nucleosídio difosfato (NDP), ADP ou GDP. *FADH $_2$não é liberado na reação, porque está ligado à succinato desidrogenase; seus elétrons e prótons reduzem a coenzima Q (CoQ) a $CoQH_2$: FADH $_2$ + CoQ → FAD + $CoQH_2$.

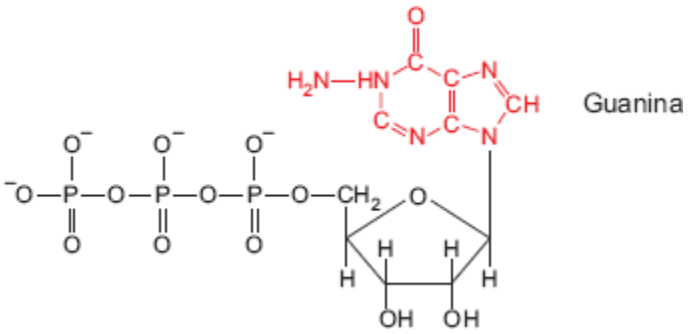


Figura 10.2 O GTP difere do ATP por conter guanina como base nitrogenada.

Na primeira etapa da reação, o succinato é oxidado a fumarato e o FAD é reduzido a $FADH_2$. FAD, diferentemente de NAD^+, liga-se covalentemente à enzima, consistindo em um grupo prostético. A Figura 10.1 mostra, como recurso didático, o $FADH_2$ liberado na reação, sendo que ele não se dissocia da succinato desidrogenase. Os elétrons e prótons do $FADH_2$ são transferidos para a ubiquinona ou coenzima Q (CoQ), este sim, um composto que se difunde livremente na bicamada lipídica da membrana interna da mitocôndria. A representação exata da reação da succinato desidrogenase é:

$$\text{Succinato} + \text{CoQ} \rightarrow \text{Fumarato} + CoQH_2$$

Ainda assim, considera-se $FADH_2$ como um produto do ciclo de Krebs, e de outras vias metabólicas que incluem flavoproteínas, para viabilizar o cômputo da quantidade de ATP sintetizado a partir de coenzimas reduzidas (Seções 11.8 e 16.2.1).

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. Em paralelo a esta oxidação são reduzidos 3 NAD^+ e 1 FAD.

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 grupo acetila são estequiometricamente convertidos a CO_2. Esta oxidação tem consequências fundamentais para o metabolismo de mamíferos. Como a degradação de ácidos graxos gera unicamente acetil-CoA, que é completamente oxidada no ciclo de Krebs, os ácidos graxos são convertidos totalmente a CO_2. Em razão desta conversão, os ácidos graxos não podem gerar glicose (Seção 10.3).

A maioria das reações do ciclo de Krebs é reversível, mas o sentido do ciclo é determinado pela irreversibilidade das reações catalisadas pela citrato sintase e pela α-cetoglutarato desidrogenase (setas coloridas na Figura 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:

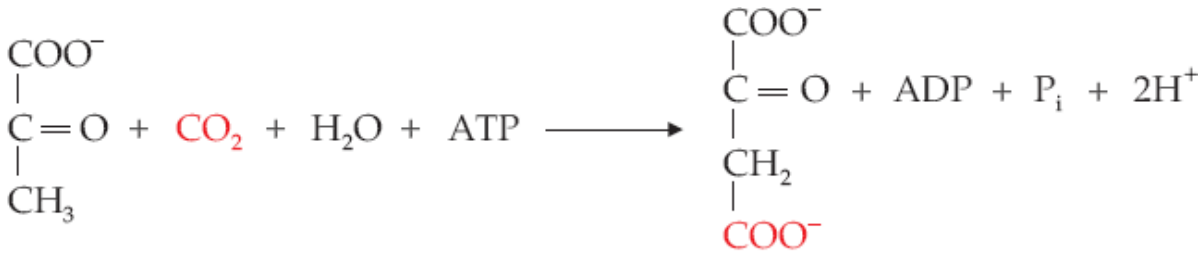
$$\text{Acetil-CoA} + 3\,NAD^+ + FAD + ADP\,(\text{ou GDP}) + P_i + 2\,H_2O \longrightarrow 2\,CO_2 + 3\,NADH + 2\,H^+ + FADH_2 + ATP\,(\text{ou GTP}) + \text{HS-CoA}$$

Embora produza apenas 1 ATP (ou 1 GTP) por acetil-CoA oxidada, o ciclo de Krebs 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 (Capítulo 11) 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*:



Piruvato Oxaloacetato

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 ativação da piruvato carboxilase aumenta a velocidade do ciclo de Krebs

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 reposto 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

introduzidas no ciclo quando, após a última reação, o oxaloacetato fosse regenerado. Com quantidades maiores de oxaloacetato disponíveis, a eficiência da utilização de acetil-CoA pelo ciclo aumentaria. O ajuste da velocidade de consumo de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs à sua concentração é feito por intervenção na 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 deste composto ativa a piruvato carboxilase e a conversão de piruvato em oxaloacetato é favorecida. Com concentrações concomitantemente altas de oxaloacetato e acetil-CoA, a reação catalisada pela citrato sintase, que dá início ao ciclo, pode funcionar a velocidades altas.

A regulação completa do ciclo de Krebs está descrita na Seção 20.5.

10.3 Ciclo do glioxilato

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

Nos vegetais, em leveduras e algumas bactérias, encontra-se uma via alternativa de metabolismo de acetil-CoA, chamada *ciclo do glioxilato* (Figura 10.3), 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. Estas duas enzimas localizam-se, nos vegetais, em organelas chamadas *glioxissomos*, um tipo especial de peroxissomos (Seção 16.2) que, por efetuarem também a oxidação de ácidos graxos, dispõem de uma fonte de acetil-CoA.

No ciclo de Krebs, isocitrato converte-se em succinato por reações que envolvem a perda de dois carbonos, sob a forma de CO_2. No ciclo do glioxilato, os seis carbonos do isocitrato originam succinato (C_4) e glioxilato (C_2). O glioxilato reage com outra molécula de acetil-CoA formando malato, que regenera oxaloacetato. O ciclo do glioxilato

consome, portanto, duas moléculas de acetil-CoA (C_2 + C_2) e produz uma molécula de succinato (C_4). A equação geral do ciclo do glioxilato é:

$$2 \text{ Acetil-CoA} + NAD^+ + 2\ H_2O \rightarrow \text{Succinato} + 2 \text{ HS-CoA} + NADH + 3\ H^+$$

A síntese líquida de succinato viabiliza a conversão dos carbonos da acetil-CoA a glicose: o succinato, por ação de enzimas do ciclo de Krebs e da gliconeogênese, produz glicose. Nos vegetais, esta síntese envolve a participação de diferentes compartimentos celulares e, consequentemente, o transporte de compostos através de membranas, mediado por permeases. No glioxissomo, acetil-CoA condensa-se com oxaloacetato formando citrato, que é isomerizado a isocitrato, por reações idênticas às do ciclo de Krebs; isocitrato é cindido em glioxilato e succinato. O glioxilato reage com acetil-CoA, originando malato, que regenera oxaloacetato por ação da malato desidrogenase mitocondrial. O succinato não pode ser utilizado pelo glioxissomo e, na mitocôndria, transforma-se em malato, graças às atuações da succinato desidrogenase e da fumarase do ciclo de Krebs. O malato, por ação da malato desidrogenase citosólica, origina oxaloacetato, que é convertido em glicose pelas reações da gliconeogênese.

O ciclo do glioxilato, dessa forma, permite obter glicose a partir de acetil-CoA, ou seja, de ácidos graxos. ***Esta é uma impossibilidade metabólica dos animais***, pois não sintetizam as enzimas do ciclo do glioxilato e, 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 oleaginosas em germinação, promovendo a transformação dos ácidos graxos de suas reservas lipídicas em glicose, precursora da celulose. Este ciclo possibilita, ainda, a certas bactérias, crescerem em meios contendo apenas ácidos graxos como fonte de carbonos.

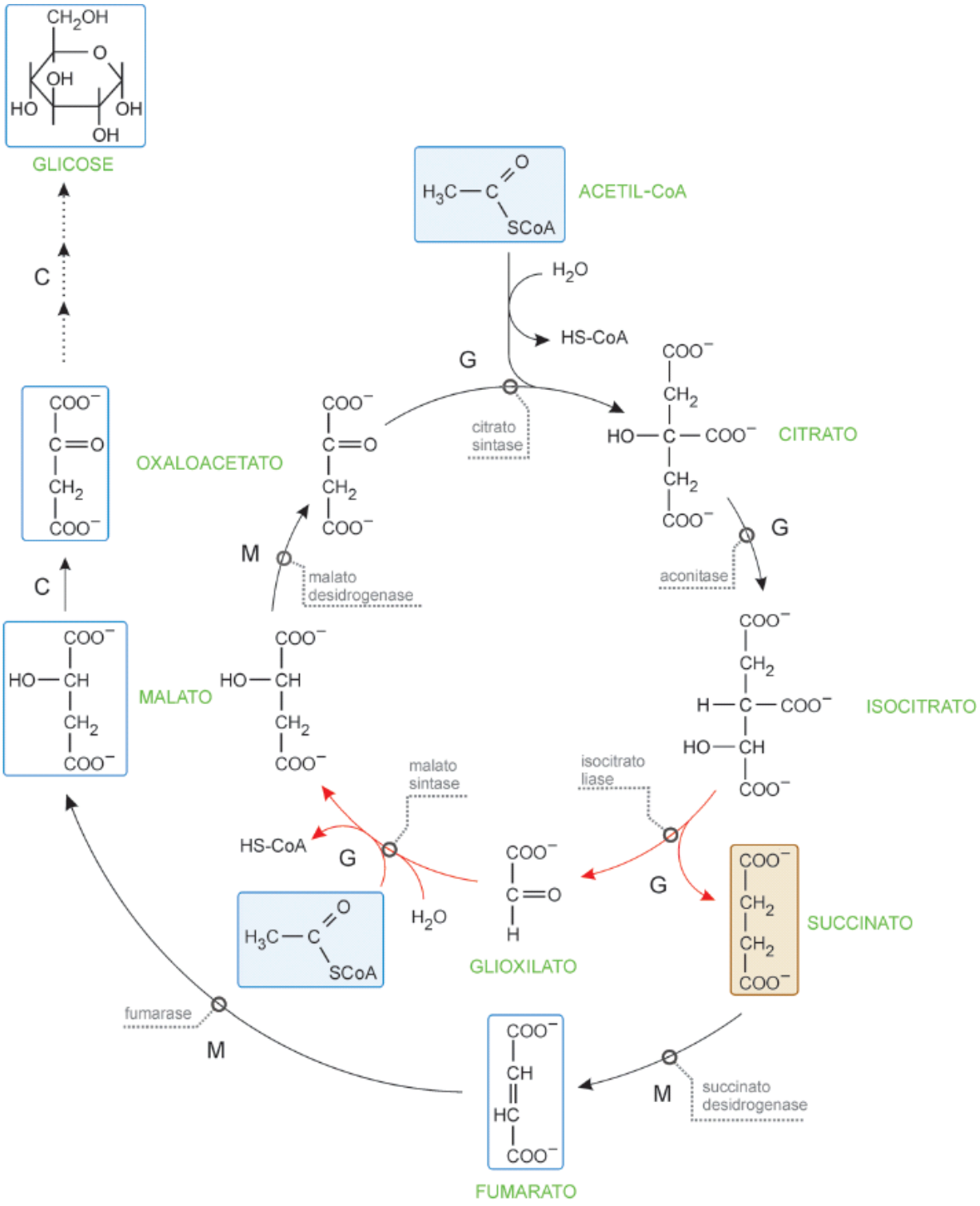


Figura 10.3 Ciclo do glioxilato. As enzimas isocitrato liase e malato sintase (em vermelho), presentes em plantas e bactérias, permitem a síntese líquida de succinato a partir de acetil-CoA. O succinato é transportado para a mitocôndria, onde origina malato; no citosol, o malato é convertido a

oxaloacetato, que pode originar glicose pela gliconeogênese (setas pontilhadas). Estão omitidas, das reações comuns ao ciclo de Krebs, as coenzimas participantes. G = Glioxissomo; M = Mitocôndria; C = Citosol.

Bibliografia

Anderson CP *et al*.: Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1823** (9): 1468-1483, 2012.

Bubber P *et al*.: Tricarboxylic acid cycle enzymes following thiamine deficiency. *Neurochem Int* **45** (7):1021-8, 2004.

Huberts DH, van der Klei IJ: Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochim Biophys Acta* **1803** (4): 520-525, 2010.

Kornberg H: Krebs and his trinity of cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1** (3):225-8, 2000.

Krebs HA, Johnson WA: The role of citric acid in the intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* **4**: 148-156, 1937.

Lambeth DO: Reconsideration of the significance of substrate-level phosphorylation in the citric acid cycle. *Biochem Mol Biol Edu* **34** (1): 21-29, 2006.

Lambeth DO *et al*.: Expression of two succinyl-CoA synthetases with different nucleotide specificities in mammalian tissues. *J Biol Chem* **279** (35): 36621-36624, 2004.

Penfield S *et al*.: Storage reserve mobilization in germinating oilseeds: Arabidopsis as a model system. *Biochem Soc Trans* 33:380-383, 2005

Raimundo N *et al*.: Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol Med* **17** (11): 641-649, 2011.

Stobbe MD *et al*.: Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *FASEB J* **26** (9): 3625-3636, 2012.

[1] *Sintases* são enzimas que catalisam reações de condensação sem a participação de nucleosídios trifosfato (ATP, GTP etc.). Nas reações catalisadas por *sintetases*, ao contrário, há participação de nucleosídios trifosfato.

OceanofPDF.com

11 Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

11.1 Oxidação de coenzimas e síntese de ATP

Os processos de oxidação de glicose, ácidos graxos e aminoácidos 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 carboidratos, lipídios e proteínas. A oxidação destes compostos é acompanhada da redução de grande quantidade das coenzimas NAD^+ e FAD.

Para exemplificar, está apresentado a seguir o cômputo do número de mols destas coenzimas que são reduzidas na oxidação total de um mol de glicose:

Etapa/Reação	Mols de NADH	Mols de $FADH_2$
Glicólise		
Gliceraldeído 3-fosfato → 1,3-Bisfosfoglicerato	2	—
Piruvato → Acetil-CoA	2	—
Ciclo de Krebs		
Isocitrato → α-Cetoglutarato	2	—
α-Cetoglutarato → Succinil-CoA	2	—
Succinato → Fumarato	—	2

Malato → Oxaloacetato	2	—
Total	10	2

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

As coenzimas reduzidas 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 empregada pelas células para sintetizar ATP.

As células aeróbias produzem a maior parte do seu ATP por oxidação das coenzimas pelo oxigênio (a chamada "respiração celular"), efetuada por uma *cadeia de transporte de elétrons*, também denominada de *cadeia respiratória*, à qual está intimamente associada a *síntese de ATP*. Esta síntese consiste na fosforilação do ADP (ADP + P_i → ATP) e, por utilizar a energia derivada da oxidação das coenzimas, é denominada *fosforilação oxidativa*.

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 entre os potenciais de redução da coenzima reduzida e do oxigênio, como será visto pelo cálculo a seguir. O potencial de redução de NAD^+/NADH é igual a – 0,32 V e o potencial de O_2/H_2O, é +0,82 V. Usando a expressão

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

pode-se calcular o valor de $\Delta G^{o\prime}$ para a transferência de 2 elétrons do NADH para o oxigênio:

$$\Delta G^{o\prime} = -2 \times 96{,}5 \times [0{,}82 - (-0{,}32)]$$
$$\Delta G^{o\prime} = -220\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

O valor encontrado é bastante alto quando comparado ao valor de $\Delta G^{o\prime}$ da síntese de ATP, 31 kJ · mol^{-1}. Em outras palavras, do ponto de vista meramente quantitativo, a energia liberada na oxidação de um mol de NADH permite a produção de cerca de sete mols de ATP, em condições padrão. A questão fundamental, entretanto, é: como utilizar esta energia para sintetizar ATP? Se a transferência de elétrons das coenzimas reduzidas fosse feita diretamente para o oxigênio, toda a energia do processo seria liberada como calor, inutilizável pelas células para promover os processos que requerem energia.

A estratégia adotada pelas células consiste em:

1. transferir os elétrons das coenzimas para o oxigênio, não diretamente, mas em etapas;
2. transformar a energia contida nas coenzimas reduzidas em um *gradiente de prótons* que é utilizado para sintetizar ATP.

A formação do gradiente de prótons é acoplada às passagens intermediárias dos elétrons por vários compostos, que constituem uma *cadeia de transporte de elétrons*. Para cumprir esta função, os compostos que formam a cadeia são organizados em membranas, de acordo com seus potenciais de redução: os elétrons partem da coenzima reduzida, que tem potencial de redução menor que os componentes da cadeia, e percorrem uma sequência de transportadores com potenciais de redução crescentes, até atingirem o oxigênio, que tem o maior potencial de redução. As transferências de elétrons entre estes compostos são sempre 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 entre aquele que lhe fornecerá elétrons e aquele ao qual seus elétrons serão doados. Ao mesmo tempo em 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 — os componentes da cadeia de transporte de elétrons atuam como bombas de prótons. *É o aproveitamento da energia potencial contida no gradiente de prótons que torna possível a síntese de ATP*.

11.2 Cadeia de transporte de elétrons mitocondrial

A maioria dos transportadores de elétrons estão agrupados em 4 complexos enzimáticos

A oxidação das coenzimas reduzidas processa-se na membrana interna da mitocôndria, da qual fazem parte os componentes da cadeia de transporte de elétrons. A maior parte destes componentes se organiza em quatro complexos enzimáticos, designados I, II, III e IV, que atravessam a membrana interna. Cada complexo enzimático é constituído por diversas subunidades proteicas associadas a grupos prostéticos diferentes, como FMN, FAD, centros ferro-enxofre e grupos heme, ou a íons de cobre. Sem fazer parte de complexos, aparecem ainda dois componentes móveis 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. Estes componentes organizam-se em ordem crescente de potenciais de redução (Tabela 11.1).

A disposição dos transportadores de elétrons na membrana interna da mitocôndria está esquematizada na Figura 11.1. Dois elétrons do NADH são transferidos para o Complexo I, do Complexo I para CoQ, depois para o Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e finalmente para o oxigênio. Elétrons presentes no succinato e em outros substratos têm uma entrada especial na cadeia de transporte de elétrons: são transferidos ao Complexo II e em seguida para CoQ; desta etapa em diante, seguem o caminho comum: Complexo III, citocromo *c*, Complexo IV e oxigênio.

Tabela 11.1 Potenciais de redução padrão ($E^{o\prime}$) dos componentes da cadeia de transporte de elétrons.

	Par oxidado/reduzido	$E^{o}9$ (volts)
	NAD^{+}/NADH	– 0,32
Complexo I	FMN/$FMNH_2$	– 0,30
	Centros Fe-S ox/red[1]	– 0,38 a – 0,27
	Fumarato/Succinato	+ 0,03
Complexo II	FAD/$FADH_2$	– 0,04
	Centros Fe-S ox/red	– 0,03 a 10,06
	Citocromo *b* ox/red	– 0,08
	CoQ/$CoQH_2$	+ 0,05
Complexo III	Heme b_{566}ox/red[2]	– 0,03
	Heme b_{562}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_2O	+ 0,82

[1]As formas oxidada e reduzida dos centros Fe-S e citocromos contêm Fe^{+3} e Fe^{+2}, respectivamente.
[2]O citocromo *b* contém dois grupos heme, b_{566} e b_{562}, também chamados de b_L e b_H, devido ao valor baixo (***Low***) e alto (***High***), respectivamente, de seus potenciais de redução.

As transferências são possíveis porque todos os compostos presentes nos complexos, mais a CoQ 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 aptos a receber elétrons novamente.

A seguir será apresentada a natureza química dos grupos prostéticos e, mais adiante, a sua organização nos complexos I a IV. A estrutura tridimensional com grau de resolução atômica dos Complexos I, II, III e IV já foi descrita.

Os grupos prostéticos dos complexos atuam como centros de oxidação-redução

As reações de oxidação-redução são efetivamente cumpridas pelos grupos prostéticos dos complexos enzimáticos e pelos transportadores móveis que constituem a cadeia respiratória.

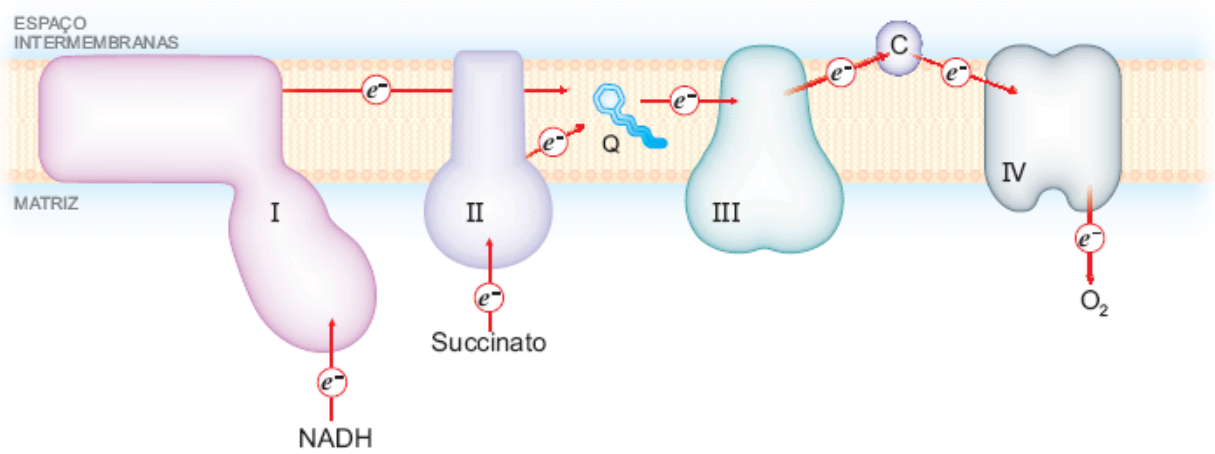


Figura 11.1 Disposição dos Complexos I, II, III e IV, transportadores de elétrons, na membrana interna da mitocôndria. As setas indicam a trajetória dos elétrons provenientes do NADH ou do succinato até o oxigênio. C = citocromo *c*; Q = coenzima Q.

A *flavina mononucleotídio (FMN)*, um grupo prostético do Complexo I, é um derivado da vitamina riboflavina, com estrutura semelhante à do FAD (Seção 9.1), e, como este, capaz de receber 2 prótons e 2 elétrons, passando à forma totalmente reduzida, $FMNH_2$. A redução de FMN ocorre em duas etapas (Figura 11.2): ao receber 1 próton e 1 elétron, converte-se em uma *semiquinona*, um radical livre (Seção 11.2.1), que, ao reagir com mais 1 próton e 1 elétron, origina $FMNH_2$. As proteínas que contêm uma coenzima derivada da riboflavina (FAD ou FMN) são designadas *flavoproteínas*.

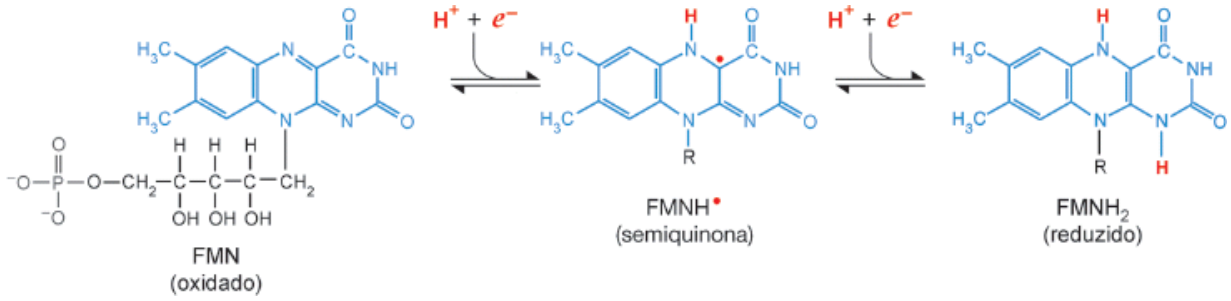


Figura 11.2 Estruturas da flavina mononucleotídio. A forma oxidada (FMN) reage com um próton e um elétron, convertendo-se na forma semiquinona ($FMNH^{\cdot}$); a incorporação de mais um próton e um elétron resulta na forma totalmente reduzida ($FMNH_2$).

Os *centros ferro-enxofre* (*centros Fe-S*), cofatores dos Complexos I, II e III, são formados de íons de ferro e de enxofre, podendo apresentar diversas configurações: Fe-S, Fe_2-S_2, Fe_4-S_4 etc. Estão associados à cadeia polipeptídica por ligação covalente a resíduos de cisteína (Figura 11.3). 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 e doados pelo íon de ferro, que se alterna entre os estados de oxidação Fe^{3+} e Fe^{2+}.

A *ubiquinona* ou *coenzima Q* (*CoQ ou Q*) representa uma família de quinonas que diferem pelo número de unidades isoprênicas presentes em sua cadeia lateral. A forma mais comum encontrada nos mamíferos apresenta 10 dessas unidades. As características hidrofóbicas da ubiquinona 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 ubiquinona oxidada (Q) recebe 2 prótons e 2 elétrons, originando a forma reduzida, o ubiquinol (QH_2). A redução, como no caso do FMN, ocorre via uma forma intermediária, que é um radical livre, a semiubiquinona, $QH^{\cdot}$ (Figura 11.4).

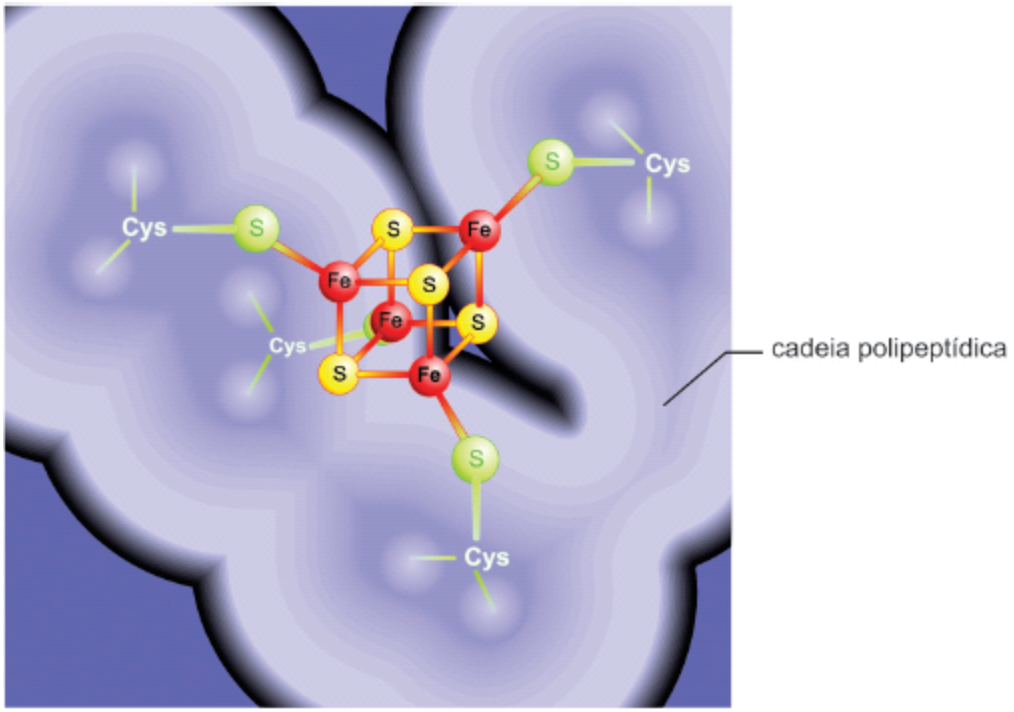


Figura 11.3 Estrutura de um centro ferro-enxofre do tipo Fe_4-S_4. Os átomos de ferro estão ligados a átomos de enxofre e a resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica da proteína ferro-enxofre.

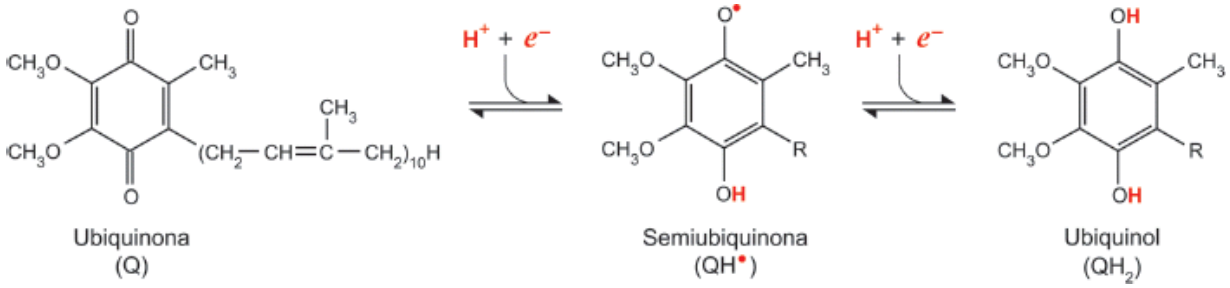


Figura 11.4 Formas da coenzima Q. A forma oxidada, ubiquinona (Q), origina a semiubiquinona ($QH^{\bullet}$) ao receber um próton e um elétron; a reação com mais um próton e um elétron produz a forma reduzida, ubiquinol (QH_2).

Os *citocromos* são proteínas transportadoras de elétrons, que contêm heme (Seção 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 tilacoide dos

cloroplastos; em bactérias, localizam-se na 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.

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. Os subtipos de citocromos são caracterizados por um índice que indica, em nanômetros, o pico de absorção máxima; dois exemplos são o *citocromo* b_{562} e o *citocromo* b_{566} do Complexo III. Os citocromos diferem também quanto aos radicais substituintes do grupo heme e quanto à forma de ligação do heme à cadeia polipeptídica. Esta ligação, nos tipos *a* e *b*, é não covalente e, no tipo *c*, é covalente (tioéter), formada com resíduos de cisteína (Figura 11.5). Naturalmente, cada citocromo é constituído por uma cadeia polipeptídica com uma sequência de aminoácidos que lhe é própria.

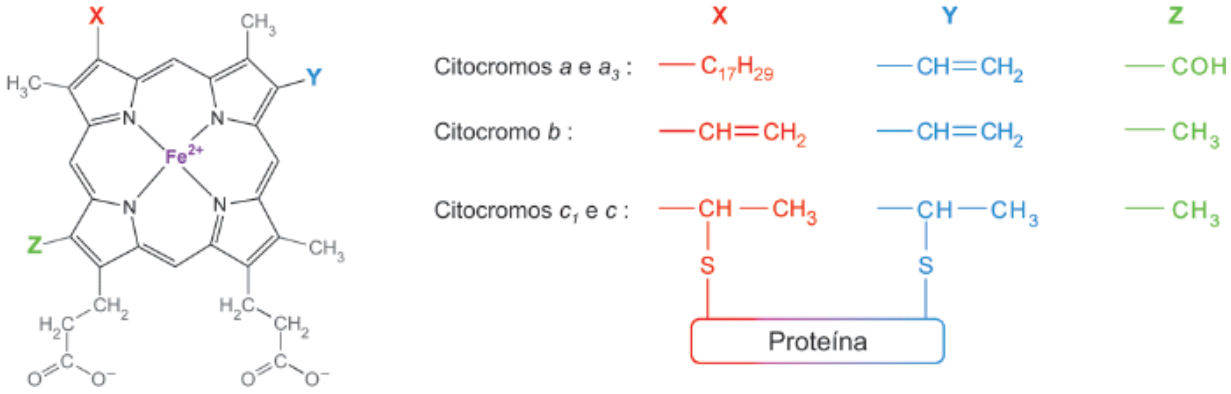


Figura 11.5 Estrutura dos grupos prostéticos dos citocromos. Os citocromos dos tipos *a*, *b* e *c* apresentam o grupo heme caracterizado pelos substituintes X, Y, Z indicados na figura. Nos citocromos do tipo *c*, o grupo heme estabelece ligações tioéter com resíduos de cisteína da cadeia polipeptídica; nos outros dois tipos, a ligação é não covalente.

O citocromo *c*, ao contrário dos outros citocromos, que são proteínas integradas (Seção 7.2), é uma proteína periférica, situada na face externa da membrana interna da mitocôndria, com a qual estabelece ligações fracas. É uma proteína relativamente pequena e seu tamanho e mobilidade permitem-

lhe conectar o Complexo III, do qual recebe elétrons, ao Complexo IV, ao qual doa elétrons.

Os grupos prostéticos do Complexo IV compreendem dois grupos heme, do tipo *a* e a_3, além de três íons de cobre, que se alternam entre os estados de oxidação Cu^{2+} e Cu^{1+}.

O Complexo I oxida o NADH, reduz a coenzima Q e atua como uma bomba de prótons

O Complexo I, também chamado *NADH-ubiquinona oxirredutase* (Figura 11.6), é a primeira enzima da cadeia de transporte de elétrons de mitocôndrias da maioria dos eucariotos. Ela catalisa a transferência de dois elétrons do NADH à ubiquinona, acoplada à translocação de quatro prótons através da membrana interna da mitocôndria. Sua atuação responde por cerca de 40% da força próton-motriz gerada pela cadeia respiratória mitocondrial.

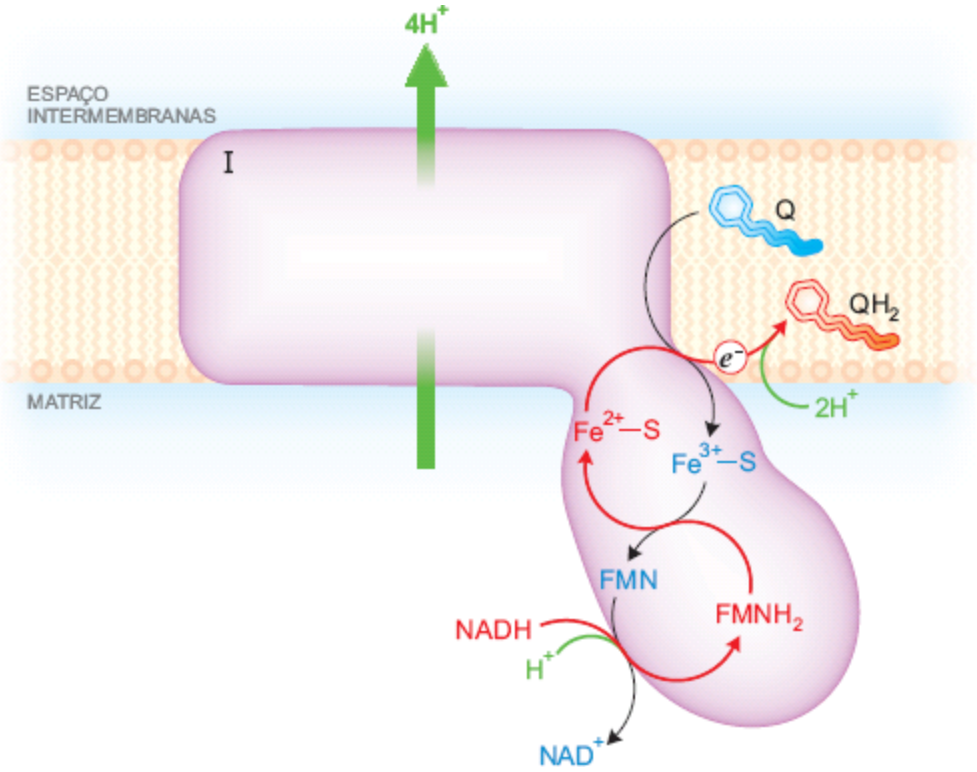


Figura 11.6 Transferências de elétrons no Complexo I. As setas vermelhas indicam o caminho que percorrem: são doados do NADH ao FMN e, deste,

a centros Fe-S (apenas um está representado) para serem transferidos à coenzima Q. As setas verdes indicam movimentação de prótons, retirados da matriz (setas finas) ou bombeados para o espaço intermembranas (seta grossa).

É um dos maiores complexos de membrana conhecidos, com estrutura extremamente complexa, constando de 44 cadeias polipeptídicas em mitocôndrias de mamíferos. Ao microscópio eletrônico, apresenta forma de L — um braço fica imerso na membrana (domínio hidrofóbico) e o outro, periférico (domínio hidrofílico), projeta-se na matriz mitocondrial. Às cadeias polipeptídicas do domínio hidrofílico estão associados os centros redox: uma molécula de FMN e oito centros Fe-S, dispostos em uma longa sequência linear. O domínio transmembrana não contém centros redox e apresenta subunidades com estrutura homóloga à de translocases antiportadoras de íons (Seção 7.4.1), que funcionariam como transportadoras de prótons; outros elementos estruturais do domínio hidrofóbico, incluindo uma hélice longa e flexível, estabelecem a conexão mecânica dos canais de prótons entre si e com o domínio hidrofílico, do qual ficam distantes. O sítio de ligação da ubiquinona encontra-se na interface entre os dois domínios.

A redução de FMN por elétrons doados por NADH constitui a primeira transferência de elétrons para a cadeia de transporte de elétrons:

$$\underset{}{NADH} + \underset{}{H^+} + \underset{\text{(Complexo I)}}{FMN} \longrightarrow \underset{}{NAD^+} + \underset{\text{(Complexo I)}}{FMNH_2}$$

NADH é produto de várias reações do metabolismo. Alguns exemplos são as reações de oxidação de:

— gliceraldeído 3-fosfato (glicólise, Seção 9.1);
— piruvato (Conversão piruvato → acetil-CoA, Seção 9.3);
— isocitrato, α-cetoglutarato e malato (ciclo de Krebs, Seção 10.1);
— β-hidroxiacil-CoA (ciclo de Lynen, Seção 16.2).

Todas estas reações são catalisadas por desidrogenases que utilizam NAD^+ como coenzima.

O resultado da primeira reação catalisada pelo Complexo I é 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. A redução de FMN implica a retirada de um próton da matriz.

Continuando seu percurso, os elétrons do $FMNH_2$ são transferidos para os centros Fe-S e depois para a coenzima Q. Novamente, são consumidos prótons da matriz para converter CoQ em $CoQH_2$ (Figura 11.4).

Neste ponto, deve ser ressaltado um fenômeno essencial do transporte de elétrons, que é a movimentação concomitante de prótons, adicionais àqueles utilizados para a redução dos cofatores.

O Complexo I catalisa a primeira etapa da formação do gradiente de prótons: a transferência (exergônica) de elétrons do NADH à ubiquinona é acoplada à translocação (endergônica) de prótons através da membrana interna da mitocôndria para o espaço intermembranas. Admitindo-se que a estequiometria do processo seja de quatro prótons bombeados por dois elétrons transferidos ($4H^+/2e^-$), a reação catalisada pelo Complexo I pode ser resumida em:

$$NADH + H^+ \text{ (matriz)} + 4\ H^+ \text{ (matriz)} + Q \rightarrow NAD^+ + 4\ H^+ \text{ (espaço intermembranas)} + QH_2$$

O Complexo I atua como uma bomba de prótons, movida pelas reações redox que ocorrem nos seus centros de oxidação-redução. As hipóteses sobre como ocorre o acoplamento entre os dois processos estão analisadas na Seção 11.3.

O Complexo II oxida o succinato, transferindo seus elétrons também para a coenzima Q

O *Complexo II*, também denominado *succinato desidrogenase*, é uma enzima peculiar porque participa do ciclo de Krebs (Seção 10.1) e faz parte da cadeia respiratória. Ela catalisa a oxidação de succinato a fumarato, com redução de FAD a $FADH_2$. A oxidação do $FADH_2$ ocorre acoplada à redução da coenzima Q e, por esta razão, a enzima é ainda chamada

succinato-ubiquinona oxirredutase. A succinato desidrogenase (Figura 11.7) representa um segundo ponto de entrada de elétrons na cadeia respiratória; a reação por ela catalisada é:

$$\text{Succinato} + \text{CoQ} \rightarrow \text{Fumarato} + \text{CoQH}_2$$

A succinato desidrogenase, em muitos organismos, é constituída por uma porção esférica, que se projeta para a matriz mitocondrial, unida a um pedúnculo, imerso na membrana. Em vertebrados, o domínio hidrofílico consta de uma flavoproteína (FAD), que contém o sítio de ligação ao succinato, e de uma proteína ferro-enxofre, com três centros Fe-S dispostos linearmente. A porção hidrofóbica é formada por duas subunidades transmembrana e um grupo prostético heme *b*. O sítio de ligação da coenzima Q localiza-se entre os dois domínios da enzima.

Os elétrons e os prótons do succinato são transferidos para o FAD, que se reduz a $FADH_2$; os elétrons do $FADH_2$ são doados à série de centros Fe-S. Como os centros Fe-S não recebem prótons, os prótons presentes no $FADH_2$ são devolvidos à matriz mitocondrial. Os elétrons são finalmente recebidos por CoQ, que se liga a prótons da matriz e é reduzida a $CoQH_2$ (Figura 11.4). A participação do heme *b* nas reações redox permanece controversa.

Como não há translocação de prótons através da membrana interna durante as transferências de elétrons no Complexo II, ele não contribui para a formação do gradiente de prótons.

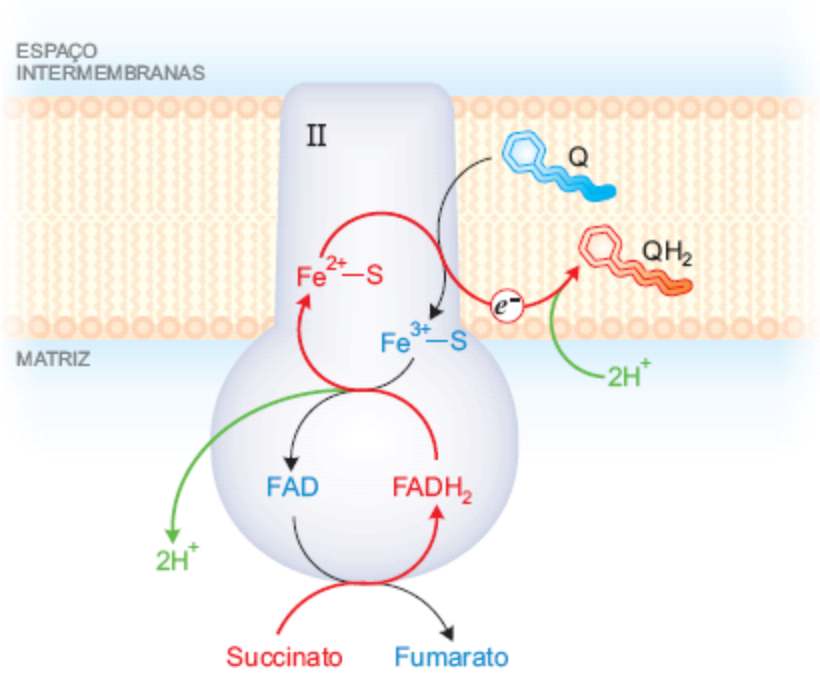


Figura 11.7 A succinato desidrogenase (Complexo II), que também participa do ciclo de Krebs, catalisa a oxidação do succinato por transferência dos elétrons (setas vermelhas) ao grupo prostético, FAD; a seguir são captados por centros Fe-S (a figura mostra um dos centros) e passados para a coenzima Q. O Complexo II não catalisa a extrusão de prótons.

A coenzima Q constitui um ponto de convergência de elétrons

A coenzima Q recebe os elétrons provenientes dos complexos I e II. Existem outras vias de transferência de elétrons para a CoQ (Figura 11.8). Em todas estas vias, o substrato é oxidado por uma desidrogenase (uma flavoproteína), com redução de FAD a $FADH_2$; os elétrons, depois de passarem por compostos intermediários, são entregues à CoQ.

Exemplos deste tipo de substrato são encontrados no metabolismo de triacilgliceróis (Seção 16.1). Um deles, o glicerol 3-fosfato, origina di-hidroxiacetona fosfato, por ação da *glicerol 3-fosfato desidrogenase*, localizada na face externa da membrana interna da mitocôndria. Neste caso, os elétrons do substrato passam diretamente do FAD para a coenzima Q. Outra via que reduz CoQ inicia-se com a oxidação de acil-CoA (primeira reação da β-oxidação de ácidos graxos — Seção 16.2), catalisada pela *acil-*

CoA desidrogenase, cuja coenzima, FAD, é reduzida. Os elétrons do $FADH_2$ são transferidos pela *ETF* (da denominação inglesa para *flavoproteína transferidora de elétrons*) para outra flavoproteína, que também contém um centro Fe-S, a *ETF-ubiquinona oxirredutase*, que, finalmente, doa o par de elétrons para CoQ.

Os elétrons das diferentes procedências descritas percorrem, a partir da coenzima Q, um caminho comum até o oxigênio.

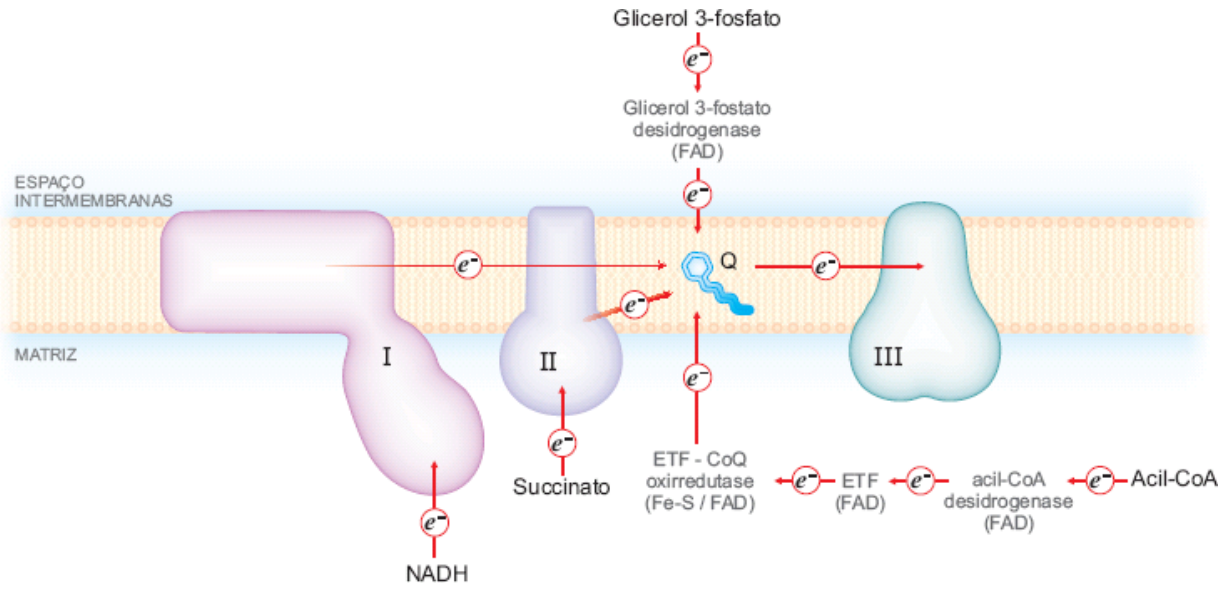


Figura 11.8 A coenzima Q é o ponto de convergência dos elétrons provenientes do NADH (via Complexo I), do succinato (via Complexo II), do glicerol 3-fosfato e de acil-CoA. ETF: flavoproteína transferidora de elétrons.

O Complexo III transfere elétrons da coenzima Q para o citocromo *c* e bombeia prótons

O Complexo III, ou *citocromo* bc_1 ou *ubiquinona-citocromo c oxirredutase*, catalisa a transferência de elétrons da ubiquinona ao citocromo *c* (Figura 11.1), acompanhada de movimentação de prótons. A enzima de mitocôndrias de mamíferos é formada pela associação de dois monômeros, cada um com 11 subunidades. Três das subunidades participam diretamente das reações redox: um citocromo *b*, com os grupos heme b_L (ou

b_{566}) e heme b_H (ou b_{562}), uma proteína Fe-S e o citocromo c_1. O citocromo *b* inclui, ainda, dois sítios para ligação da ubiquinona, descritos a seguir.

O acoplamento do transporte de elétrons à translocação de prótons pelo Complexo III é explicado pelo chamado *ciclo Q* (Figura 11.9). Este esquema baseia-se em um fenômeno inusitado, que é a separação dos elétrons de um composto ao ser oxidado. Na reação de oxidação de QH_2, seus elétrons seguem um caminho bifurcado: um elétron é transferido à proteína Fe-S e o outro, ao citocromo *b*. Como o centro Fe-S e o citocromo *b* recebem apenas elétrons, quando QH_2 é oxidada, dois prótons são liberados no espaço intermembranas e quando Q é reduzida, são retirados da matriz.

A enzima apresenta dois sítios distintos para ligação da ubiquinona, incluídos no citocromo *b*: um próximo à superfície externa da membrana e outro no lado interno da membrana, razão pela qual são denominados sítio Q_o (de ***o****utside*) e sítio Q_i (de ***i****nside*). O heme b_L, de menor potencial de redução, faz parte de Q_o e o heme b_H, com maior potencial de redução (Tabela 11.1), compõe o sítio Q_i.

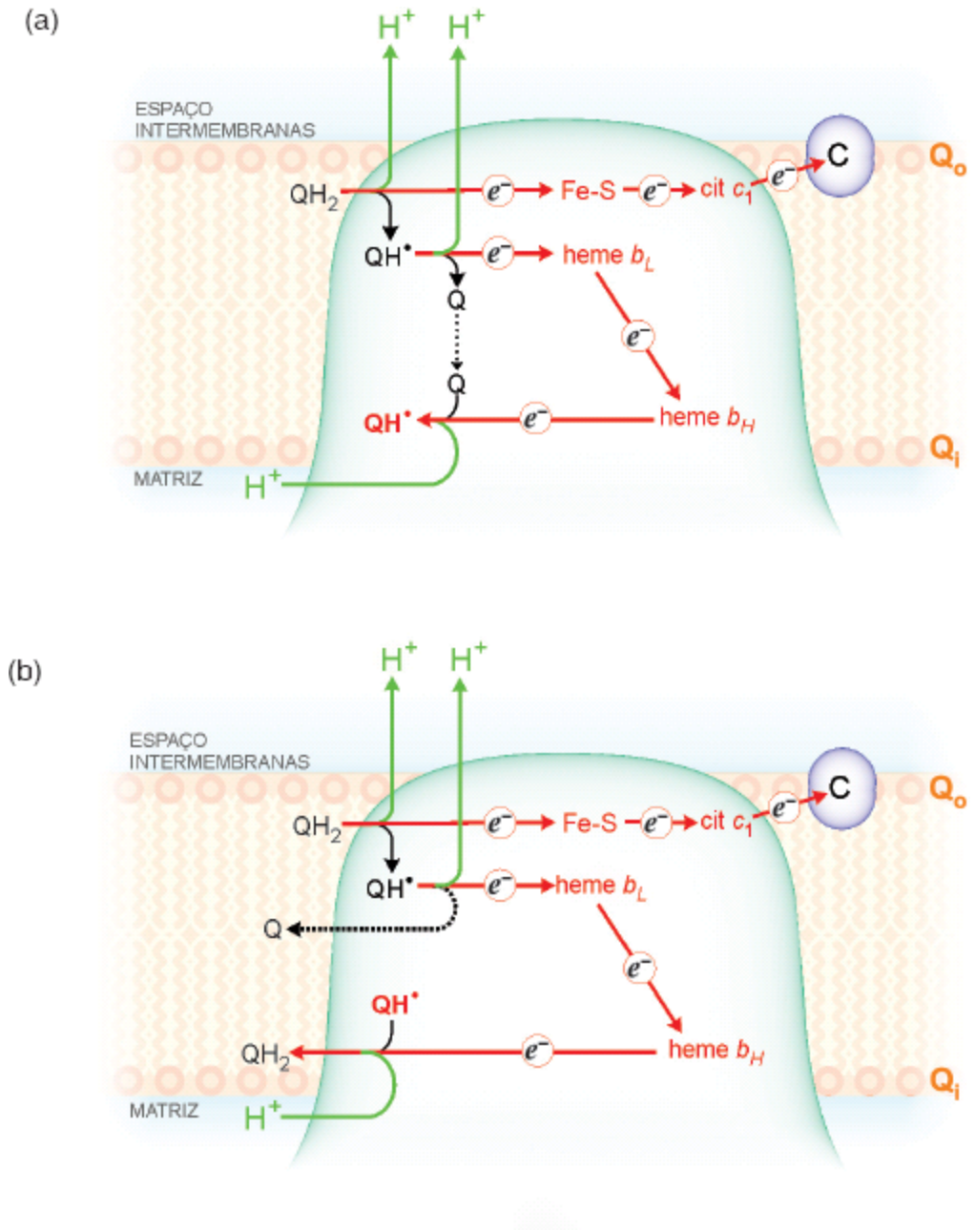


Figura 11.9 Transporte de elétrons da coenzima Q para o citocromo*c*, catalisado pelo Complexo III: o ciclo Q. Os elétrons de QH_2 são transferidos, um de cada vez, em duas etapas. (a) Primeira etapa: $QH_2 \rightarrow QH^{\bullet}$. (b) Segunda etapa: $QH_2 \rightarrow Q$ e $QH^{\bullet} \rightarrow QH_2$, o que equivale a $QH^{\bullet} \rightarrow Q$. As setas pontilhadas indicam os deslocamentos da forma Q: em (a), do sítio catalítico mais externo para o sítio mais interno e em (b), do interior do Complexo III para a bicamada lipídica. Dois prótons são consumidos da matriz e quatro, bombeados para o espaço intermembranas (setas verdes).

Para melhor entendimento, o ciclo Q pode ser desmembrado em duas etapas, correspondentes à oxidação consecutiva de duas moléculas de QH_2.

Na primeira etapa (Figura 11.9 a), QH_2, alojada no sítio Q_o, perde um elétron que segue a rota $QH_2 \rightarrow$ Fe-S $\rightarrow c_1 \rightarrow c$ e o H^+ é liberado no espaço intermembranas. A semiubiquinona resultante ($QH^{\bullet}$) entrega o seu elétron ao heme b_L e, por extrusão do próton, converte-se na forma oxidada, Q, que migra para o sítio Q_i (seta pontilhada). O elétron no heme b_L percorre a molécula de citocromo *b* até o heme b_H e, em seguida, reduz Q, então no sítio Q_i. Q reage com um H^+ da matriz, reconstituindo a semiubiquinona ($QH^{\bullet}$). Deste modo, a transferência de um dos elétrons de QH_2 para o citocromo *c* resulta na extrusão de 2 H^+ e no consumo de um H^+ da matriz para formar $QH^{\bullet}$, no sítio Q_i.

Na segunda etapa (Figura 11.9 b), outra molécula de QH_2 percorre a mesma sequência de reações da primeira etapa, até a passagem do elétron para os heme *b* e formação de Q. Na presente etapa, porém, Q deixa o Complexo III e retorna à bicamada lipídica (seta pontilhada). O elétron do heme b_H é doado para a semiubiquinona formada na etapa anterior ($QH^{\bullet}$), e, à custa de um H^+ do interior da mitocôndria, regenera QH_2. A redução da segunda molécula de citocromo *c* promove a extrusão de mais 2 H^+, o consumo de 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
$QH_2 \rightarrow QH^{\bullet}$	$QH^{\bullet} \rightarrow Q$
	$QH^{\bullet} \rightarrow QH_2$
cit *c* (Fe^{3+}) $\rightarrow$ cit *c* (Fe^{2+})	cit *c* (Fe^{3+}) $\rightarrow$ cit *c* (Fe^{2+})
1 H^+ matriz $\rightarrow$ 2 H^+ exterior	1 H^+ matriz $\rightarrow$ 2 H^+ exterior

1 H^+ matriz $\rightarrow$ 2 H^+ exterior

Deste modo, o Complexo III, ao oxidar a coenzima Q e reduzir o citocromo *c*, promove a retirada de dois prótons da matriz e o bombeamento de quatro prótons para o espaço intermembranas. Apesar de o ciclo Q ser um modelo amplamente aceito, restam ainda muitas dúvidas sobre o funcionamento do Complexo III.

O Complexo IV catalisa a redução do oxigênio a água, acoplada ao bombeamento de prótons

O Complexo IV, ou *citocromo c oxidase*, é a última enzima das cadeias de transporte de elétrons encontradas desde bactérias até eucariotos. Ela catalisa a passagem de elétrons do citocromo *c* para o oxigênio, combinada à extrusão de prótons.

Em mitocôndrias, a enzima constitui um dímero, sendo cada monômero formado por 13 subunidades proteicas e pelos centros redox: dois grupos heme, do tipo *a* e a_3, e três íons de cobre. Uma das subunidades inclui o sítio de ligação do citocromo *c*, além de dois íons de cobre, que se organizam em um centro binuclear, o *centro* Cu_A/Cu_A. Em outra subunidade, encontram-se os dois grupos heme e o terceiro íon de cobre; este íon e o heme a_3 são extremamente próximos e formam o *centro* a_3-Cu_B, ao qual se liga o oxigênio.

Na superfície externa da membrana interna da mitocôndria, elétrons provenientes do citocromo *c* ganham acesso ao Complexo IV (Figura 11.10) pelo centro Cu_A/Cu_A; deste são transferidos para o heme *a*, para o centro a_3-Cu_B e ao oxigênio, que é reduzido a água.

A redução de uma molécula de O_2 a duas moléculas de H_2O requer sua associação a quatro elétrons e quatro prótons. A transferência de cada elétron para o oxigênio é acompanhada da migração de um próton desde a matriz até o centro a_3-Cu_B da enzima para reduzir o oxigênio, e é acoplada à translocação de mais um próton da matriz através de toda a extensão da membrana. Em cada ciclo catalítico, 4 prótons são utilizados como substrato para a formação de água e 4 prótons são bombeados para o espaço intermembranas. Deste modo, o Complexo IV contribui para a formação do gradiente de prótons.

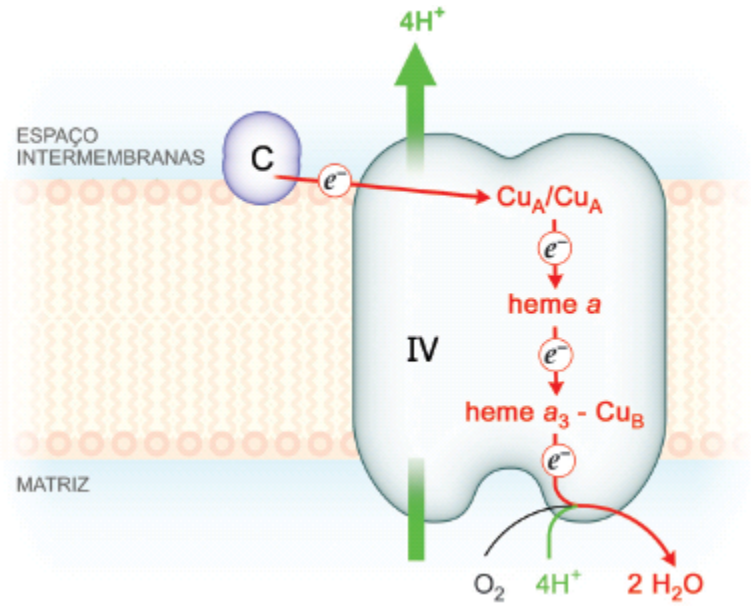


Figura 11.10 Caminho hipotético percorrido pelos elétrons no Complexo IV. Quatro elétrons provenientes do citocromo *c* são recebidos pelo centro Cu_A/Cu_A, em seguida transferidos para o heme *a* e depois para o centro a_3-Cu_B, onde, finalmente, seriam doados ao oxigênio. Este combina-se com prótons da matriz (seta verde fina), reduzindo-se a água. Ao transferir elétrons, o Complexo IV bombeia prótons para o espaço intermembranas (seta verde larga).

A reação catalisada pelo Complexo IV pode ser representada por:

$$4 \text{ cit } c^{2+} + 4H^+ \text{ (matriz)} + O_2 + 4H^+ \text{ (matriz)} \rightarrow 4 \text{ cit } c^{3+} + 2H_2O + 4H^+ \text{ (espaço intermembranas)}$$

Os detalhes dos processos de redução do oxigênio e de translocação de prótons, além da configuração dos canais de prótons, não são conhecidos.

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 300 mL diários. Em determinadas espécies, esta produção de água é fundamental para a sobrevivência, como nos casos de animais que hibernam ou de camelos, que podem passar vários dias sem ingerir água. Durante a hibernação, os animais oxidam basicamente os seus depósitos de gordura. A oxidação de ácidos graxos, por gerar grandes

quantidades de coenzimas reduzidas (Seção 16.2.1), fornece água, além de energia — para cada par de elétrons transferidos do NADH e do $FADH_2$ para o oxigênio, há produção de uma molécula de H_2O, além de ATP a partir de ADP e fosfato (Seção 11.3), síntese esta que forma mais três moléculas de H_2O no caso do NADH e duas, para o $FADH_2$.

Os complexos transportadores de elétrons podem formar supercomplexos

O modelo de organização da cadeia respiratória segundo o qual os complexos transportadores de elétrons encontram-se dispersos na membrana interna da mitocôndria, sendo conectados pelos transportadores móveis (ubiquinona e citocromo *c*) é amplamente aceito. Todavia, trabalhos recentes demonstram, em diversos organismos, a existência de estruturas supramoleculares, formadas pela união de complexos específicos, denominadas *supercomplexos respiratórios* ou *respirassomos*. Essas estruturas propiciariam a redução da distância para a difusão dos transportadores móveis, otimizando o fluxo de elétrons entre os complexos. Além das vantagens cinéticas, impediriam a formação excessiva de radicais livres. A associação entre os complexos é fortemente influenciada pela composição de lipídios da membrana que, por sua vez, depende dos lipídios presentes na dieta (Seção 18.2.4). Como há controvérsias sobre esta nova proposição, o primeiro modelo é o considerado neste texto.

11.2.1 Radicais livres

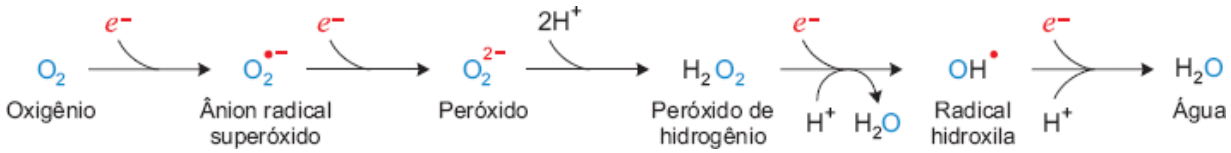
A redução parcial do oxigênio gera radicais livres

A transferência de quatro elétrons ao oxigênio, processada no Complexo IV, resulta na sua redução a água, por associação a quatro prótons. Todavia, à medida que os elétrons percorrem a cadeia respiratória, pode haver vazamento de elétrons que promovem a redução monoeletrônica do O_2 dissolvido na matriz mitocondrial, originando radicais livres, que podem causar dano severo às células.

Radical livre é uma espécie química capaz de existência independente (daí a denominação *livre*) e que contém um ou mais elétrons não pareados no orbital externo. Essas espécies, em geral, são instáveis (meia-vida da

ordem de nanosegundos) e altamente reativas; ao reagirem com uma molécula, geram outro radical livre, iniciando uma reação em cadeia. Sua fórmula química é acompanhada de um ponto, representando o elétron não pareado. Alguns exemplos são o *ânion radical superóxido* e o *radical hidroxila*.

A adição de um elétron ao oxigênio molecular origina o ânion radical superóxido que, recebendo um elétron, gera o ânion peróxido; este protona-se, originando o peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é um oxidante potente e, embora não seja um radical livre, pode originar o radical hidroxila, um dos radicais livres mais reativos conhecidos.



O ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila são chamados, conjuntamente, de *espécies reativas de oxigênio* (*ROS*, da denominação inglesa).

Em contraposição à geração de radicais livres por transferência monoeletrônica ao oxigênio dissolvido, a redução do oxigênio a água, catalisada pela citocromo *c* oxidase, apesar de envolver transferências de *um* elétron, ocorre sem que haja liberação de formas parcialmente reduzidas de oxigênio — os intermediários da reação permanecem firmemente ligados ao centro ativo da enzima, até que a água seja produzida. Por outro lado, há produção do radical superóxido nos Complexos I e III (em plantas, também no Complexo II), por reação da forma semiquinona da coenzima Q ou do FMN com oxigênio. Este processo é intensificado quando o gradiente eletroquímico torna-se elevado, por falta de ADP (Seção 11.4): a inibição resultante da cadeia de transporte de elétrons acarreta um aumento da meia-vida de intermediários com elétrons não pareados, capazes de reduzir O_2 a $O_2^{\bullet -}$.

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial é considerada, geralmente, como a maior fonte endógena de espécies reativas de oxigênio. Todavia, também são formadas em quantidades significativas nos peroxissomos, no retículo endoplasmático e nas membranas celulares.

Fatores externos ao organismo, como radiação cósmica, poluição ambiental e muitas drogas também podem levar à produção de radicais livres.

A formação de espécies reativas de oxigênio é um processo natural e inevitável nos organismos aeróbios. Estima-se que de 0,1 a 2% do oxigênio consumido por mitocôndrias seja convertido em radical superóxido, embora esses valores sejam questionados. Pelo dano que as espécies reativas de oxigênio provocam nas moléculas e, por consequência, nas estruturas celulares, presume-se que as células não seriam viáveis se não dispusessem de processos para decompô-las. Realmente, as células aeróbias dispõem de sistemas para a dissipação de radicais livres, que incluem enzimas e antioxidantes de baixa massa molar, e também de proteínas desacopladoras (Seção 11.5) para minimizar a sua produção na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

A reação de decomposição chama-se *dismutação* e consiste na reação entre dois radicais livres, gerando produtos não radicalares. Uma das enzimas capazes de promover esta reação é a *superóxido dismutase*, que catalisa a dismutação de radicais superóxidos:

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

A enzima é encontrada em todas as células aeróbias. Coerentemente, as bactérias anaeróbias estritas não sintetizam esta enzima.

A *catalase* decompõe peróxido de hidrogênio em oxigênio e água:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$$

A ação conjunta da *superóxido dismutase* e da *catalase* converte superóxido em água.

Outra enzima que catalisa a redução de H_2O_2 e de peróxidos de lipídios é a *glutationa peroxidase*, descrita na Seção 12.3.

Além de enzimas, o organismo humano conta com uma segunda linha de proteção contra as espécies reativas de oxigênio: os antioxidantes de baixa massa molar (em comparação com as enzimas). São compostos presentes nos alimentos de origem vegetal, dentre os quais se destacam: as *vitaminas A,C, E* (Seção 18.4), os carotenos (β-*caroteno*, precursor da vitamina A — Seção 15.2 —, e *licopeno*), os *polifenóis* (*resveratrol* e

flavonoides) etc. A eficácia da utilização desses antioxidantes para impedir os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio, apesar de intensamente pesquisada, permanece inconclusiva.

Em condições normais do metabolismo celular, os mecanismos de defesa contra radicais livres permitem homeostase. Mas, quando há um aumento na produção dessas espécies, a capacidade protetora das enzimas e dos antioxidantes é ultrapassada, resultando em estresse oxidativo.

Como as espécies reativas de oxigênio reagem indiscriminadamente com uma grande variedade de componentes celulares e causam danos cumulativos, elas têm sido implicadas na etiologia do envelhecimento, de doenças neurodegenerativas (doenças de Parkinson e de Alzheimer) e cardiovasculares, de câncer etc. Os antioxidantes, há mais de 30 anos, vêm sendo testados como potenciais agentes na prevenção de tais doenças. Entretanto, a conclusão de estudos epidemiológicos amplos em seres humanos é que não trazem benefícios importantes e podem até ser danosos; por exemplo, a vitamina C, em doses elevadas, atua como pró-oxidante. Assim, os conhecimentos atuais não permitem recomendar suplementação desses antioxidantes.

As espécies reativas de oxigênio também têm funções biológicas importantes

O conceito tradicional de que as espécies reativas de oxigênio (ROS) atuem unicamente como agentes oxidantes, levando à disfunção de órgãos e tecidos, tem sido revisto. Na realidade, elas desempenham um duplo papel nas células aeróbias, atuando também como importantes entidades sinalizadoras em diversos processos fisiológicos essenciais. Ainda mais, os organismos são capazes de utilizar a alta reatividade das ROS, de maneira controlada, em situações específicas.

O exemplo clássico de uma função essencial desempenhada pelas ROS é o combate a infecções bacterianas. Nas células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos, uma enzima muito ativa, a NADPH oxidase, catalisa a transferência de elétrons do NADPH ao oxigênio, com produção de grandes quantidades de radical superóxido e água oxigenada, que eliminam as bactérias fagocitadas.

As NADPH oxidases são uma família de enzimas, cuja função primária é a produção de ROS. Diferem da maioria das enzimas que produzem ROS

como um subproduto de sua atividade catalítica normal, como as da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. A descoberta de que as NADPH oxidases são expressas na maioria das células de mamíferos levou à verificação da participação das ROS na regulação de muitos processos, como migração e proliferação de células, modificação pós-tradução de proteínas, modulação de cascatas de sinalização, síntese de hormônios etc.

Quando a atividade das enzimas intrinsecamente produtoras de ROS, como as NADPH oxidases, é exacerbada, instalam-se o estresse oxidativo e as moléstias a ele associadas. Para combater tais situações, diversos fármacos têm sido testados como inibidores dessas enzimas. A inibição da síntese de ROS seria uma abordagem alternativa à utilização de antioxidantes convencionais para a neutralização dessas espécies, uma vez formadas, tendo em vista a baixa eficácia clínica dos antioxidantes convencionais e seus paradoxais efeitos pró-oxidantes.

Ainda em relação à prevenção do acúmulo de ROS, os organismos aeróbios contam com a proteção natural das proteínas desacopladoras. Elas permitem manter níveis não tóxicos de ROS, mas compatíveis com a participação dessas espécies no controle dos processos citados, além de outros que serão analisados na Seção 11.5.

11.3 Fosforilação oxidativa

As transferências de elétrons de um componente da cadeia de transporte de elétrons para o seguinte constituem reações de oxidação-redução termodinamicamente favoráveis (Seções 11.1 e 11.2). A síntese de ATP ou *fosforilação oxidativa* (de "*fosforilação* de ADP à custa da *oxidação* de coenzimas"), que é endergônica, é acoplada a essas reações de oxidação-redução.

11.3.1 Hipótese quimiosmótica

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 *hipótese quimiosmótica*, proposta por Peter Mitchell em 1961.

Segundo esta hipótese, a energia do transporte de elétrons é utilizada para bombear prótons do interior da mitocôndria através da membrana interna, que é virtualmente impermeável a prótons, para o espaço intermembranas (Figura 11.11). O transporte de H^+ ocorre contragradiente, sendo um processo endergônico. A movimentação unidirecional é possível por estar acoplada à transferência exergônica de elétrons e graças à disposição assimétrica dos complexos transportadores de elétrons em relação às duas faces da membrana interna.

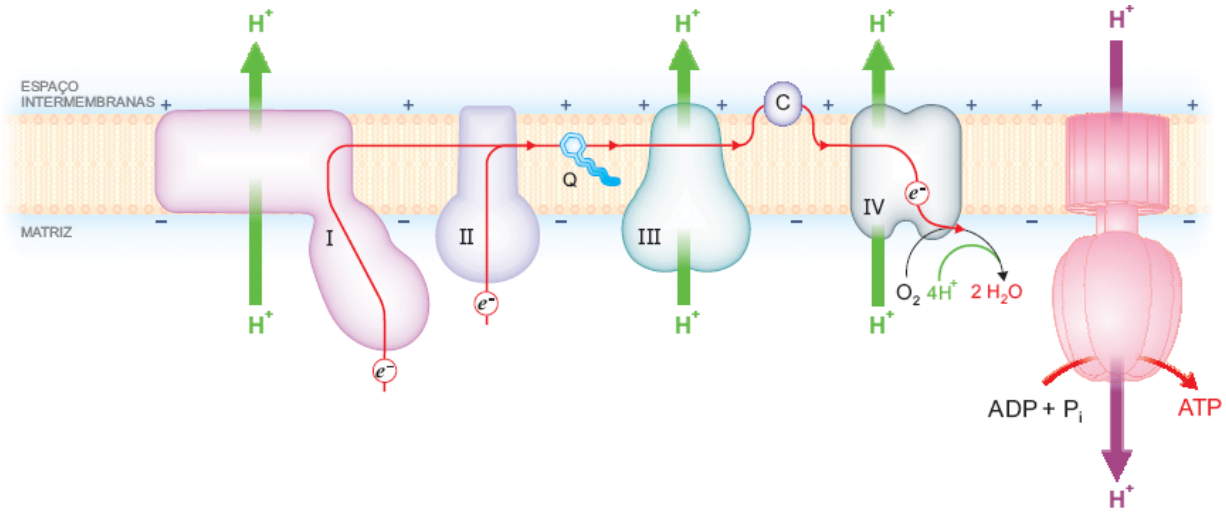


Figura 11.11 Esquema mostrando o bombeamento de prótons (setas verdes) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas pelos complexos I, III e IV, à custa da energia derivada do transporte de elétrons (setas vermelhas). O gradiente de prótons (concentração maior de H^+ no espaço intermembranas) e o gradiente elétrico (face interna da membrana interna mais negativa) constituem a força próton-motriz que é utilizada para sintetizar ATP pela ATP sintase, a única via de acesso de prótons para a matriz (seta roxa).

A consequência do bombeamento é a produção de um *gradiente de prótons*, isto é, uma concentração de prótons maior no espaço intermembranas do que na matriz mitocondrial. Em mitocôndrias isoladas consumindo O_2 ativamente, o pH externo chega a ser uma unidade menor do que o pH da matriz. A face da membrana interna voltada para a matriz fica 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 no *gradiente eletroquímico* resultante é chamada de *força próton-motriz*, constituída 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 processo espontâneo, a favor do gradiente eletroquímico, que libera energia capaz de levar à síntese de ATP. Entretanto, a membrana interna da mitocôndria é impermeável a prótons em toda a sua extensão, *exceto* em sítios específicos, constituídos pelo complexo sintetizador de ATP, a *ATP sintase* (Figura 11.11) — é somente por este canal que os prótons podem atravessar a membrana, de volta à matriz, e desfazer o gradiente. A ATP sintase catalisa a formação de ATP quando os prótons atravessam a enzima, em direção ao interior da mitocôndria.

A variação de energia livre associada ao transporte de um próton através da membrana interna da mitocôndria pode ser determinada a partir da diferença de pH e do potencial de membrana estabelecidos em mitocôndrias consumindo oxigênio; tais medidas indicam um valor próximo de 20 kJ · mol^{-1}. Considerando-se que cerca de 60 kJ · mol^{-1} são consumidos para a síntese de ATP nas condições intracelulares, teoricamente seria necessária a passagem de três prótons pela ATP sintase para cada ATP sintetizado; todavia, os resultados disponíveis para diferentes organismos variam de 3,3 a 5 prótons. A hipótese quimiosmótica vem sendo consubstanciada por 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 (Figura 11.13 b). A síntese de ATP pode ser obtida mesmo na ausência de transporte de elétrons, desde que exista o gradiente de prótons. Esta verificação também é feita pelo uso de vesículas invertidas. Quando se adiciona álcali ao meio de suspensão destas vesículas, a concentração de H^1 diminui; como a concentração interna de H^1 permanece constante, é gerado momentaneamente um gradiente de prótons.

Há extrusão de prótons pela ATP sintase, acompanhada de síntese de ATP, que pode ser detectado no exterior das vesículas.

O exato funcionamento das bombas de prótons permanece indeterminado

A extrusão de prótons através da membrana interna da mitocôndria é feita pelos Complexos I, III e IV (Seção 11.2). Este fato pôde ser verificado experimentalmente pela utilização de lipossomos (Seção 7.1), aos quais foram incorporados isoladamente cada um destes complexos. Nestes experimentos foi possível demonstrar que transferências de elétrons envolvendo cada um dos três complexos são acompanhadas de translocação de prótons através da membrana das vesículas e que, portanto, são estes complexos as bombas de prótons geradoras do gradiente. Entretanto, o mecanismo molecular do acoplamento entre os dois processos ainda é objeto de controvérsia. Segue-se a descrição de duas hipóteses explicativas existentes.

O modelo do *acoplamento direto* (redox-dependente) propõe que os centros de oxidação-redução dos complexos mitocondriais são diretamente envolvidos na translocação de prótons: ao serem reduzidos, captam prótons da matriz mitocondrial e, ao transferirem elétrons para o componente seguinte da cadeia, liberam prótons no espaço intermembranas. Ou seja, a bomba de prótons e o centro de oxidação-redução constituem uma entidade funcional única, cujo estado de oxidação-redução induz protonação ou desprotonação. Esta possibilidade seria consistente com o bombeamento de prótons pelos Complexos I e III, como já apontado neste texto. Em contrapartida, parece pouco apropriado para o Complexo IV, que não dispõe de grupos prostéticos que apresentem prótons no estado reduzido — o Complexo IV é formado de citocromos e íons de cobre, transportadores apenas de elétrons.

Outra hipótese postula o *acoplamento indireto* (conformação-dependente), segundo o qual o centro redox e o módulo que bombeia prótons são distintos e distantes um do outro. A transdução de energia ocorre via mudanças conformacionais: os complexos transportadores de elétrons assumem configurações diferentes nos estados oxidado e reduzido.

De acordo com esta hipótese, a enzima transportadora, ao receber ou doar elétrons, sofre alterações estruturais que provocam mudanças no valor

de pK_a de grupos ionizáveis-chave e também na disposição destes grupos em relação à membrana interna da mitocôndria, resultando na translocação de prótons. Eles são denominados *grupos redox-Bohr*, em analogia às cadeias laterais de aminoácidos da hemoglobina responsáveis pelo efeito Bohr (Seção 3.3). As cadeias laterais, expostas na face interna da membrana, ao receberem elétrons, ligam-se a prótons (pK_a maior) da matriz. A perda de elétrons inverte a posição das cadeias, que passam a ficar expostas na face externa da membrana, e diminui a sua afinidade por prótons (pK_a menor), que são liberados no espaço intermembranas. O complexo volta à sua conformação anterior e os elétrons prosseguem seu caminho pela cadeia.

Essas mudanças conformacionais no ambiente proteico local são transmitidas até as bombas de H^+, distantes dos centros redox, que são ativadas. Postula-se que a atuação dos Complexos I e IV segue o modelo do acoplamento indireto.

A organização dos transportadores de elétrons em supercomplexos respiratórios veio complicar ainda mais a compreensão do acoplamento entre as transferências de elétrons e a translocação de prótons.

A razão P/O revela a estequiometria da fosforilação oxidativa

A variação de energia livre associada à transferência de elétrons através de cada um dos Complexos I, III e IV corresponde a uma força próton-motriz suficientemente grande para promover a síntese de ATP (Figura 11.12). Para cada NADH que se oxida, ou seja, para cada par de elétrons transportados pelos três complexos até o oxigênio, há síntese de 3 ATP.

Pode-se chegar a esta mesma conclusão medindo-se o número de moléculas de ATP formadas e o número de átomos de oxigênio consumidos na oxidação de diferentes substratos; o quociente entre estes valores é chamado *razão P/O* — entre fosfato (***p****hosphate*) incorporado em ATP e ***o****xigênio* utilizado.

A razão P/O é uma medida da eficiência da fosforilação oxidativa. Quando o substrato é o NADH, cujos elétrons passam pelos Complexos I, III e IV até chegarem ao oxigênio, a razão 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 razão

P/O do succinato é 2. As equações respectivas de oxidação, incluindo os prótons bombeados, são:

$$\text{NADH} + \text{H}^+ + 10\,\text{H}^+\,(\text{matriz}) + 1/2\,\text{O}_2 + 3\,\text{ADP} + 3\,\text{P}_i + 3\,\text{H}^+ \longrightarrow \text{NAD}^+ + 10\,\text{H}^+\,(\text{espaço intermembranas}) + 3\,\text{ATP} + 4\,\text{H}_2\text{O}$$

$$\text{FADH}_2 + 6\,\text{H}^+\,(\text{matriz}) + 1/2\,\text{O}_2 + 2\,\text{ADP} + 2\,\text{P}_i + 2\,\text{H}^+ \longrightarrow \text{FAD} + 6\,\text{H}^+\,(\text{espaço intermembranas}) + 2\,\text{ATP} + 3\,\text{H}_2\text{O}$$

Como a determinação experimental da razão P/O é sujeita a diversos fatores causadores de erro, durante muito tempo, os valores da razão P/O para NADH (3) e succinato (2) foram questionados. Esses números foram revistos a partir da estequiometria do transporte de prótons. Os resultados de consenso estabelecem que, para cada par de elétrons transferidos ao oxigênio, formando uma molécula de água, 4 H^+ são bombeados pelo Complexo I, 4 pelo Complexo III e 2 pelo Complexo IV — na oxidação de NADH, há extrusão de 10 H^+e na de succinato, 6. Outro dado verificado em mitocôndrias de células animais é que a síntese de uma molécula de ATP requer o retorno de 4 H^1 para a matriz mitocondrial, sendo 3 H^+pela ATP sintase e um para o transporte dos substratos e produto da reação (Seção 11.10). A razão P/O baseada na translocação de prótons torna-se igual a 2,5 (10/4) para o NADH e 1,5 (6/4) para o succinato. Trabalhos muito recentes indicam números próximos, iguais a 2,7 e 1,6, respectivamente. Esta nova revisão da razão P/O deriva de estudos da estrutura atômica de diferentes ATP sintases.

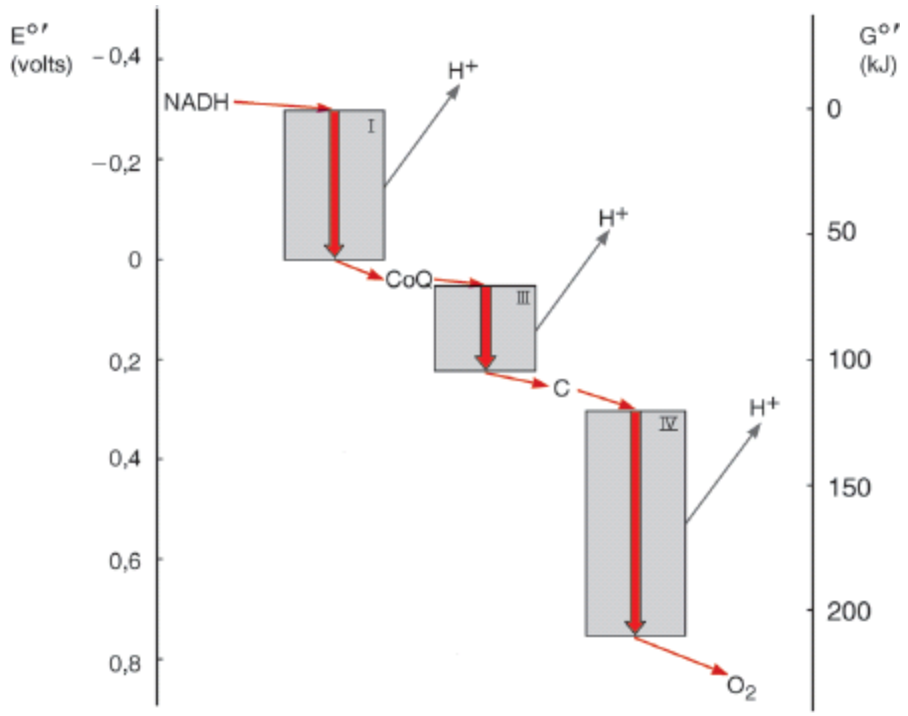


Figura 11.12 Diagrama mostrando valores de potencial de redução padrão (E°′) e de energia livre padrão (G°′) referentes ao transporte dos elétrons do NADH ao oxigênio. A variação de energia livre padrão (ΔG°′) de cada etapa pode ser estimada a partir da ordenada à direita (G°′). Nas etapas de que participam 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.

Como a questão ainda não está totalmente esclarecida e como os valores de produção de ATP servem principalmente para comparações, neste texto serão adotados sempre os valores inteiros de P/O: 3 para o NADH e 2 para succinato.

11.3.2 ATP sintase

A ATP sintase é formada por dois componentes, F_1 e F_0

Em micrografias eletrônicas, pode-se observar que a face interna da membrana interna da mitocôndria é recoberta por microesferas, conectadas à membrana por pequenas hastes. O tratamento de preparações de

mitocôndrias com ultrassom produz fragmentos de membrana que formam, espontaneamente, *vesículas invertidas*, nas quais a face com as microesferas situa-se do lado de fora (Figura 11.13). Estas vesículas são capazes de efetuar o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa. Se as microesferas forem removidas das vesículas, estas 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 de ATP. Estas experiências demonstram a localização da ATP sintase (na realidade, de parte da enzima) nas microesferas.

Nos organismos analisados, a ATP sintase compreende dois componentes, cada um constituído por várias subunidades proteicas. Uma porção periférica, chamada *fator de acoplamento 1 (F_1)*, corresponde às microesferas e suas hastes, visíveis ao microscópio eletrônico. A segunda porção fica embebida na membrana — plasmática de bactérias, tilacoide de cloroplastos (Seção 15.2) e interna de mitocôndrias — e é denominada F_O, com a letra ***o*** subscrita, porque inclui, em mitocôndrias, uma subunidade que se liga a ***o****ligomicina*, um inibidor da ATP sintase. As ATP sintases têm, basicamente, a mesma estrutura, sendo que as enzimas de eucariotos apresentam subunidades adicionais às de procariotos. Recentemente, à semelhança do que foi verificado com os complexos transportadores de elétrons, demonstrou-se a existência de dímeros e outras formas oligoméricas da ATP sintase mitocondrial, cujo significado fisiológico é desconhecido.

A Figura 11.14 mostra um esquema da estrutura da ATP sintase de *Escherichia coli*. F_1, que se projeta para o citoplasma da célula bacteriana, é formado pelas subunidades $\alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon$; as seis subunidades maiores (três α e três β) dispõem-se, alternadamente, em um círculo ao redor da subunidade γ, que, por sua vez, está associada à subunidade ε;o hexâmero α_3-β_3 estabelece contato também com a subunidade δ. F_O, inserido na membrana plasmática, consta das subunidades $a\ b_2\ c_{10}$. As dez subunidades *c* compõem uma estrutura em anel e interagem com a subunidade *a*, que se liga ao dímero b_2. F_1 e F_O são unidos por um eixo central, constituído pelas subunidades γ e ε, e por um eixo lateral, com as subunidades δ e b_2.

F_1 catalisa a síntese de ATP por meio de três sítios ativos, um em cada subunidade β, junto a uma interface α/β; F_O contém os canais de passagem (de entrada e de saída) de prótons.

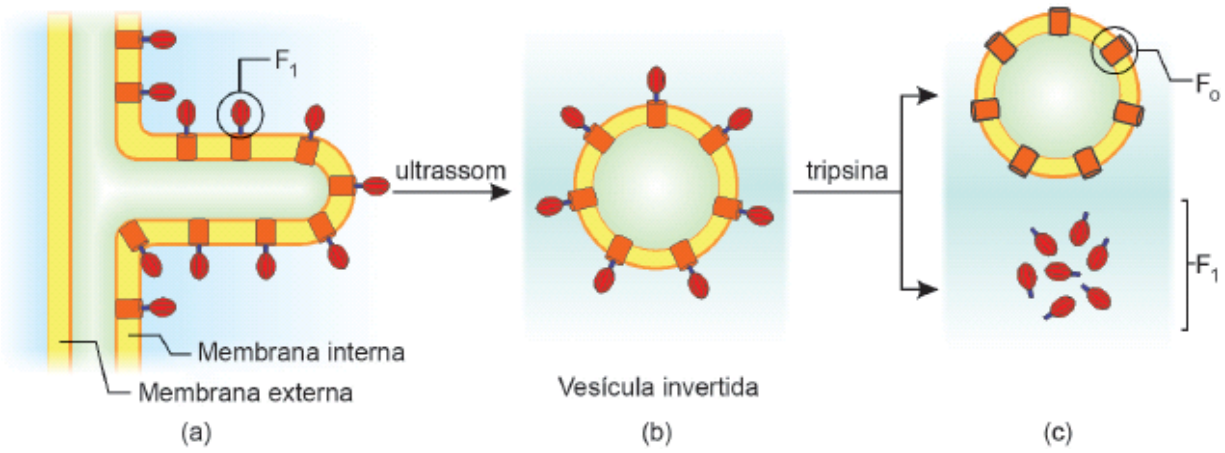


Figura 11.13 Microesferas da membrana interna da mitocôndria e ATP sintase. (a) A membrana interna é recoberta por microesferas com pequenas hastes, voltadas para a matriz mitocondrial — o esquema mostra uma das numerosas invaginações desta membrana, chamadas *cristas*. (b) Formação de vesículas invertidas por tratamento de mitocôndrias com ultrassom. (c) As microesferas e suas hastes, formadas pelo componente F_1 da ATP sintase, podem ser removidas por diversos tratamentos, por exemplo, com tripsina, e mantêm sua atividade catalítica; as vesículas mantêm, inserido na membrana, o componente F_O da ATP sintase.

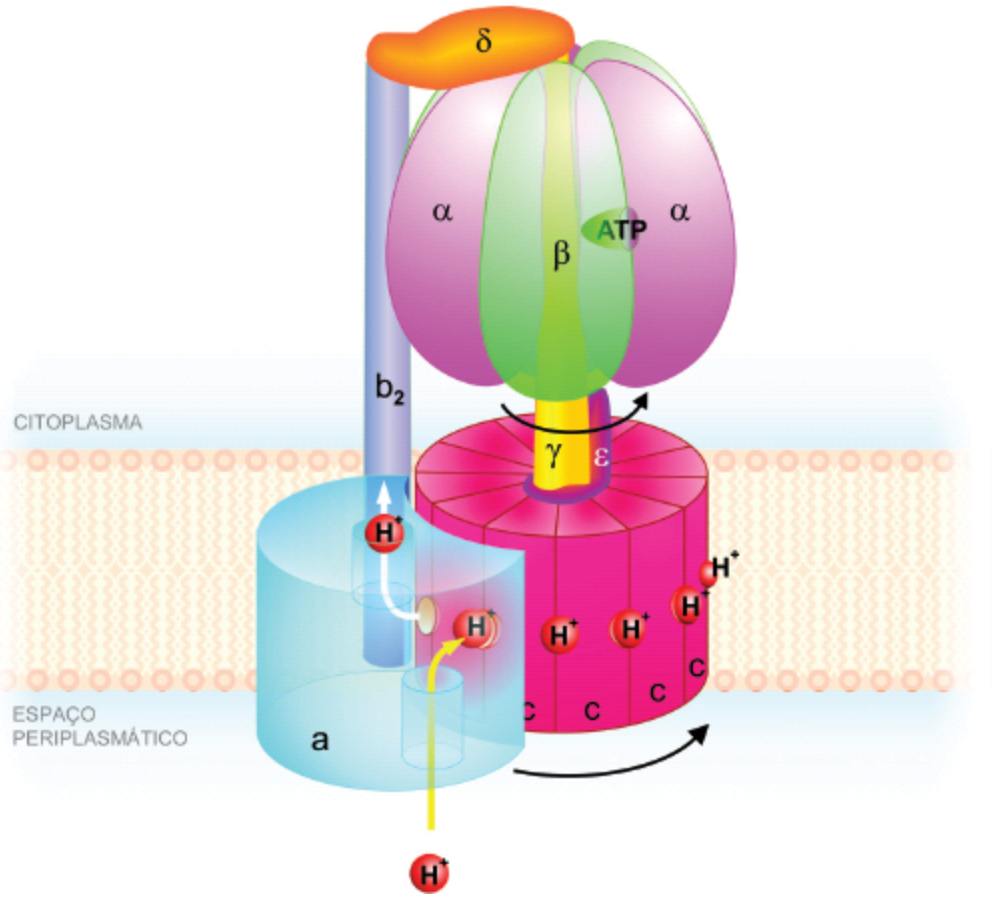


Figura 11.14 Modelo da ATP sintase de *Escherichia coli*. A enzima consiste em oito subunidades diferentes, com a estequiometria $\alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon\ a\ b_2\ c_{10}$. $F_1 = \alpha_3\ \beta_3\ \gamma\ \delta\ \varepsilon$; $F_O = a\ b_2\ c_{10}$. A porção F_1 estende-se da superfície interna da membrana plasmática para o citoplasma e F_O fica incluído na membrana. A maior parte da subunidade γ fica inserida na cavidade central do conjunto α_3-β_3; sua extremidade próxima à membrana interage com ε e o anel de subunidades *c* — o conjunto γ-ε-c_{10} atua como rotor. A subunidade δ associa-se com o hexâmero α_3-β_3 e o dímero b_2, e este liga-se à subunidade *a* — o conjunto α_3-β_3-δ-b_2-*a* é o estator. A subunidade *a* contém os canais de entrada (seta amarela) e de saída (seta branca) de prótons, situados, respectivamente, na superfície externa (voltada para o espaço periplasmático) e interna (em contato com o citoplasma) da membrana plasmática. Eles ganham acesso à membrana através do canal de entrada, ligam-se às subunidades *c*, provocando a sua rotação, e, após um giro completo, são liberados no citoplasma, através do canal de saída de prótons. A rotação de c_{10} faz girar a subunidade γ no centro de α_3-β_3, o que causa as

mudanças conformacionais dos sítios catalíticos, necessárias à síntese de ATP (apenas um dos três sítios está representado). (Adaptada de Hutcheon ML *et al*.: *Proc Natl Acad Sci USA* **98** (15): 8519-8524, 2001.)

A ATP sintase atua como um nanomotor rotatório

Como a energia liberada pela passagem de prótons através da ATP sintase é aproveitada para promover a reação entre ADP e fosfato (P_i) continua uma incógnita no nível molecular. A sequência provável dos eventos na enzima de *Escherichia coli* é descrita a seguir e na Figura 11.14.

A reação ocorre em três etapas e os três sítios catalíticos de F_1 podem apresentar-se em três conformações — cada etapa é cumprida por uma conformação específica. Durante a catálise, cada um dos sítios assume, sequencialmente, uma configuração, de tal modo que, em um dado instante, etapas diferentes estão ocorrendo nos três sítios. As etapas seriam: ligação dos substratos (ADP e P_i), formação da ligação anidrido fosfórico e liberação do ATP sintetizado. As mudanças conformacionais dos sítios catalíticos resultam de movimentação de elementos estruturais da enzima, à custa da energia fornecida pela movimentação de prótons a favor do gradiente.

Em F_O, a subunidade *a* contém, na interface com as subunidades *c*, dois canais de passagem de prótons, cada um acessível de um lado diferente da membrana — o *canal de entrada* no lado externo, periplasmático[1], da membrana e o *canal de saída* no lado interno, citoplasmático, da membrana. Para atravessar a membrana, os prótons penetram no canal de entrada e ligam-se a cadeias laterais de aminoácidos (protonação) das subunidades *c*, fazendo girar o anel c_{10}. Após um giro completo, que resulta no retorno à interface *a*-*c* e no alinhamento com o canal de saída, os prótons são liberados (desprotonação) no citoplasma.

A rotação do anel c_{10} movimenta o eixo central, formado pelas subunidades γ e ε, que são associadas ao anel. Como a subunidade γ fica encaixada no centro da estrutura globular α_3-β_3, ao girar, ela interage, sucessivamente, com as subunidades α_3-β_3, causando as alterações de conformação dos sítios catalíticos. A cada rotação de 120º, os sítios alternam suas propriedades catalíticas.

Resumindo, a rotação do anel c_{10} em relação à subunidade *a* em F_O determina a rotação do eixo central em relação ao hexâmero α_3-$\beta_3$em F_1. Em analogia a uma máquina motriz, as subunidades γ-ε-c_{10} constituem o *rotor* e o conjunto α_3-β_3-δ-b_2-*a*, o *estator* (a parte de um motor que não gira durante o seu funcionamento). A passagem de prótons por F_O faz girar o rotor, que se move em relação às subunidades estacionárias. O eixo lateral δ-b_2 mantém estáticos: o hexâmero α_3-β_3, enquanto o eixo central γ–ε gira dentro dele, e a subunidade *a*, enquanto o anel c_{10} *r*roda, impedindo que α_3-β_3 e *a*girem junto com o rotor. A movimentação do rotor em relação ao cilindro α_3-β_3 e à subunidade *a* determina, respectivamente, a ativação dos sítios catalíticos e o transporte de prótons.

A prova decisiva sobre o funcionamento da ATP sintase foi obtida por visualização direta da rotação de uma única molécula de enzima. O movimento pôde ser filmado ao microscópio graças a um filamento fluorescente de actina ligado à subunidade γ, que funcionava como marcador. Muitos aspectos do mecanismo catalítico da ATP sintase, investigado há décadas, continuam desconhecidos. Todavia, há consenso que F_O e F_1 são mecanicamente acoplados por um rotor, cujo movimento determina a função a ser desempenhada por cada sítio catalítico. *Em outras palavras, a ATP sintase converte a energia eletroquímica armazenada no gradiente de prótons em energia mecânica, que é utilizada para gerar energia química sob a forma de ATP.*

Em bactérias, sob determinadas condições fisiológicas, a ATP sintase catalisa a hidrólise de ATP, em vez da sua síntese. Realmente, a reação promovida pela enzima é reversível e muito do que se sabe sobre o seu funcionamento resultou da análise da reação ocorrendo no sentido da hidrólise de ATP. Resultados recentes indicam que, durante a hidrólise de ATP, o fosfato (P_i) é liberado ao término da terceira etapa catalítica (terceiro giro de 120°), depois do ADP. Ou seja, quando ocorre a síntese de ATP, o primeiro substrato a ligar-se a um sítio ativo vazio é o P_i. Ainda mais, a ligação de P_i provocaria impedimentos estéricos à ligação de ATP, permitindo apenas a de ADP. Estas constatações permitem explicar como a ATP sintase consegue ligar ADP eficientemente, sabendo-se que um sítio

vazio tem afinidade semelhante por ATP e ADP e que a concentração intracelular de ATP é cerca de 10 vezes maior que a de ADP.

A estrutura de F_0 determina a eficiência da fosforilação oxidativa (a razão P/O)

Uma questão discutida desde 1950, e ainda não resolvida, refere-se ao número de H^+ que devem atravessar a ATP sintase para acarretar a síntese de um ATP. A elucidação da estrutura de diferentes ATP sintases tem contribuído para resolver este problema.

Ao contrário do que era previsto para uma proteína bastante conservada como a ATP sintase, o número de subunidades do anel *c* é muito variável. Como cada subunidade *c* contém um grupamento envolvido nos eventos de protonação/desprotonação, o número de H^+ translocados para ocorrer uma rotação de 360° é igual ao número de subunidades do anel *c*. A cada rotação de 360° do eixo central, três moléculas de ATP são formadas nos três sítios catalíticos das subunidades αβ em F_1. Deste modo, o número de H^+ que devem ser translocados para a síntese de um ATP (razão H^+/ATP) é igual ao número de subunidades *c* em F_O, dividido por três. Já foram descritos anéis *c* contendo de 8 a 15 subunidades, correspondendo a 2,7 até 5 H^+ translocados por ATP. O significado da variação do "custo" energético da síntese de ATP é uma incógnita.

A ATP sintase de mitocôndrias de vertebrados contém 8 subunidades no anel *c*, equivalendo a 2,7 H^+/ATP. O transporte de ADP e fosfato (P_i) para o interior da mitocôndria, combinado com a exportação do ATP sintetizado (Seção 11.10), acrescenta 1 H^+ao total necessário para disponibilizar ATP no citoplasma. Deste modo, a razão P/O para NADH e succinato seria 2,7 (10/3,7) e 1,6 (6/3,7) respectivamente, dados estes muito próximos aos valores de 2,5 e 1,5 indicados na Seção anterior.

11.4 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. Durante a contração de músculos esqueléticos, por

exemplo, a velocidade de utilização de ATP pode ser aumentada de 100 vezes em segundos. O ajuste da produção de ATP ao seu gasto é possível porque *o transporte de elétrons e a síntese de ATP são processos intimamente acoplados*, como tem sido reiterado ao longo deste capítulo. Isto é, só há oxidação de coenzimas (NADH e $FADH_2$) se houver síntese de ATP, e vice-versa. O mecanismo de coordenação das velocidades do transporte de elétrons e da síntese de ATP chama-se *controle respiratório*.

O controle respiratório foi originalmente definido como a estimulação do consumo de oxigênio ("*respiração*") por mitocôndrias isoladas, exercida por adição de ADP, seguida do decréscimo de sua utilização, à medida que ADP era convertido em ATP. O controle respiratório é também denominado *controle do aceptor*, por ser o ADP o aceptor do fosfato.

Este fenômeno pode ser explicado pela hipótese quimiosmótica: a maior disponibilidade de ADP ativa a ATP sintase, resultando em diminuição do potencial eletroquímico graças à passagem de H^+ através da enzima, de volta à matriz mitocondrial. Com um potencial de membrana menor, a energia livre liberada pelo transporte de elétrons é bastante para que mais prótons sejam bombeados para fora da mitocôndria, contragradiente. Quer dizer, as bombas de prótons (Complexos I, III e IV) são estimuladas e a cadeia de transporte de elétrons é, consequentemente, acelerada. Nas situações em que a célula realiza processos que consomem energia, transformando ATP em ADP, aumenta a síntese de ATP e a oxidação de coenzimas.

Quando o consumo de ATP é reduzido, a concentração de ADP é baixa e a translocação de prótons pela ATP sintase diminui, porque a entrada de H^+ na enzima requer ADP. A magnitude do gradiente de H^+ aumenta e a energia livre da oxidação de substratos na cadeia não é suficiente para bombear mais prótons contragradiente. Esta situação persiste até que a energia necessária para bombear prótons se iguala à energia liberada pelo transporte de elétrons que, então, para.

Ainda mais, a velocidade das vias que produzem coenzimas reduzidas (ciclo de Krebs, oxidação de ácidos graxos etc.) e dependem de sua oxidação pela cadeia de transporte de elétrons é também regulada pela disponibilidade de ADP.

Dados recentes, obtidos por experimentação *in vivo*, indicam que o controle respiratório é muito mais complexo do que verificado em preparações de mitocôndrias, resultando da interferência de outros fatores, além da razão ADP/ATP.

O controle respiratório é ainda abordado na Seção 20.6.

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 respiratória mitocondrial, impedindo o prosseguimento da transferência de elétrons (Tabela 11.2). O resultado desta ação inibitória é a paralisação do transporte de elétrons e das vias metabólicas que dependem da cadeia para a reoxidação de coenzimas.

Tabela 11.2 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 (inibidor da succinato desidrogenase)	II
Antimicina A (antibiótico)	III
Cianeto (CN^-), monóxido de carbono (CO), azida (N^{3-})	IV

Deve-se salientar que o resultado é o mesmo, qualquer que seja o componente da cadeia sobre o qual a droga atue. Isto acontece porque 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 não há síntese de ATP. Estas drogas são potencialmente letais.

O transporte de elétrons pode ocorrer sem a síntese de ATP

No início do século XX, durante a 1ª Guerra Mundial, foi verificada uma síndrome grave em trabalhadores da indústria de explosivos que estavam expostos ao contato com ácido pícrico (trinitrofenol). O sintoma mais notável, que com frequência levava a óbito, era a hipertermia, além de emagrecimento.

Foi este o fato inicial que levou à descoberta de um grupo de substâncias capazes de atuar sobre o acoplamento da síntese de ATP ao transporte de elétrons. Hoje se sabe que algumas substâncias lipofílicas, como o *2,4-dinitrofenol* (*DNP*, de ***di****tro****p****henol*), são capazes de dissociar o transporte de elétrons da fosforilação oxidativa; estas substâncias são chamadas *desacopladores*. Quando os dois processos são totalmente desacoplados, a produção de ATP para; o transporte de elétrons, termodinamicamente autônomo, pode prosseguir, não mais controlado pela concentração de ADP.

Graças ao seu caráter hidrofóbico, o DNP pode atravessar membranas e, por ser um ácido fraco, associa-se a prótons no espaço intermembranas (onde a concentração de H^+ é maior), liberando-os na matriz (Figura 11.15). Impede a formação do gradiente de prótons e a energia que seria usada na síntese de ATP é dissipada como calor. O fluxo de elétrons, feito sem o concomitante transporte de prótons contragradiente, torna-se energeticamente mais favorável e sua velocidade aumenta. Medidas experimentais simples demonstram que, em presença de desacopladores, uma suspensão de mitocôndrias consome oxigênio com velocidade muito maior do que na sua ausência.

Nos anos que se seguiram a esta descoberta, o DNP foi usado como agente emagrecedor. A expectativa de sua administração era que, acelerando a oxidação de coenzimas sem a síntese de ATP, a degradação das reservas lipídicas fosse acelerada e a sua síntese, devido à pequena produção de ATP, fosse restringida. Este tipo de tratamento efetivamente propiciava rápida perda de peso, mas também efeitos adversos graves e acidentes fatais, tendo sido logo abandonado. Posteriormente, verificou-se

ainda que o DNP é um agente mutagênico. Apesar da legislação proibitiva, o DNP voltou a ser usado a partir de 2000, como automedicação, podendo ser comprado pela Internet, resultando em aumento significativo do número de mortes por sua ingestão.

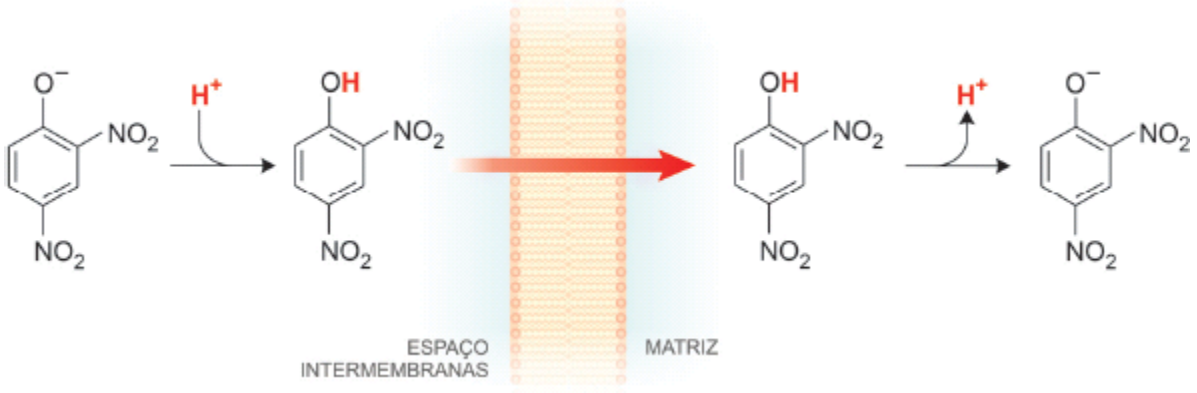


Figura 11.15 Atuação do 2,4-dinitrofenol como desacoplador — o transporte de prótons através da membrana desfaz o gradiente necessário à síntese de ATP.

Proteínas transportadoras de prótons atuam como desacopladores

O desacoplamento artificialmente provocado por substâncias como o DNP tem seu correspondente fisiológico.

Na Seção 11.3, para facilitar o entendimento da fosforilação oxidativa, foi admitida uma condição hipotética de acoplamento perfeito, em que os prótons entram na mitocôndria somente através da ATP sintase, e na presença de ADP e P_i. Todavia, diversas abordagens experimentais demonstram que as mitocôndrias são capazes de consumir oxigênio, mesmo na ausência de ADP. Como, nesta situação, os prótons não podem entrar via ATP sintase, fica evidenciado que existe um "vazamento" de H^+ através da membrana interna da mitocôndria. Ou seja, o acoplamento da fosforilação oxidativa é incompleto e os prótons bombeados pelos complexos transportadores de elétrons podem atravessar a membrana interna, de volta para a matriz mitocondrial, independentemente da formação de ATP.

O fenômeno do desacoplamento, um aparente desperdício de energia, tem grande importância para o funcionamento normal das células, podendo

representar de 20 a 50% do seu gasto energético. O “vazamento” de prótons no desacoplamento fisiológico é catalisado por uma família de proteínas, descritas a seguir.

A função biológica do desacoplamento da fosforilação oxidativa é mais bem conhecida no *tecido adiposo marrom* de mamíferos. Este tecido, diferentemente do tecido adiposo branco, apresenta numerosas mitocôndrias e, consequentemente, alto teor de citocromos, que têm cor marrom. A membrana interna de suas mitocôndrias contém, além da ATP sintase, uma proteína transportadora de prótons, denominada *proteína desacopladora 1* ou *UCP1*, de ***U**ncoupling **P**rotein 1*, anteriormente conhecida como *termogenina*. O retorno de prótons para a matriz mitocondrial, através desta proteína e não pela ATP sintase, diminui a força próton-motriz e a eficiência da fosforilação oxidativa (menor razão P/O) — uma fração considerável da energia de oxidação-redução é dissipada como calor (*termogênese*). O mecanismo da translocação de prótons mediada por UCP1 ainda não é totalmente conhecido.

A oxidação de substratos acompanhada por termogênese é importante na proteção de mamíferos recém-nascidos e adaptados a climas frios, hibernantes ou não. O tecido adiposo marrom, além de exibir alto conteúdo de UCP1, é densamente inervado e vascularizado, recebendo grande parte do fluxo sanguíneo corporal; tais características permitem prover calor para todo o organismo.

Nos seres humanos, admitia-se que o tecido adiposo marrom existia somente em recém-nascidos. Esta noção foi revista, graças à identificação recente de depósitos substanciais desse tecido em adultos, localizados principalmente no pescoço e tórax superior. Trata-se de tecido funcional, que é ativado por exposição a baixas temperaturas e capaz de sintetizar UCP1.

A atividade metabólica do tecido adiposo marrom é associada a um aumento de cerca de 20% do gasto energético basal de seres humanos adultos. O principal substrato oxidado para a produção de calor são os ácidos graxos, fornecidos pelas lipoproteínas plasmáticas ricas em triacilgliceróis (Seção 6.2.7). Níveis plasmáticos elevados de triacilgliceróis estão comumente associados à obesidade, ao diabetes e às doenças cardiovasculares A ativação do tecido adiposo marrom, por remover essas

lipoproteínas do plasma, tem sido considerada como uma nova abordagem terapêutica para combater tais doenças.

Além de UCP1, outras quatro proteínas desacopladoras foram identificadas em seres humanos adultos: UCP2 (expressa na maioria dos tecidos), UCP3 (em músculos esqueléticos, principalmente, e no coração), UCP4 e UCP5 (ambas no cérebro). As UCPs são muito conservadas entre os eucariotos, sendo encontradas não só em mamíferos, como em protozoários, peixes, aves e plantas. A ação termogênica de UCP1 está bem estabelecida, mas as funções das outras UCPs ainda são incertas.

Uma provável função atribuída às UCPs 2 a 5 baseia-se em duas características destas proteínas: elas promovem, ao contrário de UCP1, um desacoplamento discreto da fosforilação oxidativa e são ativadas por espécies reativas de oxigênio (ROS). Como analisado na Seção 11.2.1, a produção de ROS na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial aumenta quando o potencial eletroquímico de membrana é elevado, sendo que um pequeno decréscimo no potencial de membrana resulta em uma grande queda da geração de ROS. As UCPs 2 a 5 respondem a concentrações elevadas de ROS causando um desacoplamento discreto, que reduz o potencial de membrana, e atenua a geração de ROS, sem diminuição significativa da eficiência da fosforilação oxidativa.

A atuação das UCPs 2 a 5, além de estabelecer uma pronta defesa contra o estresse oxidativo, à custa de um pequeno consumo de energia, tem outros desdobramentos:

1. Por modularem a força próton-motriz, permitem ajustar a síntese de ATP à demanda de energia, contribuindo para a homeostase celular.
2. A produção controlada de ROS é fundamental, porque essas espécies participam da regulação do metabolismo energético.
3. Aceleram o metabolismo oxidativo, graças à estimulação da cadeia de transporte de elétrons.
4. As UCPs são expressas nas células pancreáticas e parecem participar de vias de sinalização da secreção de glucagon e insulina, desempenhando papel importante na regulação da fome.

Graças a seus amplos efeitos, as UCPs têm sido consideradas um alvo potencial para o desenvolvimento de terapias para obesidade, diabetes, arteriosclerose, distúrbios imunes e doenças neurodegenerativas. Todavia, o conhecimento ainda incipiente sobre a regulação da atividade das UCPs deve retardar a aplicação dessa abordagem.

A oligomicina impede a síntese de ATP

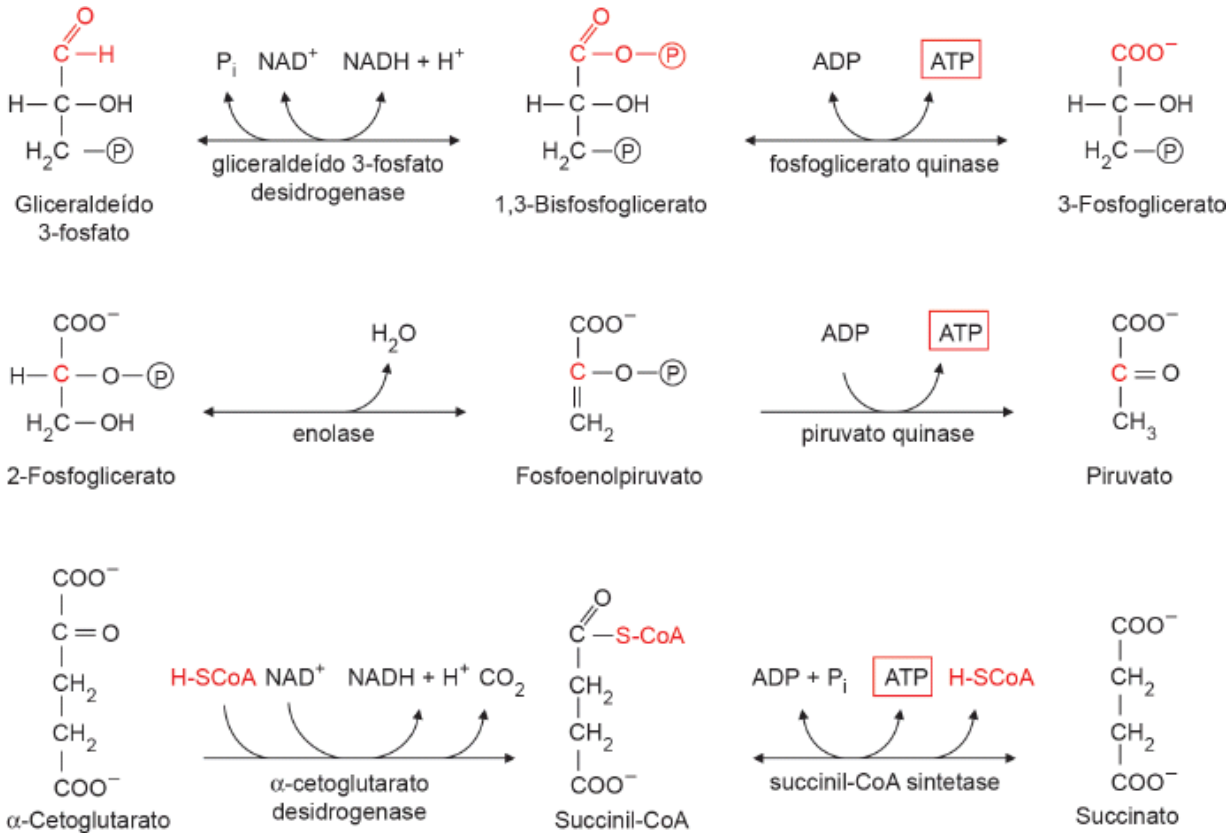
A *oligomicina* é um antibiótico produzido por linhagens de *Streptomyces* que inibe a ATP sintase mitocondrial, por torná-la impermeável a prótons. Sua ação é provocada por ligação a uma subunidade da enzima denominada *OSCP* (***o****ligomycin* ***s****ensitivity-****c****onferring* ***p****rotein*), que, como o nome indica, é a proteína necessária para que a ATP sintase manifeste a sensibilidade ao antibiótico. A localização da OSCP na enzima é controversa, mas há evidências de que ela seja equivalente à subunidade δ da ATP sintase bacteriana (Figura 11.14). O mecanismo de ação da oligomicina permanece desconhecido.

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 outro — 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 idêntico ao dos inibidores da cadeia de transporte de elétrons (antimicina A, cianeto etc.): bloqueia a síntese de ATP e para o consumo de oxigênio, indicativo da interrupção do transporte de elétrons. Experimentalmente, pode-se distinguir com facilidade a inibição da ATP sintase da inibição da cadeia respiratória. Basta adicionar à preparação inibida um desacoplador: se a inibição é exercida 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 formação 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 oxidação-redução; no caso da desidratação do 2-fosfoglicerato, há uma oxidação-redução intramolecular, em que um carbono é oxidado e outro reduzido. Em decorrência da reação de oxidação-redução forma-se um composto rico em energia que, na reação seguinte, origina ATP (ou GTP, no caso da succinil-CoA sintetase).



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

Nas seções anteriores, foram descritas as características da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, bastante conservada entre os eucariotos e também encontrada em alguns tipos de bactérias. Nas bactérias, encontram-se, ainda, 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. Além de coenzimas reduzidas, podem ser fornecedores de elétrons uma série de substratos inorgânicos, como NH_4^+, NO_2^-, H_2S, H_2, enxofre e ferro, ou orgânicos, como o lactato. 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 compostos orgânicos, como o fumarato. Quando o aceptor final não é o 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 características favoráveis na competição entre espécies para a 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 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 os seus valores. Na fase IV, obtém-se a quantidade de ATP produzida por fosforilação oxidativa acoplada à oxidação do total de coenzimas, considerando-se a síntese de 3 ATP para cada NADH e 2 para cada $FADH_2$. A oxidação completa de um mol de glicose está discriminada na tabela seguinte:

Etapas	I	II	III	I+II+III	IV	Mols 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 ATP	4 ATP	—	4
Total						38

A oxidação biológica da glicose em condições aeróbias produz, portanto, 38 ATP. A equação geral deste processo é:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\ O_2 + 38\ ADP + 38\ P_i \rightarrow 6\ CO_2 + 6\ H_2O + 38\ ATP$$

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 citosol (glicólise) permite a síntese de apenas 2 ATP (seção seguinte).

11.9 Oxidação do NADH citosólico

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a NADH (e NAD^+), de modo que a oxidação do NADH citosólico não pode ser feita

diretamente pela cadeia de transporte de elétrons. Entretanto, as coenzimas reduzidas no citosol 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 citosólico capaz de atravessar a membrana interna da mitocôndria; alternativamente, os elétrons são passados para um composto que pode reduzir um componente da membrana interna. Por qualquer dos dois processos, o composto que transporta os elétrons é reoxidado ao doá-los, retorna ao citosol, e pode participar de um novo ciclo. Há duas lançadeiras importantes em células de vertebrados: a do malato-aspartato e a do glicerol fosfato.

1. *Lançadeira do malato-aspartato*. O NADH citosólico reduz oxaloacetato, em uma reação catalisada pela *malato desidrogenase* citosólica. O malato formado entra na mitocôndria, onde é oxidado pela malato desidrogenase mitocondrial, que também utiliza NAD^+ como coenzima (Figura 11.16). O processo leva à produção de NADH mitocondrial a partir de NADH citosólico, apesar de não haver permeabilidade da membrana interna ao NADH. O oxaloacetato formado na mitocôndria não atravessa a membrana interna, mas pode receber um grupo amino do glutamato, formando aspartato. O aspartato sai da mitocôndria e, no citosol, regenera o oxaloacetato (Figura 11.17). Este é o sentido desta lançadeira em mitocôndrias respirando ativamente.

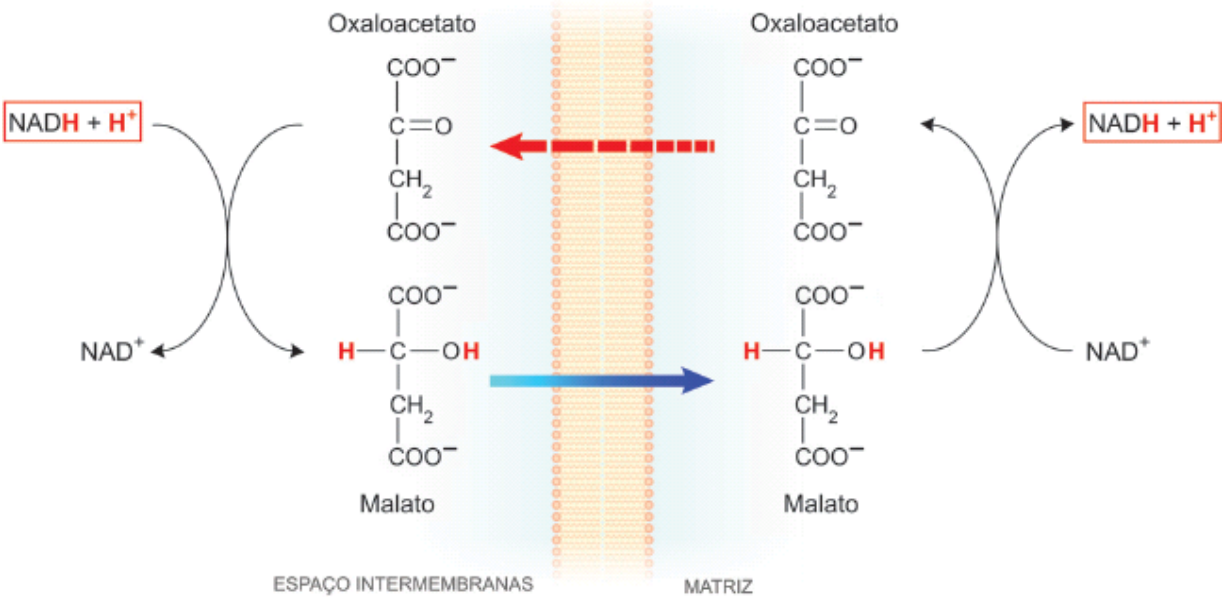


Figura 11.16 Esquema simplificado da lançadeira do malato-aspartato. O transporte de malato para a matriz mitocondrial (seta azul) e a regeneração de oxaloacetato no citosol (seta vermelha tracejada) estão representados na Figura 11.17.

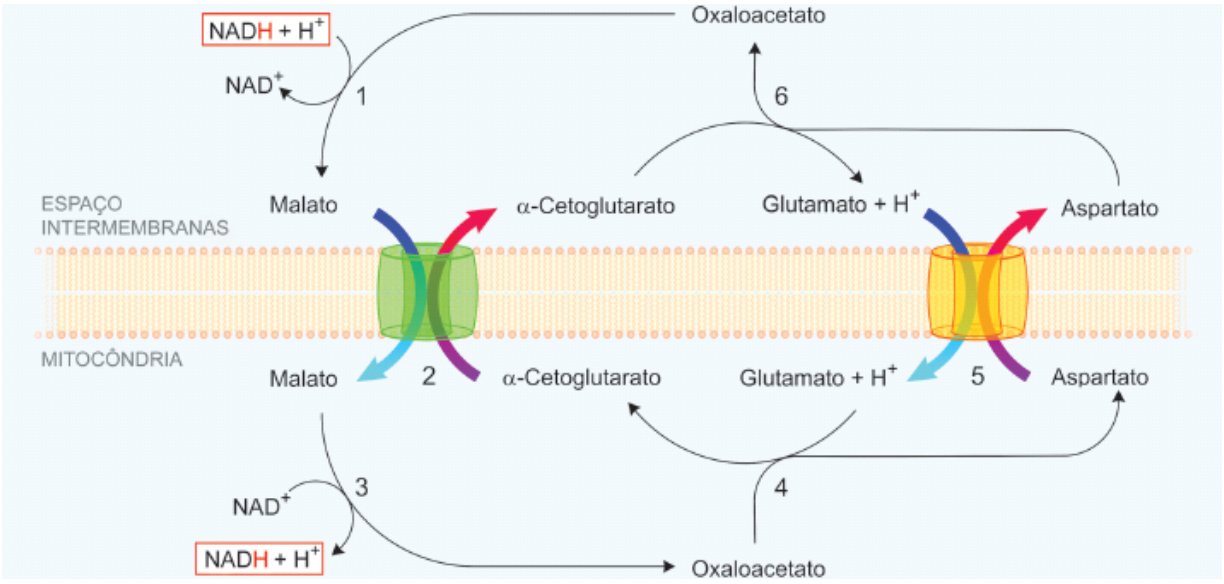


Figura 11.17 Lançadeira do malato-aspartato. As enzimas e translocases (Seção 11.10) que participam da lançadeira são: (1) malato desidrogenase citosólica; (2) dicarboxilato translocase; (3) malato desidrogenase mitocondrial; (4) aspartato aminotransferase (Seção 17.2.1) mitocondrial;

(5) aspartato-glutamato translocase; (6) aspartato aminotransferase citosólica.

A passagem de malato e aspartato através da membrana interna da mitocôndria é efetuada por translocases presentes nesta membrana, que serão descritas na Seção 11.10. A lançadeira do malato-aspartato ocorre em plantas e na maioria das células de vertebrados, incluindo as de fígado, coração, rins e cérebro.

2. *Lançadeira do glicerol fosfato.* O NADH citosólico reduz di-hidroxiacetona 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 isoenzima da glicerol 3-fosfato desidrogenase que contém FAD como grupo prostético (Figura 11.18). A di-hidroxiacetona fosfato é regenerada, produzindo $FADH_2$ que entrega os elétrons à coenzima Q.

Deve-se notar que, quando a lançadeira do glicerol fosfato é acionada, cada NADH origina apenas 2 ATP. O decréscimo na produção de ATP por NADH citosólico oxidado garante a irreversibilidade do transporte de seus elétrons para o interior da mitocôndria, mesmo que a concentração de NADH no citosol seja baixa. Este sistema opera em plantas, nos músculos de voo de insetos e em músculos esqueléticos e cérebro de vertebrados.

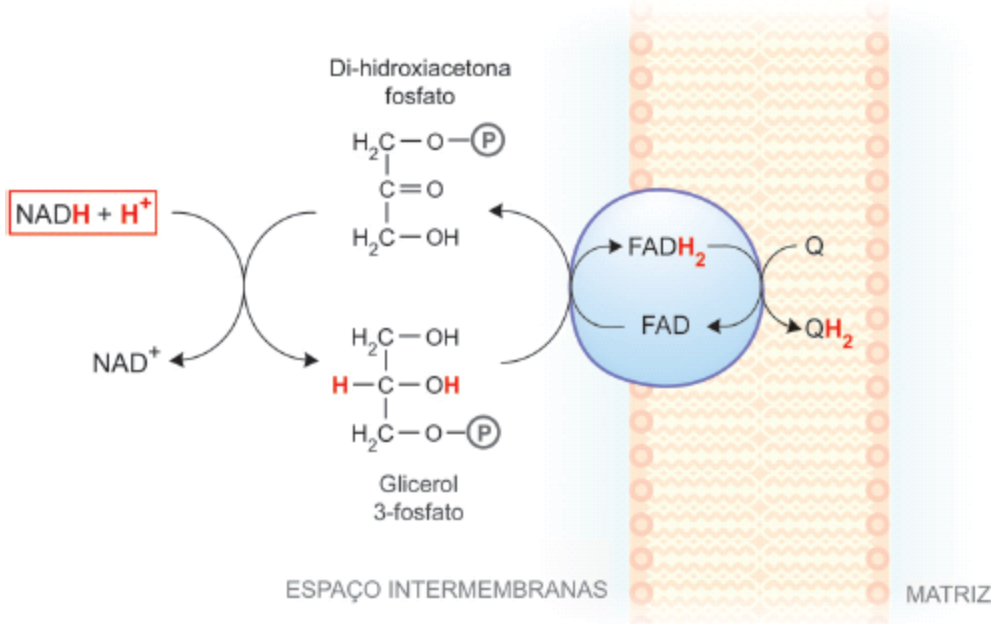


Figura 11.18 Lançadeira do glicerol-fosfato. A esfera representa a glicerol 3-fosfato desidrogenase situada na face externa da membrana interna, que contém FAD como grupo prostético.

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 citosol é propiciado pela existência de sistemas transportadores — *translocases* ou *permeases* — presentes na membrana interna da mitocôndria (Figura 11.19). Quando não há um transportador específico, o composto é incapaz de atravessar a membrana. O transporte mediado por translocases encontra-se descrito na Seção 7.4.1.

Os sistemas de transporte da membrana interna da mitocôndria mais bem conhecidos são:

1. *Adenina nucleotídio translocase* ou *ATP/ADP 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 citosol, onde ocorre a maioria dos processos que consomem energia. Esta translocase é uma proteína muito abundante, que chega a representar 15% do conteúdo proteico da membrana interna da mitocôndria.

A ATP/ADP translocase pode ser inativada por inibidores específicos, com o consequente bloqueio da fosforilação oxidativa. Um deles, *atractilosídio*, é um glicosídio 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. 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 acoplada à fosforilação oxidativa, também não pode prosseguir.

2. *Fosfato translocase* — catalisa o cotransporte (simporte) de fosfato (P_i) e H^+ para a matriz mitocondrial. O transporte de fosfato é inibido por reagentes específicos para grupos sulfidrila, como a *N-etil-maleimida*.

É o resultado das ações conjugadas das translocases 1 e 2 que provê a ATP sintase dos substratos (ADP e P_i) de que necessita.

3. *Dicarboxilato translocase* — promove a troca de dicarboxilatos (malato, succinato, fumarato e α-cetoglutarato) por fosfato, ou troca de um dicarboxilato por outro.

4. *Tricarboxilato translocase* — efetua o antiporte de tricarboxilatos (citrato, isocitrato e fosfoenolpiruvato) por malato ou por tricarboxilatos; também é responsável pelo transporte do fosfoenolpiruvato mitocondrial para o citosol.

5. *Piruvato translocase* — permite a entrada, na mitocôndria, do piruvato produzido no citosol, acoplada à saída de OH^-.

6. *Aspartato-Glutamato translocase* — medeia a saída de aspartato da matriz em troca de glutamato e H^+do citosol.

7. S*istemas transportadores de íons* Ca^{2+}.

Apesar de saber-se, desde 1960, que as mitocôndrias são capazes de transportar íons cálcio, ainda não foram identificadas as proteínas envolvidas na movimentação do íon através da membrana interna. Existem vários sistemas transportadores, dos quais são conhecidas apenas as características funcionais, sendo os mais importantes: um mecanismo uniportador que possibilita a entrada de Ca^{2+} e dois antiportadores que promovem a liberação de Ca^{2+} no citosol, à custa da introdução na mitocôndria de Na^+ ou H^+ (sistemas Ca^{2+}/nNa^+ e $Ca^{2+}/2H^+$).

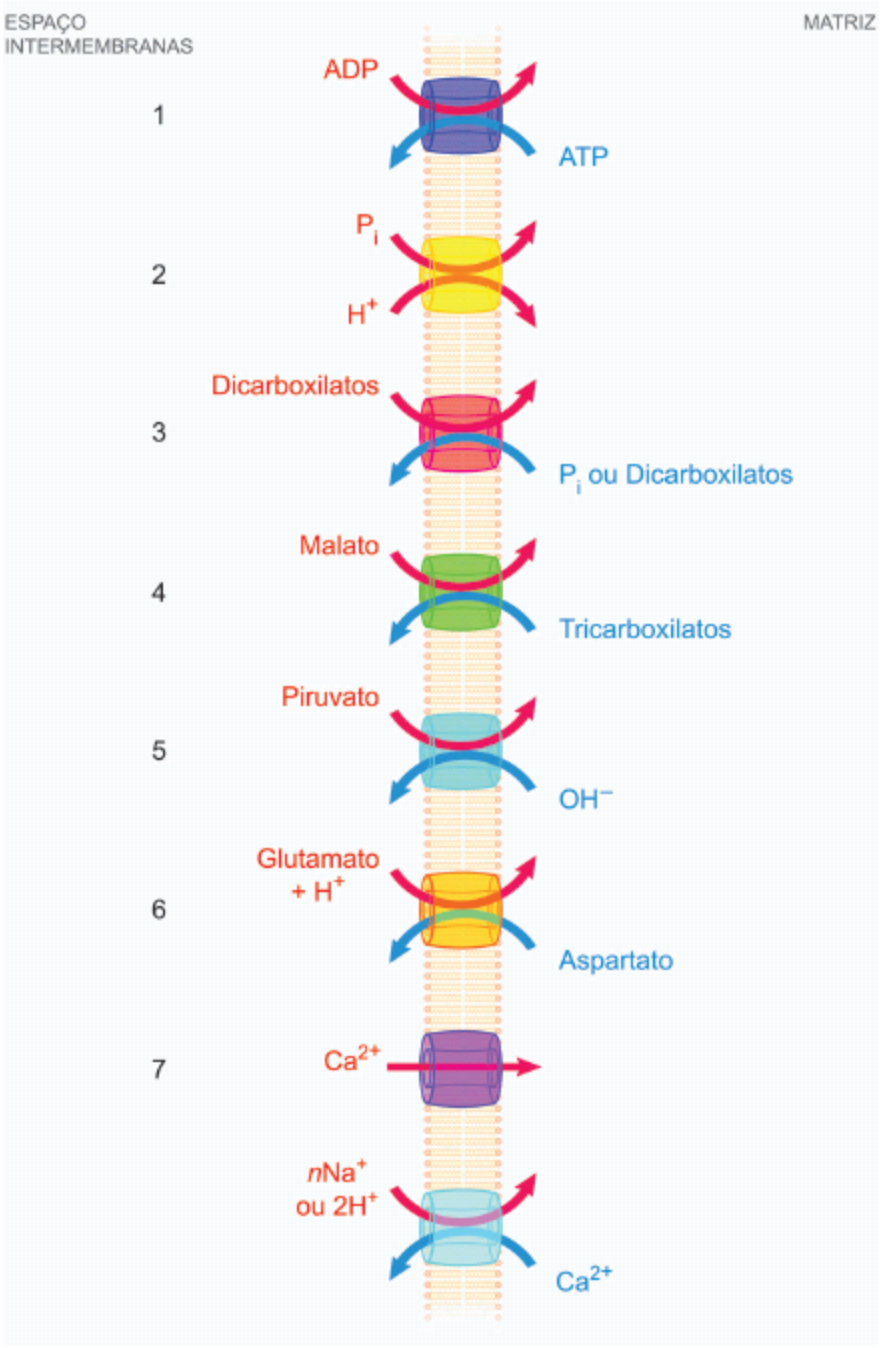


Figura 11.19 Translocases da membrana interna da mitocôndria, numeradas de 1 a 7 e descritas no texto.

As mitocôndrias, além do retículo endoplasmático, constituem um reservatório de cálcio e participam da regulação de sua concentração celular, colaborando para manter os níveis citosólicos de Ca^{2+} caracteristicamente baixos, próximos 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*.

Quando o acúmulo de cálcio na matriz mitocondrial ultrapassa os limites fisiológicos, a permeabilidade da membrana interna aumenta abruptamente, devido à abertura de um canal na membrana, chamado *poro de transição de permeabilidade* (*PTP*). Trata-se de um transportador não específico, permeável a quaisquer íons e moléculas menores que 1,5 kDa, cuja atuação ocasiona a morte celular por necrose ou apoptose (morte celular programada).

O papel de PTP na necrose celular é bem estabelecido na vigência de isquemia no coração, cérebro e fígado, quando as concentrações de cálcio aumentam muito, assim como as de espécies reativas de oxigênio. O PTP é estimulado e libera a passagem de prótons através da membrana interna, resultando a dissipação da força próton-motriz e a impossibilidade de sintetizar ATP.

Em determinadas condições, quando a abertura de PTP não chega a causar depleção de ATP e necrose, pode ocorrer apoptose. As proteínas, por não atravessarem PTP, ficam retidas na matriz mitocondrial e, como sua concentração é maior do que no citosol, a pressão osmótica interna aumenta, ocasionando o inchaço por absorção de água (*swelling*). A membrana interna da mitocôndria, graças às numerosas cristas, não é rompida, mas a externa, sim: o conteúdo do espaço intermembranas é liberado, incluindo o citocromo *c* que, uma vez no citosol, ativa uma cascata de proteases que determinam a morte celular.

A dicarboxilato translocase e a aspartato/glutamato translocase participam da lançadeira do malato-aspartato (Figura 11.17). As atuações das demais translocases alistadas e ainda de outros sistemas transportadores estão incluídas na descrição das vias metabólicas.

O transporte de metabólitos e íons através da maioria das permeases da membrana interna da mitocôndria é do tipo ativo (Seção 7.4.1). A energia necessária para seu funcionamento é derivada do gradiente eletroquímico gerado pelo bombeamento de prótons acoplado à cadeia de transporte de elétrons. Deste modo, as permeases contribuem para a dissipação da força próton-motriz, reduzindo o rendimento em ATP — uma parcela

significativa da energia derivada do transporte de elétrons é utilizada para contornar a impermeabilidade da membrana interna.

Bibliografia

Althoff T *et al.*: Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1. *EMBO J* **30** (22): 4652-4664, 2011.

Azzu V *et al.*: The regulation and turnover of mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim Biophys Acta* **1797** (6-7): 785-791, 2010.

Baradaran R *et al.*: Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* **494** (7438): 443-448, 2013.

Belevich I *et al.*: Initiation of the proton pump of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci* USA **107**: 18469-18474, 2010.

Brand MD: The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* **45** (7-8): 466-472, 2010.

Byers T: Anticancer Vitamins du Jour — The ABCED's So Far. *Am J Epidemiol* **172** (1): 1-3, 2010.

Cramer WA *et al.*: The Q cycle of cytochrome bc complexes: a structure perspective. *Biochim Biophys Acta* **1807** (7): 788-802, 2011.

DeWeerdt S: Food: The omnivore's labyrinth. *Nature* **471**: S22-S24, 2011.

Diano S, Horvath TL: Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism. *Trends Mol Med* **18** (1): 52-58, 2012.

Dickinson BC, Chang CJ: Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* **7** (8): 504-511, 2011.

Drummond GR *et al.*: Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* **10** (6): 453-471, 2011.

Ferguson SJ: ATP synthase: from sequence to ring size to the P/O ratio. *Proc Natl Acad Sci* USA **107** (39): 16755-16756, 2010.

Gleason C *et al.*: Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **108** (26): 10768-10773, 2011.

Grundlingh J *et al.*: 2,4-Dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J Med Toxicol* **7** (3): 205-212, 2011.

Holmström KM, Finkel T: Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15** (6): 411-4216, 2014.

Jonckheere AI *et al.*: Mitochondrial ATP synthase: architecture, function and pathology. *J Inherit Metab Dis* **35** (2): 211-225, 2012.

Key TJ: Fruit and vegetables and cancer risk. *Br J Cancer* **104** (1): 6-11, 2011.

Kunji ERS, Robinson AJ: Coupling of proton and substrate translocation in the transport cycle of mitochondrial carriers. *Curr Opin Struct Biol* **20** (4): 440-447, 2010.

Mailloux RJ, Harper ME: Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* **51** (6):1.106-1.115, 2011.

Maklashina E, Cecchini G. The quinone-binding and catalytic site of complex II. *Biochim Biophys Acta* **1797** (12): 1877-1882, 2010.

Mitchell P: Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148, 1961.

Noji *et al*.: Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* **386**: 299-302, 1997.

Starkov AA: The molecular identity of the mitochondrial Ca^{2+} sequestration system. *FEBS J* **277** (18): 3652-3663, 2010.

Vercesi AE *et al*.: Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 383-404, 2006.

Watt IN *et al*.: Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 16.823-16.827, 2010.

Weber J: Toward the ATP synthase mechanism. *Nat Chem Biol* **6**: 794-795, 2010.

[1]O *espaço periplasmático*, ou *periplasma*, localiza-se entre a membrana plasmática e a membrana externa de bactérias gram-negativas, como *E. coli*.

OceanofPDF.com

12 Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato

12.1 Funções da via das pentoses fosfato

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)* (Figura 12.1), uma coenzima com estrutura semelhante à do NADH. A ribose 5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídios que compõem os ácidos nucleicos e várias coenzimas (NAD^+, $NADP^+$, FAD, FMN, coenzima A, ATP, GTP etc.). O NADPH atua como coenzima doadora de hidrogênio em sínteses redutoras de ácidos graxos e de esteroides e reações de proteção contra agentes oxidantes e infecções bacterianas. São ainda produzidos nesta via outros açúcares fosforilados, com número variável de átomos de carbono.

Em vias degradativas, como glicólise, ciclo de Krebs, ciclo de Lynen etc., o substrato é oxidado, gerando coenzimas reduzidas — NADH e $FADH_2$ —, a partir de cuja oxidação se produz ATP. Na síntese de muitos compostos, ocorre o inverso: há consumo de ATP e redução do substrato por coenzimas reduzidas. A coenzima utilizada em tais reduções é o *NADPH*, que passa à forma *$NADP^+$*; a volta à forma reduzida é cumprida pela via das pentoses fosfato e por algumas outras reações (Seções 10.1 e 16.5). As duas coenzimas — NAD^+ e NADPH — têm, então, papéis metabólicos opostos: a primeira é utilizada quando um substrato está sendo oxidado e a segunda, quando um substrato está sendo reduzido. Também são diferentes os processos de regeneração das duas coenzimas: o NADH produzido no metabolismo degradativo é oxidado na cadeia de transporte de

elétrons; o NADPH não é substrato da cadeia de transporte de elétrons e sua oxidação é feita nas vias de sínteses e outras reações redutoras.

Na via das pentoses fosfato, a energia derivada da oxidação da glicose é exclusivamente armazenada sob a forma de poder redutor (NADPH) e não de NADH e ATP, como na glicólise.

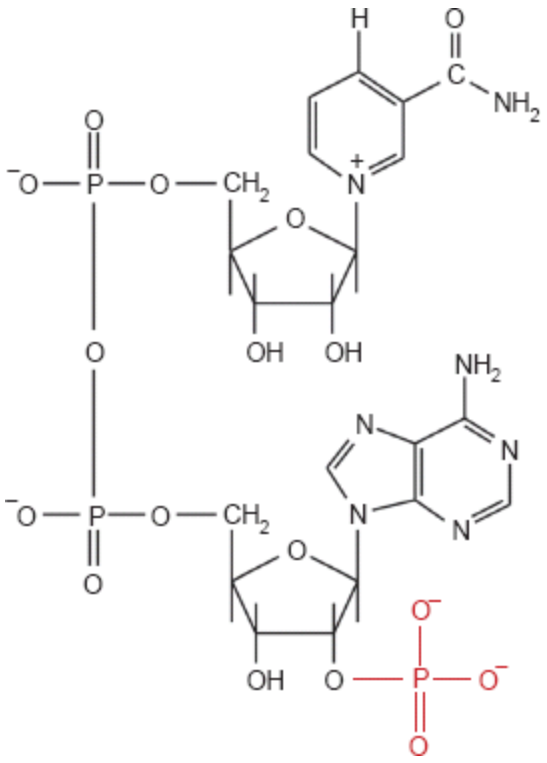


Figura 12.1 Forma oxidada da nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADP+). Este dinucleotídio difere do NAD+ (Figura 9.2) apenas pela presença de um grupo fosfato (em vermelho) esterificado ao carbono 2 da ribose do nucleotídio de adenina.

12.2 Etapas da via das pentoses fosfato

A via das pentoses fosfato consta de uma parte oxidativa, que produz NADPH, e de uma parte não oxidativa, que interconverte açúcares fosforilados

Na porção inicial, *oxidativa*, da via das pentoses fosfato (Figura 12.2), a glicose 6-fosfato sofre descarboxilação, originando uma pentose fosfato, a ribulose 5-fosfato, e NADPH. Esta transformação ocorre por meio de duas

reações de oxidação catalisadas por *desidrogenases* específicas para $NADP^+$, intercaladas por uma reação de hidrólise. A equação geral desta etapa é:

$$\text{Glicose 6-fosfato} + 2\ NADP^+ + H_2O \rightarrow \text{Ribulose 5-fosfato} + 2\ NADPH + 2\ H^+ + CO_2$$

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*, constitui um sistema de rearranjos moleculares, que forma açúcares fosforilados com 3, 4, 5, 6 ou 7 átomos de carbono. A ribulose 5-fosfato é transformada em 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, catalisadas por dois tipos de enzimas: *transcetolases*, que transferem grupos de dois carbonos e têm tiamina pirofosfato (TPP) como grupo prostético, e *transaldolases*, que transferem 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.

A via das pentoses fosfato e a glicólise, apesar de terem funções tão diferentes, são intimamente relacionadas, já que ambas ocorrem no citosol e apresentam compostos intermediários comuns: glicose 6-fosfato, frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato. O compartilhamento de compostos e a reversibilidade das reações da etapa não oxidativa da via das pentoses fosfato tornam possível canalizar os açúcares fosforilados desta via para a glicólise ou vice-versa. Adicionalmente, as duas etapas, oxidativa e não oxidativa, podem ser acionadas em separado — o caminho a ser seguido pela glicose 6-fosfato na via das pentoses fosfato é determinado, principalmente, pelas demandas celulares de NADPH ou ribose 5-fosfato.

A regulação da via das pentoses fosfato está descrita na Seção 20.3.

A via das pentoses é amplamente distribuída pelos tecidos; as reações que compõem a parte oxidativa são sobremodo ativas em tecidos engajados

nas sínteses de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides, que utilizam NADPH como agente redutor. Estas sínteses (Capítulo 16) acontecem principalmente no fígado, tecido adiposo, glândulas mamárias, córtex da suprarrenal, ovários e testículos; no fígado, 20 a 30% da oxidação de glicose são feitos pela via das pentoses fosfato.

12.3 Funções adicionais do NADPH

Em diversas reações oxidativas do metabolismo, são produzidas espécies reativas de oxigênio (ROS, de ***R****eactive* ***O****xygen* ***S****pecies*), devido à redução parcial do oxigênio molecular; são também resultantes da ingestão de substâncias exógenas (drogas, medicamentos). Estas espécies radicalares reagem praticamente com qualquer composto, as macromoléculas inclusive, causando alterações estruturais irreversíveis. Os organismos dispõem de sistemas enzimáticos (superóxido dismutase e catalase) e não enzimáticos (vitaminas antioxidantes) capazes de dissipar os radicais livres (Seção 11.2.1). O NADPH constitui uma reserva importante de poder redutor, imprescindível não só para as sínteses redutivas, mas também para os mecanismos celulares que previnem o estresse oxidativo. Nesses processos antioxidantes, o NADPH atua em associação com o tripeptídio *glutationa* (γ-glutamilcisteinilglicina) (Figura 12.3).

A estrutura nativa de muitas proteínas depende de grupos sulfidrila de resíduos de cisteína; as espécies reativas de oxigênio podem provocar a oxidação dos grupos SH a dissulfeto (– S – S –). A glutationa participa da redução das pontes dissulfeto, que são reconvertidas a grupos SH. Neste processo redutor, catalisado por enzimas da família das *proteína dissulfeto redutases* (PDR), os grupos SH de duas moléculas de glutationa (GSH) são oxidados, passando a constituir o grupo S – S da glutationa dissulfeto (GSSG). A restauração da forma SH da glutationa (Figura 12.4) é obtida por reação com NADPH, a coenzima da *glutationa redutase* (GR).

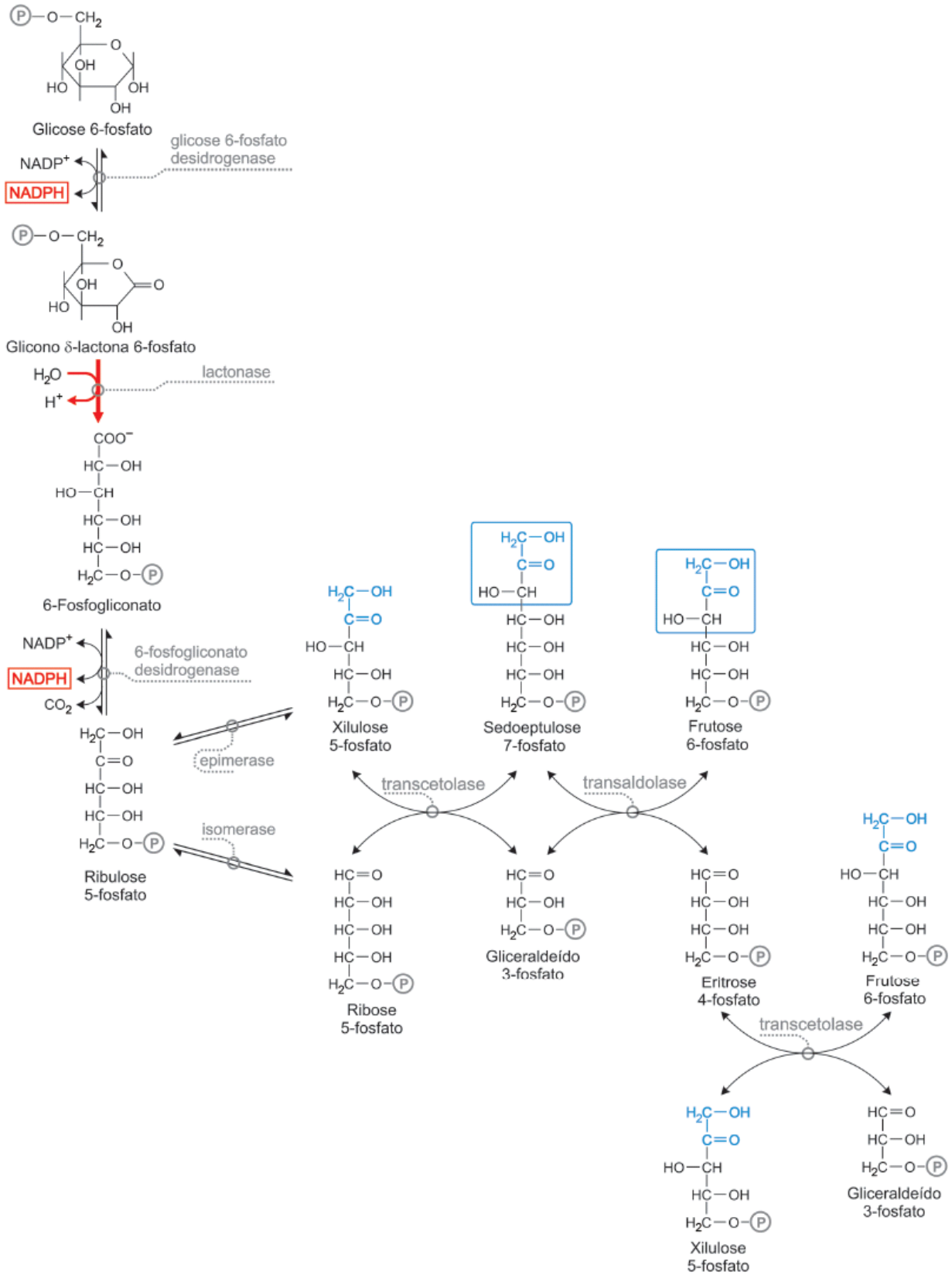


Figura 12.2 Via das pentoses fosfato.

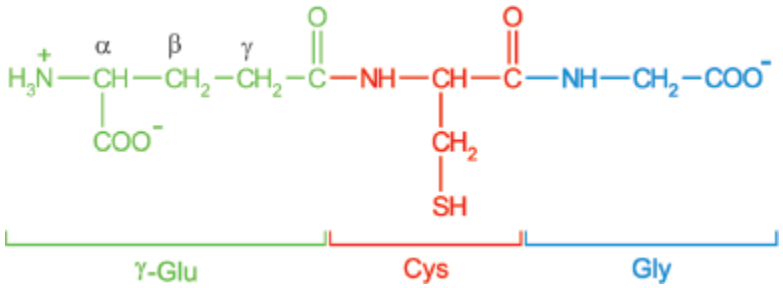


Figura 12.3 Estrutura da glutationa, um tripeptídio formado por glutamato (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly). A ligação peptídica entre Glu e Cys é exótica, porque envolve a γ-carboxila do glutamato.

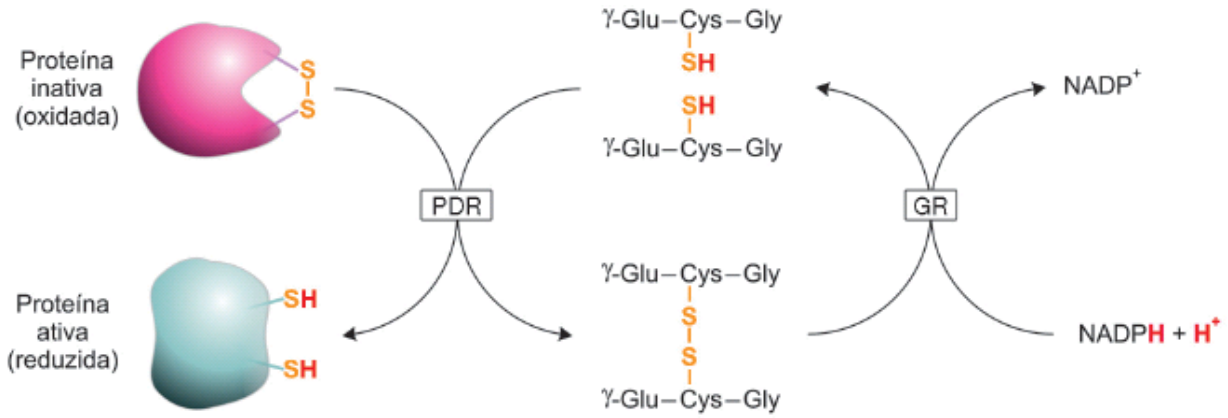


Figura 12.4 Participação da glutationa (γ-Glu-Cys-Gly) na regeneração de grupos SH. No exemplo, a proteína com grupos sulfidrila de resíduos de cisteína oxidados (– S – S –) é inativa. A forma ativa (grupos SH) é recuperada por reação da forma oxidada com duas moléculas de glutationa (G – SH), que se convertem a glutationa dissulfeto (G – S – S – G), por ação de proteína dissulfeto redutases (PDR). A regeneração da forma reduzida da glutationa é obtida por reação com NADPH, a coenzima da glutationa redutase (GR).

As hemácias são células particularmente sensíveis ao dano oxidativo, por disporem de um leque de vias metabólicas muito restrito, sendo incapazes de repor macromoléculas danificadas. A exposição a concentrações aumentadas de espécies reativas de oxigênio provoca, além da oxidação de grupos sulfidrila (SH) de proteínas, a peroxidação de lipídios e a oxidação do íon ferroso da hemoglobina.

A peroxidação de fosfolipídios componentes da membrana plasmática ocasiona a ruptura da estrutura da membrana, provocando lise da hemácia. Os peróxidos — H_2O_2 ou peróxidos orgânicos (RO_2H) — são reduzidos (reações 1 e 2, respectivamente) pela glutationa por ação da *glutationa peroxidase*, uma enzima peculiar por conter selênio.

$$2\,G-SH + H_2O_2 \longrightarrow G-S-S-G + 2\,H_2O \quad (1)$$

$$2\,G-SH + R-O-O-H \longrightarrow G-S-S-G + ROH + H_2O \quad (2)$$

A glutationa dissulfeto é reduzida por NADPH, na reação catalisada pela glutationa redutase.

Em mamíferos, a glutationa é um dos principais agentes redutores de dissulfetos e peróxidos; o NADPH reduz a glutationa oxidada, sendo o redutor primário da glutationa redutase e de outras enzimas que catabolizam ROS.

O NADPH contribui ainda para a manutenção do íon de ferro do grupo heme da hemoglobina no estado de oxidação 2^+, tornando-a capaz de ligar-se com o oxigênio; a oxidação do íon ferroso a Fe^{3+} origina a meta-hemoglobina (Seção 3.5), que não transporta oxigênio. A conversão de meta-hemoglobina em oxi-hemoglobina é catalisada por duas *redutases* presentes nas hemácias: uma NADH dependente *(NADH-MetHb redutase* ou *citocromos b_5 redutase*) e outra NADPH dependente (*NADPH-MetHb redutase*).

O NADPH, além de atuar nas reações de proteção contra agentes oxidantes, participa de um processo que gera ROS (*respiratory burst*): é a coenzima das NADPH oxidases (Seção 11.2.1) de leucócitos que catalisam a produção de radical superóxido e água oxigenada, que eliminam as bactérias fagocitadas.

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. Todavia, em alguns casos, genes defectivos trazem alguma vantagem seletiva, como acontece com a anemia falciforme e as talassemias (Seção 3.5). Outro exemplo é a *deficiência da glicose 6-fosfato desidrogenase*, enzima que catalisa a primeira reação da via das pentoses fosfato. Essa reação produz NADPH, essencial para prevenir o dano oxidativo em hemácias. A falta parcial da enzima pode ser benéfica, embora em circunstâncias muito definidas e restritas — a distribuição geográfica dos 400 milhões de portadores desta carência enzimática correlaciona-se com regiões onde a malária é moléstia endêmica. A frequência de portadores em algumas dessas regiões chega a 25%, mostrando que o gene mutante confere alguma proteção contra o *Plasmodium falciparum*, a principal espécie causadora da malária. Como este protozoário cumpre parte de seu ciclo vital nas hemácias, é provável que hemácias com baixa concentração de NADPH constituam um ambiente inóspito para o seu crescimento. A contrapartida do efeito protetor (redução do risco de contrair malária grave) do defeito genético é uma suscetibilidade aumentada ao estresse oxidativo.

Estão descritas numerosas mutações no gene de glicose 6-fosfato desidrogenase, que resultam em redução de 3 a 30% da atividade normal da enzima nas hemácias. A atividade residual é suficiente para que os portadores sejam assintomáticos. Entretanto, condições em que são geradas quantidades grandes de espécies reativas de oxigênio exigem também quantidades grandes de NADPH, que esses indivíduos são incapazes de produzir — instala-se, então um quadro de anemia hemolítica grave. Uma destas condições é a administração de antimalárico *primaquina*. Apesar de seu uso corrente desde a década de 1950, os mecanismos de sua atuação como antimalárico e do seu efeito hemolítico não são ainda totalmente compreendidos.

Bibliografia

Alexander-Kaufman K, Harper C: Transketolase: observations in alcohol-related brain damage research. *Int J Biochem Cell Biol* **41** (4): 717-20, 2009.

Fan J *et al*.: Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* **510** (7504): 298-302, 2014.

Howes RE *et al*.: G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. *PLoS Med* **9** (11): e1001339, 2012.

Lillig CH, Berndt C: Cellular functions of glutathione. *Biochim Biophys Acta* **1830** (5): 3137-3138, 2013.

Perl A *et al*.: Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase. *Trends Mol Med* **17** (7): 395-403, 2011.

Pybus BS *et al*.: CYP450 phenotyping and accurate mass identification of metabolites of the 8-aminoquinoline, anti-malarial drug primaquine. *Malar J* **11**: 259, 2012.

OceanofPDF.com

13 Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose

13.1 Metabolismo do glicogênio

O glicogênio é um polímero de glicose e constitui uma reserva do açúcar em bactérias, fungos e animais. A vantagem biológica de armazenar glicose na forma polimerizada é a redução da osmolaridade, resultante do menor número de partículas em solução. No ser humano, as principais reservas de glicogênio ocorrem no fígado e em músculos esqueléticos e correspondem, em média, a 100 e 300 g, respectivamente. O glicogênio é sintetizado nesses órgãos quando a oferta de glicose supera a sua utilização, como acontece após as refeições.

Ao serem degradadas, as duas reservas de glicogênio atendem necessidades diferentes. A degradação do glicogênio hepático é responsável pela manutenção da glicemia nos períodos entre as refeições, sobretudo durante o jejum noturno. O fígado não aproveita o glicogênio que armazena; sempre que a hipoglicemia induz a degradação do polímero, a glicose resultante é exportada e consumida por outros órgãos ou tecidos. Nos tecidos aeróbios, a glicose é totalmente oxidada a CO_2 e H_2O; em células anaeróbias como as hemácias, a glicose é degradada a lactato.

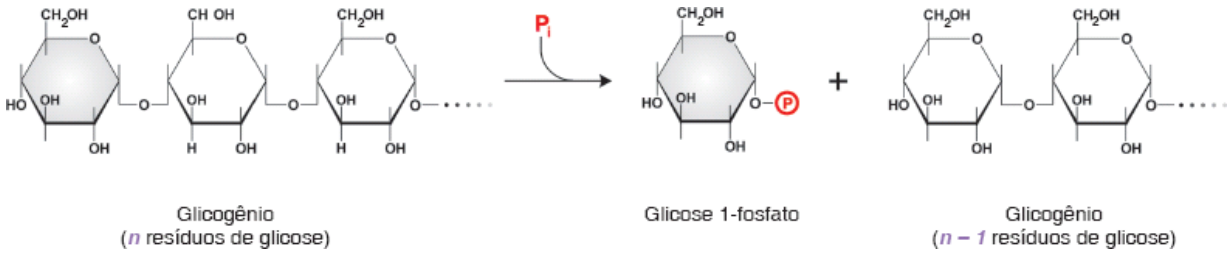
Em contraposição, o glicogênio dos músculos esqueléticos provê energia para as próprias fibras musculares e a glicose resultante de sua degradação não é exportada. As fibras musculares de contração rápida (Seção 22.5) têm um conteúdo de glicogênio maior do que as fibras lentas. Em contração intensa, quando a demanda energética ultrapassa o aporte de

oxigênio, o glicogênio das fibras rápidas é convertido a lactato (Seção 9.1.1), daí serem também chamadas de fibras glicogenolíticas.

As enzimas que catalisam a síntese e a degradação do glicogênio, além de proteínas reguladoras destes processos, estão intimamente associadas ao polímero, encontrado no citosol na forma de grânulos.

A degradação do glicogênio produz glicose 1-fosfato

A degradação do glicogênio, a *glicogenólise*, consiste na remoção sucessiva de resíduos de glicose, a partir das suas extremidades não redutoras (Seção 6.1), por ação da *glicogênio fosforilase*, uma enzima que tem piridoxal fosfato, um derivado da vitamina B_6, 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 à hidrólise, com a diferença de usar fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} a pH 7,4, representado por P_i) 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, a *enzima desramificadora*, que atua como *glicosiltransferase*, transferindo 3 dos 4 resíduos de glicose remanescentes na ramificação para uma extremidade não redutora da cadeia de glicogênio, formando uma ligação α-1,4 (Figura 13.1); na sua nova posição, estes resíduos podem ser liberados por ação da glicogênio fosforilase.

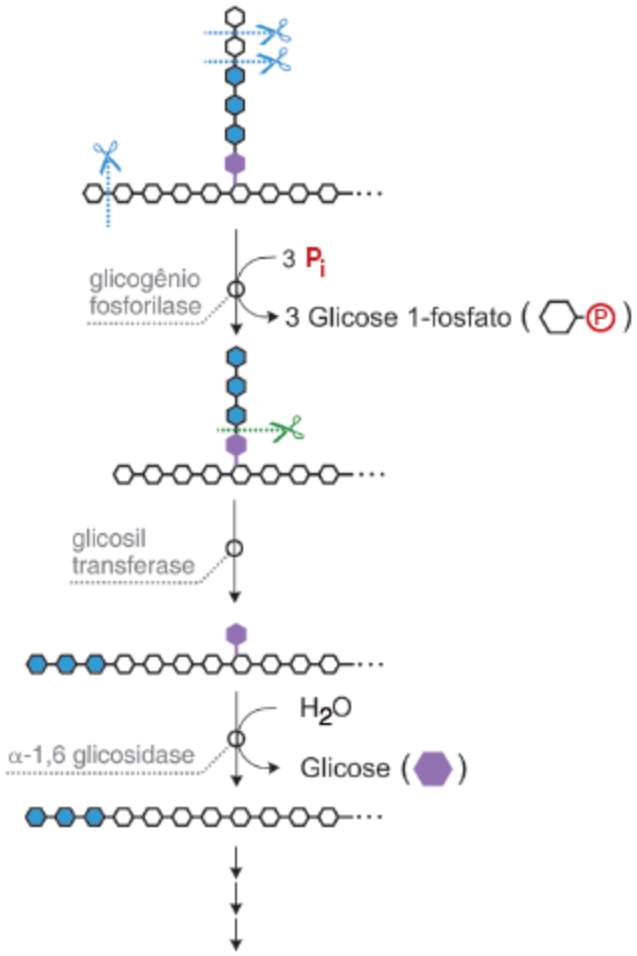


Figura 13.1 Esquema da degradação do glicogênio.

O resíduo de glicose restante está ligado à cadeia principal por ligação α-1,6; esta ligação é hidrolisada pela segunda atividade da enzima desramificadora, de *α-1,6 glicosidase*. É interessante que, neste caso, ocorre uma hidrólise, em lugar da fosforólise produzida pela glicogênio fosforilase — cerca de 10% dos resíduos de glicose do glicogênio são liberados como *glicose* e o restante como *glicose 1-fosfato*.

A glicose 1-fosfato é convertida pela *fosfoglicomutase* a glicose 6-fosfato. No músculo, a glicose 6-fosfato pode ser degradada pela glicólise anaeróbia, formando lactato, o destino metabólico preponderante nas fibras rápidas, ou pelo metabolismo oxidativo aeróbio (glicólise aeróbia, ciclo de Krebs, cadeia respiratória), produzindo CO_2 e H_2O, típico das fibras lentas.

Como o glicogênio é degradado por fosforólise, o produto formado é a glicose fosforilada: para originar glicose livre, o fosfato tem de ser

removido. No fígado, a glicose 6-fosfato é hidrolisada por ação da *glicose 6-fosfatase*, produzindo glicose (Figura 13.5). A glicose, ao contrário da glicose fosforilada, pode atravessar a membrana plasmática por meio de permeases específicas (Seção 19.6.3). A glicose 6-fosfatase fica inserida na membrana do retículo endoplasmático, com o sítio catalítico voltado para o lúmen da organela e requer transportadores para o substrato (glicose 6-fosfato) e os produtos da reação (glicose e fosfato inorgânico). A deficiência de glicose 6-fosfatase causa a doença hereditária do metabolismo de glicogênio tipo I (GSD I, de ***G**lycogen **S**torage **D**isease type **I***) ou doença de von Gierke (Tabela 13.1), caracterizada principalmente por hipoglicemia grave no jejum, grande aumento do depósito de glicogênio hepático, hiperlipidemia etc. A falta do transportador de glicose 6-fosfato é a causa de uma variante de GSD I, denominada GSD Ib.

A glicose 6-fosfatase ocorre nos rins, além do fígado, onde participa também da gliconeogênese (Seção 14.2).

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 extremidade não redutora. Assim, cerca de 50% das ramificações da cadeia de glicogênio muscular são degradadas em poucos segundos. O processo atende à demanda energética muscular intensa indicada pela liberação de adrenalina; no caso da glicogenólisehepática, ativada por glucagon, a rapidez do processo corrige o nível glicêmico, evitando a hipoglicemia. A degradação do glicogênio geralmente não é completa, restando um núcleo não degradado que serve de ponto de partida para a ressíntese.

Tabela 13.1 Doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio.

Tipo	Nome	Enzima deficiente	Consequências
I	von Gierke	Glicose 6-fosfatase	Acúmulo de glicogênio hepático e hepatomegalia; inabilidade de corrigir a glicemia no jejum
II	Pompe[1]	α-1,4 Glicosidase[2]	Acúmulo generalizado de glicogênio;

			insuficiência cardiorrespiratória e morte geralmente antes dos 2 anos de idade na forma infantil
III	Cori	Enzima desramificadora	Glicogênio com ramificações curtas, resultantes da ação da glicogênio fosforilase; hipoglicemia e hepatomegalia menos severas que no tipo I
IV	Andersen	Enzima ramificadora	Glicogênio com cadeias muito longas não ramificadas; geralmente fatal
V	McArdle	Glicogênio fosforilase muscular	Acúmulo de glicogênio muscular; incapacidade de realizar exercícios intensos
VI	Hers	Glicogênio fosforilase hepática	Semelhantes às do tipo I, mas menos intensas
VII	Tarui	Fosfofrutoquinase 1 muscular e de hemácias	Semelhantes à do tipo V, além de anemia hemolítica

[1] Existem três formas da doença: infantil (a mais grave), juvenil e adulta.

[2] Enzima lisossômica que hidrolisa os segmentos lineares do glicogênio; em indivíduos normais, constitui uma via secundária do metabolismo do glicogênio.

Para cada unidade de glicose incorporada ao glicogênio há consumo de 2 ATP

O glicogênio é sintetizado pela *glicogenogênese*, uma via diferente da via de degradação. A síntese consiste na repetida adição de unidades de glicose às extremidades não redutoras de um fragmento de glicogênio. A glicose a ser incorporada deve estar sob uma forma ativada, ligada a um nucleotídio de uracila, constituindo *uridina difosfato glicose (UDP-Glicose)* (Figura 13.2).

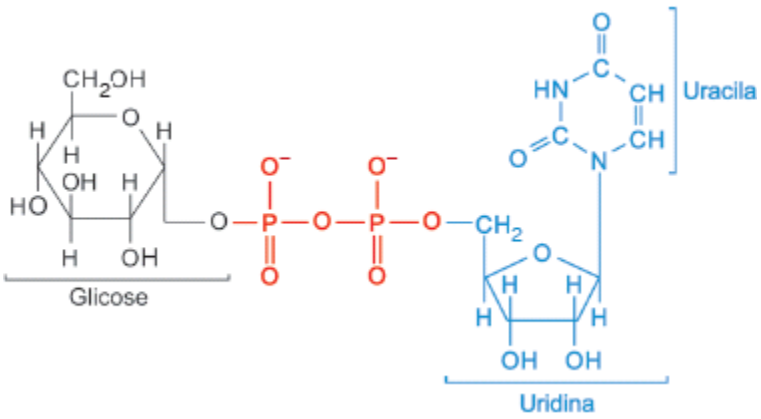


Figura 13.2 Estrutura da uridina difosfato glicose (UDP-G).

UDP-Glicose é produzido a partir de glicose por uma série de reações: (1) fosforilação de glicose, com consumo de ATP, catalisada pela glicoquinase no fígado e hexoquinase no músculo; (2) isomerização da glicose 6-fosfato a glicose 1-fosfato, pela fosfoglicomutase e (3) reação deste açúcar com UTP formando UDP-Glicose e pirofosfato ($HP_2O_7^{3-}$ ou PP_i), promovida pela *UDP-glicose pirofosforilase*:

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP} + H^+ \quad (1)$$

$$\text{Glicose 6-fosfato} \rightleftharpoons \text{Glicose 1-fosfato} \quad (2)$$

$$\text{Glicose 1-fosfato} + \text{UTP} \rightleftharpoons \text{UDP-Glicose} + PP_i \quad (3)$$

O pirofosfato é hidrolisado por ação da *pirofosfatase*, produzindo fosfato inorgânico (HPO_4^{2-} ou P_i):

$$PP_i + H_2O \longrightarrow 2\,P_i + H^+ \quad (4)$$

A formação de UDP-Glicose está detalhada na Figura 13.3:

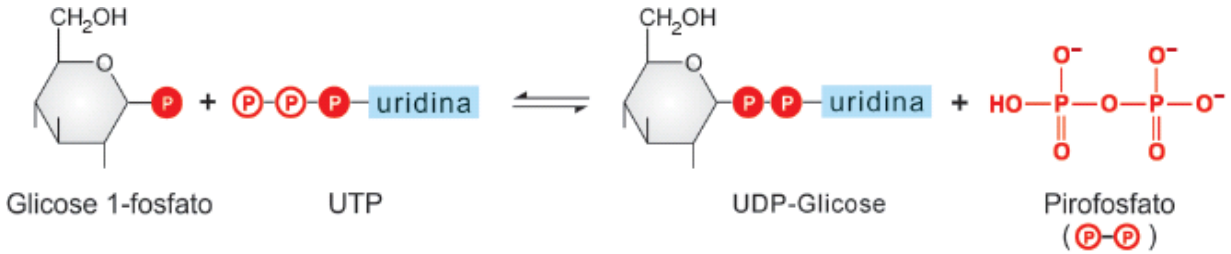


Figura 13.3 Reação catalisada pela UDP-glicose pirofosforilase.

UDP-Glicose é substrato da *glicogênio sintase*, a enzima que, efetivamente, catalisa a síntese — ela transfere a unidade glicosil de UDP-Glicose para uma das extremidades não redutoras do glicogênio, formando uma ligação α-1,4:

$$\text{UDP-Glicose} + (\text{Glicogênio})_{n \text{ resíduos de glicose}} \longrightarrow (\text{Glicogênio})_{n+1 \text{ resíduos de glicose}} + \text{UDP} \qquad (5)$$

O UDP é reconvertido a UTP à custa de ATP, pela *nucleosídio difosfato quinase*:

$$\text{UDP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{UTP} + \text{ADP} \qquad (6)$$

A soma das reações 1 a 6 é:

$$\text{Glicose} + 2\ \text{ATP} + (\text{Glicogênio})_{n \text{ resíduos de glicose}} + H_2O \rightarrow (\text{Glicogênio})_{n+1 \text{ resíduos de glicose}} + 2\ \text{ADP} + 2\ P_i$$

mostrando um gasto de 2 ATP para cada resíduo de glicose incorporado ao glicogênio.

Além da glicogênese, muitos processos biossintéticos contêm reações reversíveis que produzem PP_i, incluindo as sínteses de DNA e RNA. O pirofosfato é sempre hidrolisado pela pirofosfatase, uma enzima muito ativa e amplamente distribuída pelos tecidos. Esta hidrólise, altamente irreversível, é um fator importante para impedir a reversibilidade dos processos que produzem pirofosfato.

A glicogênio sintase catalisa apenas a síntese de ligações α-1,4. As ramificações são feitas pela *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 (Figura 13.4). A síntese prossegue por adição de resíduos de glicose às extremidades não redutoras, catalisada pela glicogênio sintase.

A reação promovida pela glicogênio sintase prevê a existência de uma cadeia de glicogênio já constituída (*primer*), à qual são agregadas novas unidades de glicose – a enzima não é capaz de promover a união das duas primeiras unidades de glicose para iniciar o polímero. Quando, na degradação anterior, não houver permanecido um núcleo de glicogênio que dê suporte para a extensão da cadeia, faz-se necessária a atuação de outra enzima, a *glicogenina*, que catalisa duas reações. Ela inicia a síntese com sua autoglicosilação, transferindo o primeiro resíduo de glicose, derivado de UDP-Glicose, ao grupo OH da cadeia lateral de um dos seus resíduos de tirosina. Em seguida, a glicogenina catalisa a incorporação de novos resíduos de glicose, unidos por ligações α-1,4 e sempre provenientes de UDP-Glicose, até formar uma pequena cadeia de 10-20 resíduos. Neste momento entra em ação a glicogênio sintase, que prossegue a polimerização, e a glicogenina desliga-se do polímero em crescimento. A glicogenina é uma enzima com atuação pouco usual: é o substrato, o catalisador e o produto da reação.

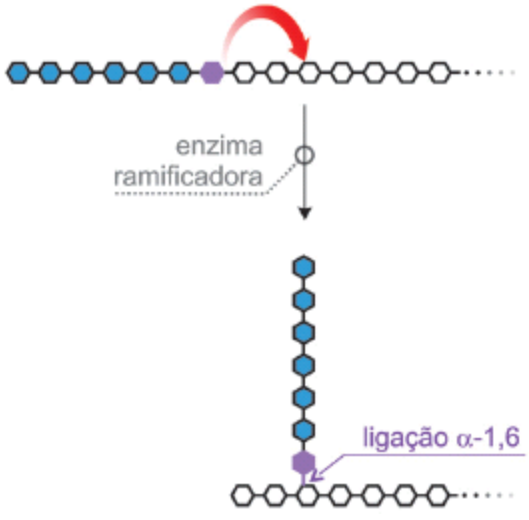


Figura 13.4 Formação de uma ramificação da cadeia de glicogênio.

As vias de degradação e síntese do glicogênio hepático estão resumidas na Figura 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.

A regulação do metabolismo do glicogênio hepático e muscular está descrita na Seção 20.1.

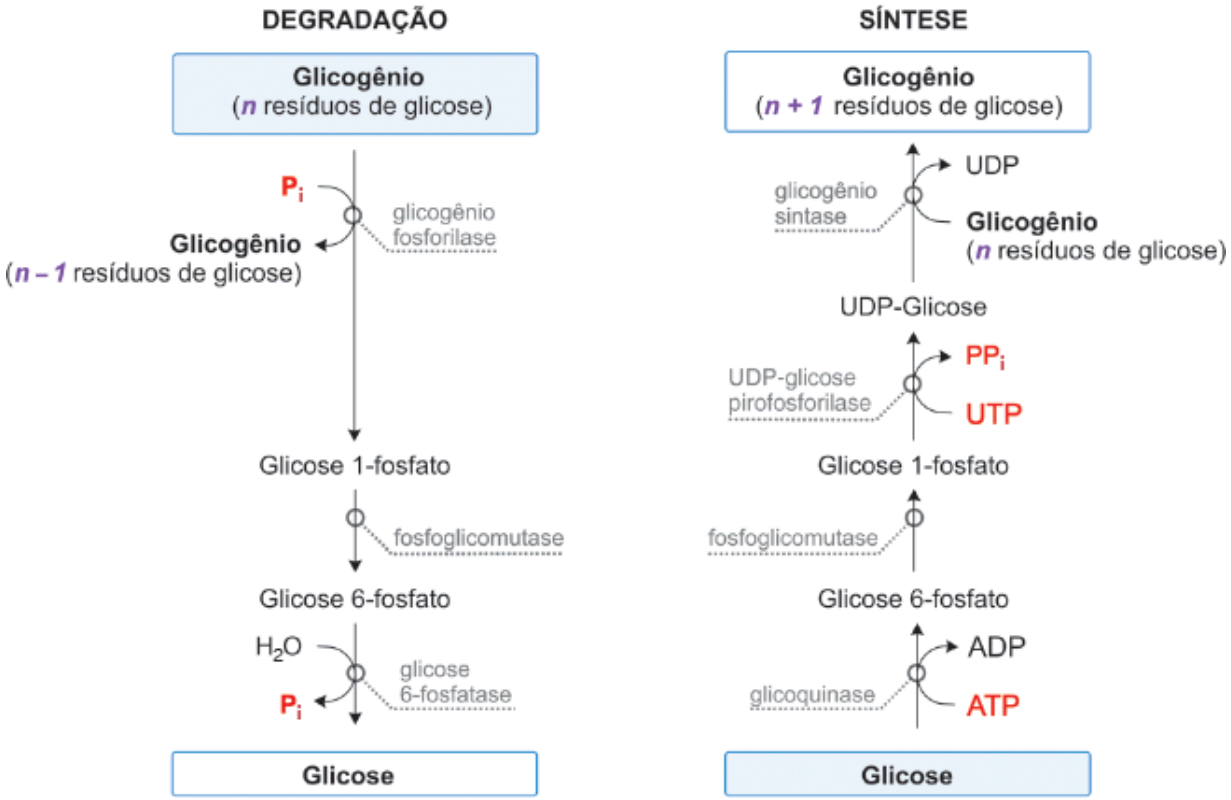


Figura 13.5 Esquema geral da degradação e síntese de glicogênio no fígado.

Doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio

São conhecidas várias moléstias hereditárias cuja causa primária é a ausência ou diminuição da atividade de uma das enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio; em 2010, foi descrita uma nova doença, devida a uma mutação no gene da isoforma muscular da glicogenina. Os portadores destas moléstias geralmente apresentam aumento do depósito de

glicogênio que, em alguns casos, aparece com estrutura anormal. Nas doenças de acúmulo de glicogênio hepático (GSDs), a hipoglicemia é o primeiro marcador clínico de comprometimento do fígado; nos casos de acúmulo de glicogênio nos músculos esqueléticos, os sintomas são fraqueza muscular (hipotonia) e câimbras. A Tabela 13.1 apresenta algumas das doenças hereditárias do metabolismo do glicogênio, indicando a enzima alterada e os principais sintomas observados nos portadores dessas anomalias.

13.2 Síntese de amido

O amido é o principal carboidrato de reserva dos vegetais. Geralmente é associado a órgãos de armazenamento, como sementes, raízes e tubérculos (Seção 6.1), mas sua síntese ocorre também nas folhas da maioria das plantas. Ou seja, o amido é um produto primário da fotossíntese, além da sacarose.

Nas folhas, parte do carbono assimilado pelo ciclo de Calvin (Seção 15.4) é retida no cloroplasto e estocada como amido para utilização durante a noite e parte é transportada para o citosol onde origina sacarose. A sacarose é distribuída a outros tecidos, não fotossintéticos, onde pode ser consumida como fonte de energia ou originar polissacarídios de reserva (amido) ou estruturais (celulose, lignina etc.).

O amido é composto por cadeias lineares de resíduos de glicose unidos por ligações α-1,4 e cadeias contendo ramificações formadas por ligações α-1,6 (Seção 6.1). A síntese do amido, similar à do glicogênio, envolve a ação coordenada da *amido sintase*, que catalisa a adição de unidades de glicose às extremidades não redutoras por ligações α-1,4, e da *enzima ramificadora*, que promove a formação das ligações α-1,6. A natureza do fragmento iniciador da síntese (*primer*) não é conhecida. O substrato da amido sintase é a forma ativada da glicose, a *adenosina difosfato glicose* (*ADP-Glicose*), em vez do UDP-Glicose utilizado pela glicogênio sintase. A produção de ADP-Glicose é catalisada pela *ADP-glicose pirofosforilase*:

$$\text{Glicose 1-fosfato} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP-Glicose} + PP_i$$

A incorporação de glicose ao polímero é catalisada pela amido sintase:

$$\text{ADP-Glicose} + (\text{Amido})_{n \text{ resíduos de glicose}} \rightarrow (\text{Amido})_{n+1 \text{ resíduos de glicose}} + \text{ADP}$$

Nos cloroplastos, a glicose 1-fosfato origina-se por isomerização da glicose 6-fosfato formada no ciclo de Calvin e todas as etapas de sua conversão em amido ocorrem nos cloroplastos (Figura 13.6). Nos tecidos não fotossintéticos, de reserva de amido, como tubérculos, sementes etc., a glicose 1-fosfato é derivada da sacarose, proveniente das folhas. Nesses tecidos, a síntese de amido a partir de sacarose compreende uma série de etapas, catalisadas por enzimas do citosol e dos amiloplastos (Figura 13.7).

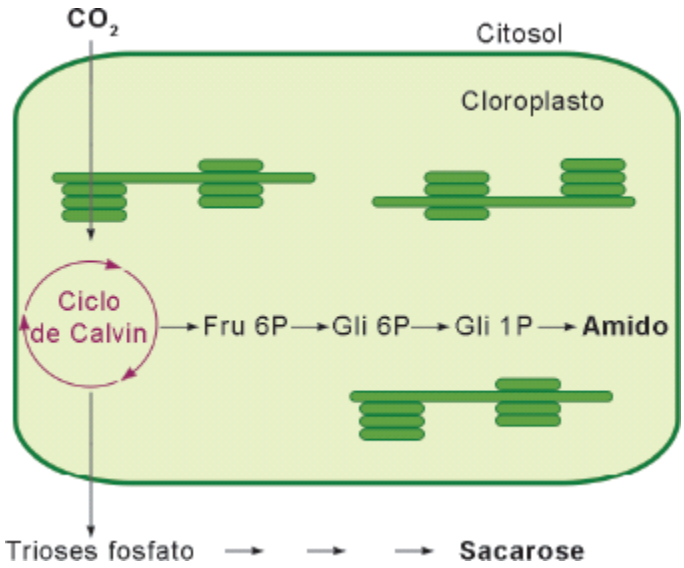


Figura 13.6 Nas folhas, o carbono assimilado pelo ciclo de Calvin é utilizado em duas vias de síntese: de amido no cloroplasto e de sacarose no citosol.

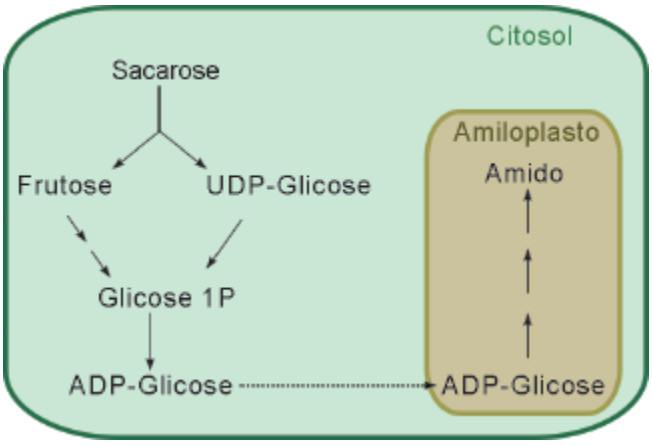


Figura 13.7 Esquema simplificado da conversão de sacarose em amido nos órgãos de armazenamento (tubérculos, sementes etc.).

A via de síntese de amido envolve a participação, além da sintase e da enzima ramificadora, de uma enzima desramificadora. Sua função seria remover seletivamente ramificações muito curtas e numerosas ou incorretamente posicionadas: a síntese é acompanhada por um processo de correção.

13.3 Metabolismo de sacarose e lactose

Sacarose e lactose originam, além de glicose, frutose e galactose

A sacarose constitui uma fonte quantitativamente importante de energia na dieta humana. A lactose, o principal carboidrato do leite, além de ser fundamental nos primeiros meses de vida, também faz parte da dieta dos adultos, por estar presente nos laticínios. Estes dissacarídios são hidrolisados no intestino delgado, por *sacarase* e *lactase*, respectivamente (Figura 13.8). A sacarose produz glicose e frutose; a lactose libera glicose e galactose – os monossacarídios são, então, absorvidos. A deficiência de lactase em indivíduos adultos é relativamente comum, resultando em *intolerância à lactose*: não sendo hidrolisada no intestino delgado, a lactose sofre fermentação bacteriana, que ocasiona flatulência, dor abdominal e diarreia.

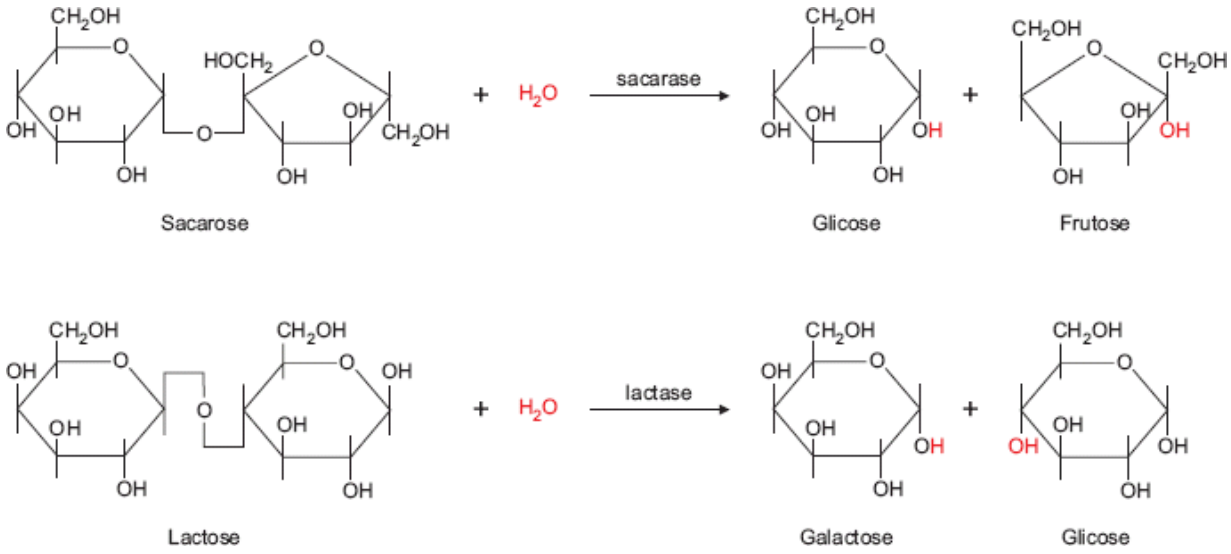


Figura 13.8 Hidrólise de sacarose e lactose.

Frutose e galactose são metabolizadas, em sua maior parte no fígado, por conversão a intermediários da glicólise (Figura 13.9).

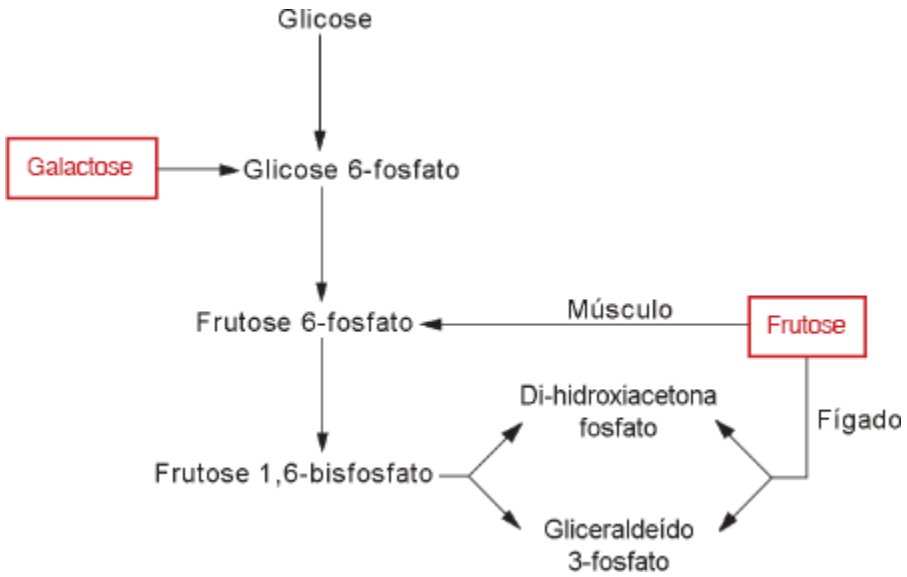


Figura 13.9 Frutose e galactose são metabolizadas pela via glicolítica.

No fígado, a **frutose** é convertida a di-hidroxiacetona fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, pelas seguintes reações:

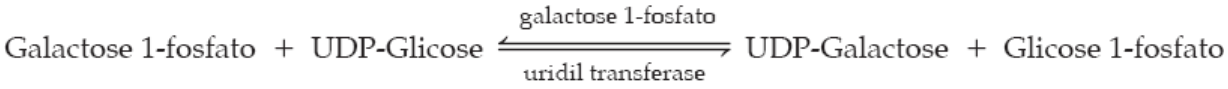
A soma das três reações mostra a transformação de frutose em compostos da via glicolítica:

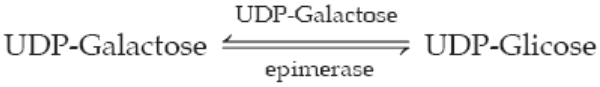
Frutose + 2 ATP → Di-hidroxiacetona fosfato + Gliceraldeído 3-fosfato + 2 ADP + 2 H^+

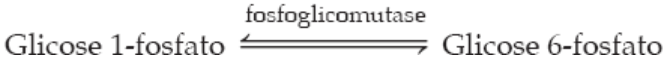
Em outros tecidos, como adiposo e músculo, que sintetizam hexoquinase, a frutose é convertida a frutose 6-fosfato por esta enzima, ganhando acesso à glicólise:

Frutose + ATP → Frutose 6-fosfato + ADP + H^+

Galactose e glicose são *epímeros*[1] no carbono 4. A transformação de uma das hexoses na outra compreende, entretanto, uma série de reações, uma vez que a epimerização só é feita com os açúcares ligados a UDP:





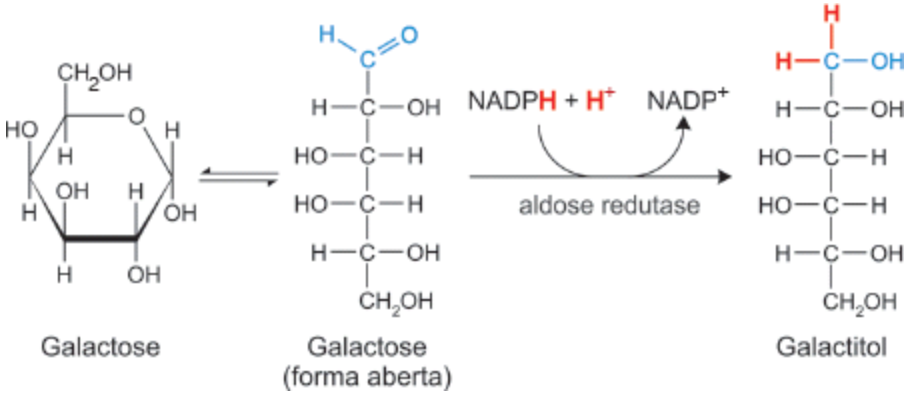


O resultado das quatro reações é a conversão de galactose em glicose 6-fosfato, que pode ser consumida pela via glicolítica:

$$\text{Galactose} + \text{ATP} \rightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP} + H^+$$

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 compromete o desenvolvimento físico e mental. A impossibilidade de converter galactose em glicose leva à utilização daquele açúcar por vias pouco significativas em indivíduos saudáveis, como 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 também deve ser precoce, é feito pela dosagem de galactose 1-fosfato uridil transferase nas hemácias.

Bibliografia

Carlin MP *et al.*: Determining mutations in G6PC and SLC37A4 genes in a sample of Brazilian patients with glycogen storage disease types Ia and Ib. *Genet Mol Biol* **36** (4): 502-506, 2013.

Nilsson J *et al.*: Molecular pathogenesis of a new glycogenosis caused by a glycogenin-1 mutation. *Biochim Biophys Acta* **1822** (4): 493-499, 2012.

Roach PJ *et al*.: Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem J* **441** (3): 763-787, 2012.

Tishkoff SA *et al*.: Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat Genet* **39**: 31-40, 2007.

Zeeman SC *et al*.: Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol* **61**: 209-234, 2010.

[1] *Epímeros são* açúcares que diferem apenas quanto à configuração de um átomo de carbono.

OceanofPDF.com

14 Gliconeogênese

14.1 Origem da glicose circulante em animais superiores

A maioria das células de animais superiores é capaz de suprir suas necessidades energéticas a partir da oxidação de vários tipos de compostos: açúcares, ácidos graxos, aminoácidos etc. Alguns tecidos e células desses organismos, entretanto, utilizam exclusivamente glicose como fonte de energia (Tabela 14.1). Este é o caso do cérebro, que consome aproximadamente 120 g de glicose por dia, e das hemácias, que necessitam, em média, de 30 g diários. A oxidação de glicose pelo cérebro corresponde a cerca de 75% do total de glicose oxidada por dia por um ser humano adulto, independentemente da atividade mental desempenhada.

O organismo dispõe de vias metabólicas destinadas a manter o nível basal de glicose circulante capaz de atender as necessidades energéticas daqueles tipos de células entre as refeições ou durante o jejum: glicogenólise (Seção 13.1) e gliconeogênese. Após as refeições, a absorção dos alimentos faz aumentar a glicemia (concentração de glicose plasmática). Neste período, a liberação de insulina pelo pâncreas permite a absorção de glicose por todos os tecidos. Gradativamente, a glicemia diminui e, ao ser atingido um nível basal, ocorre uma alteração na secreção pancreática: a insulina é substituída por glucagon. Este hormônio estimula a degradação do glicogênio hepático e a liberação de glicose do fígado mantém a glicemia basal. No entanto, a reserva hepática de glicogênio é limitada e insuficiente para manter níveis glicêmicos normais além de 8 horas de jejum. Depois deste período, a contribuição do glicogênio hepático decresce, ao mesmo tempo em que é acionada outra via metabólica de produção de glicose: a *gliconeogênese*. Como seu nome indica, a

glico***neo***gênese consiste na síntese de glicose a partir de compostos que não são carboidratos.

Nos seres humanos, o fígado e os rins[1] são os principais órgãos responsáveis pela gliconeogênese e os precursores mais importantes de glicose são: ***aminoácidos***, ***lactato*** e ***glicerol***. Todos os *aminoácidos*, com exceção de lisina e leucina, podem originar glicose: são os *aminoácidos glicogênicos*. A degradação de lisina e leucina produz somente acetil-CoA, como acontece com os ácidos graxos, e os animais são incapazes de sintetizar glicose a partir de acetil-CoA. Os aminoácidos são provenientes da degradação de proteínas endógenas, fundamentalmente as musculares, durante o jejum. No músculo, e em outros tecidos, os aminoácidos são convertidos a *alanina* e *glutamina*, suas principais formas de transporte (Seção 17.2.1). O *lactato* origina-se dos músculos submetidos a contração intensa e de outras células que degradam glicose anaerobiamente — hemácias, medula renal, retina etc. No fígado e nos rins, alanina e lactato convertem-se em piruvato e glutamina em oxaloacetato, que originam glicose pela gliconeogênese; o grupo amino dos aminoácidos é excretado como ureia (Figura 14.1). O *glicerol*, derivado da hidrólise de triacilgliceróis do tecido adiposo durante o jejum, tem pequena importância quantitativa na produção de glicose.

Tabela 14.1 Fonte de energia para diferentes tecidos.

	Composto		
Tecido	**Glicose**	**Ácidos graxos**	**Corpos cetônicos**
Cérebro*	+		
Hemácias e leucócitos	+		
Medula renal	+		
Retina	+		
Mucosa intestinal	+		
Fígado	+	+	
Adiposo	+	+	

Músculos esqueléticos e cardíaco	+	+	+
Córtex renal	+	+	+

*O cérebro, no jejum prolongado, torna-se capaz de oxidar corpos cetônicos.

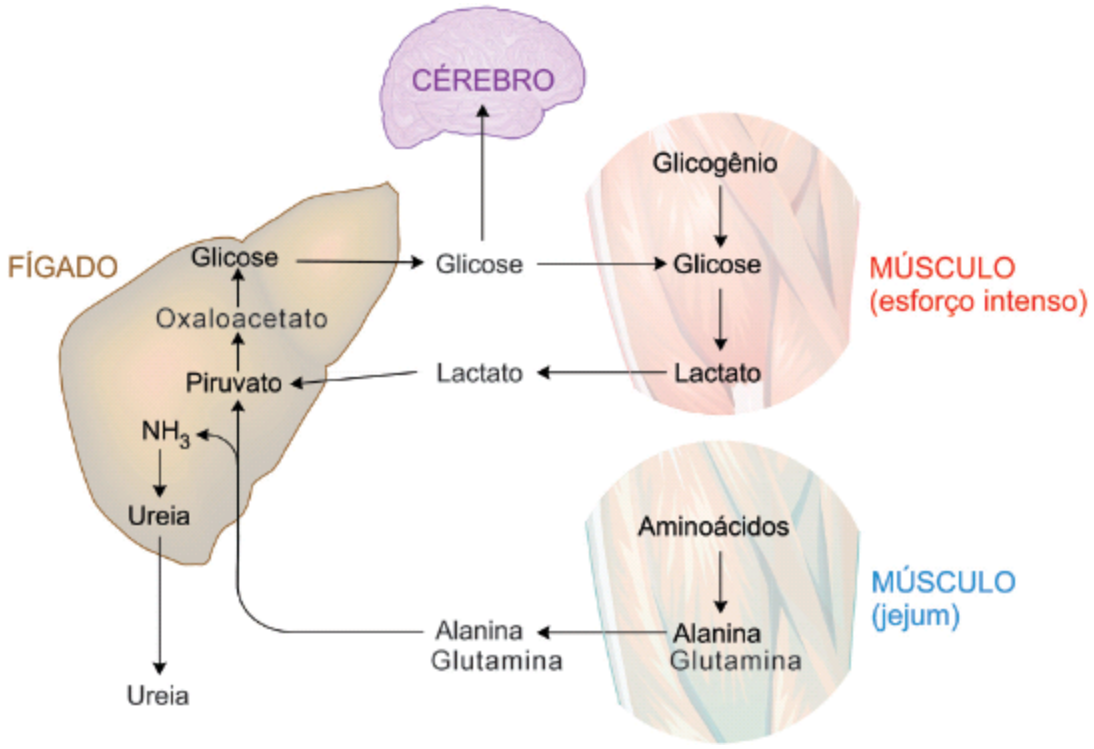


Figura 14.1 Relação entre diferentes órgãos na gliconeogênese — esta via ocorre no fígado e nos rins, a partir de substratos produzidos pelo músculo: alanina e glutamina no jejum e lactato no esforço intenso; o lactato origina-se, ainda, de hemácias e outras células. A maior parte da glicose sintetizada destina-se ao cérebro.

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, por ação, respectivamente, da *alanina aminotransferase* (Seção 17.2.1) e da lactato desidrogenase (Seção 9.2.1).

A glutamina é inicialmente convertida em α-cetoglutarato por meio das reações catalisadas por *glutaminase* e *glutamato desidrogenase*; a *aspartato aminotransferase* transforma α-cetoglutarato em oxaloacetato (Seção 17.2.1).

A conversão de piruvato em glicose pela gliconeogênese processa-se no sentido oposto ao da glicólise (Figura 9.5, Seção 9.2), utilizando quase todas as suas enzimas, com exceção daquelas que catalisam reações irreversíveis: piruvato quinase, fosfofrutoquinase 1 e glicoquinase. Estas reações são substituídas por ***outras*** reações, catalisadas, naturalmente, por ***outras*** enzimas. As três etapas em que a gliconeogênese difere da glicólise são analisadas a seguir.

Etapa 1. Conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato.

A reação catalisada pela *piruvato quinase* (Fosfoenolpiruvato + ADP → Piruvato + ATP) → substituída por duas reações, catalisadas pela *piruvato carboxilase* (1) e pela *fosfoenolpiruvato carboxiquinase* (2):

$$\text{Piruvato} + CO_2 + H_2O + \text{ATP} \longrightarrow \text{Oxaloacetato} + \text{ADP} + P_i + 2H^+ \quad (1)$$

$$\text{Oxaloacetato} + \text{GTP} \rightleftharpoons \text{Fosfoenolpiruvato} + CO_2 + \text{GDP} \quad (2)$$

Para ser utilizado como substrato da piruvato carboxilase, uma enzima mitocondrial, o piruvato produzido no citosol entra na mitocôndria por ação da piruvato translocase. A piruvato carboxilase contém *biotina* (vitamina B_7), como grupo prostético. A biotina combina-se com CO_2 à custa de ATP e promove a carboxilação do piruvato, produzindo oxaloacetato (Figura 14.2).

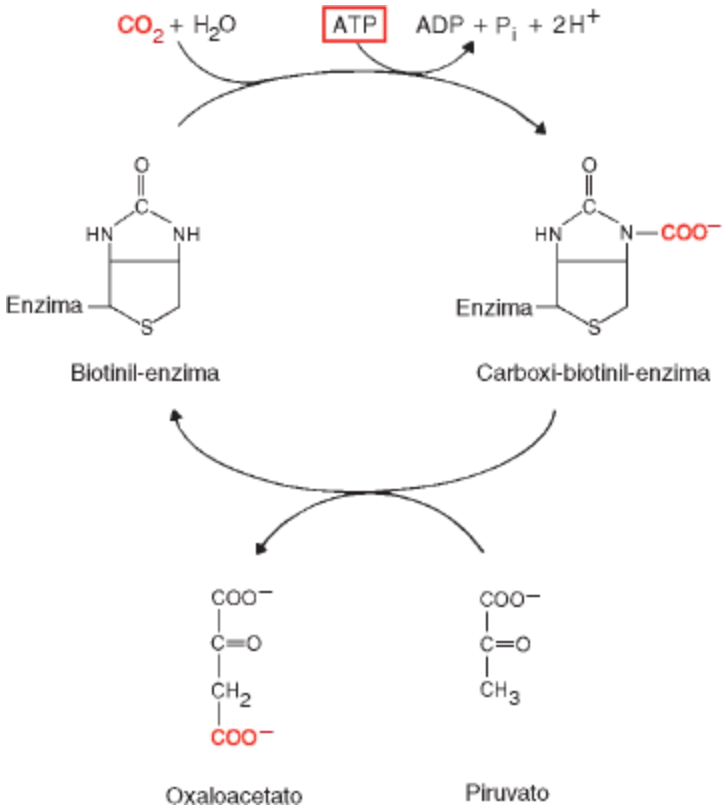


Figura 14.2 Carboxilação de piruvato formando oxaloacetato: o ATP é consumido na carboxilação da biotina, que transfere o grupo – COO^- para o piruvato.

O oxaloacetato passa para o citosol pela lançadeira do malato-aspartato e, por ação da fosfoenolpiruvato carboxiquinase, é convertido a fosfoenolpiruvato, por descarboxilação e fosforilação à custa de GTP (Figura 14.3). Em alguns organismos, como os seres humanos, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase localiza-se também na mitocôndria — o fosfoenolpiruvato formado na organela é transportado para o citosol pela tricarboxilato translocase (Seção 11.9).

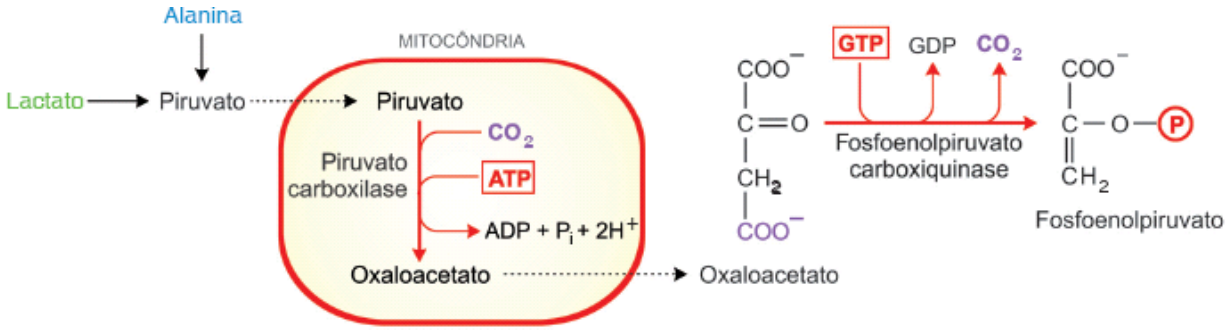


Figura 14.3 A conversão de piruvato a fosfoenolpiruvato compreende o transporte de piruvato para a mitocôndria, sua carboxilação a oxaloacetato, a transferência de oxaloacetato para o citosol e a transformação deste composto em fosfoenolpiruvato. As setas tracejadas indicam transporte por translocases.

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.

Etapa 2. Conversão de frutose 1,6-bisfosfato a frutose 6-fosfato.

Em substituição à reação irreversível catalisada pela fosfofrutoquinase 1, ocorre uma reação de hidrólise do grupo fosfato do carbono 1, catalisada pela *frutose 1,6-bisfosfatase*.

$$\text{Frutose 1,6-bisfosfato} + H_2O \rightarrow \text{Frutose 6-fosfato} + P_i$$

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 trocada pela hidrólise do grupo fosfato ligado ao carbono 6, catalisada pela *glicose 6-fosfatase*.

$$\text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \rightarrow \text{Glicose} + P_i$$

A glicose, diferentemente da glicose fosforilada, pode ser transportada através da membrana plasmática (Seção 19.6.3) e ser liberada na circulação.

A glicose 6-fosfatase tem papel primordial na manutenção da glicemia por catalisar a etapa final comum à degradação do glicogênio hepático (Seção 13.1) e à gliconeogênese. A enzima ocorre principalmente em fígado e rins, que podem exportar glicose e corrigir a glicemia.

O glicerol, para ser usado como composto gliconeogênico, é fosforilado a glicerol 3-fosfato, que é oxidado a di-hidroxiacetona fosfato (Seção 16.1). Este é um composto da via glicolítica e pode prosseguir em direção à glicose pelas reações da glicólise e as substitutivas (frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase).

A Figura 14.4 apresenta um esquema geral da gliconeogênese.

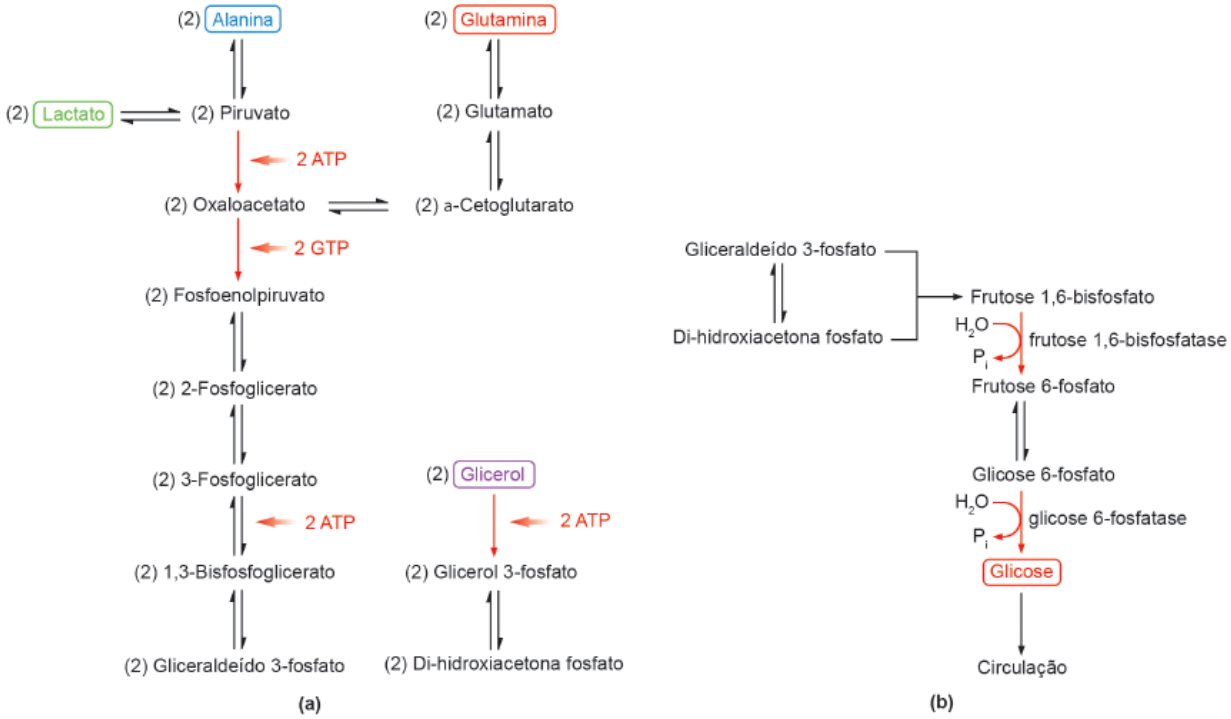


Figura 14.4 Gliconeogênese. a) Conversão dos precursores de glicose — alanina, glutamina, lactato e glicerol — em intermediários da via. b) As trioses fosforiladas, originadas dos compostos gliconeogênicos, se interconvertem e se condensam, formando frutose 1,6-bisfosfato; o açúcar bisfosforilado se converte em glicose, que pode ser exportada.

14.3 Balanço energético da gliconeogênese

A gliconeogênese é uma via de síntese, pois produz um composto de seis carbonos, a glicose, a partir de precursores de três carbonos, a alanina, o lactato e o glicerol, ou de cinco carbonos, a glutamina. Como todas as sínteses, é um processo que consome energia, sob a forma de ATP. Nos casos de alanina e lactato, 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 contabilizado como ATP) e fosfoglicerato quinase (Figura 14.4).

A equação geral da gliconeogênese a partir de alanina é:

2 Alanina → 2 Piruvato (Seção 17.2.1)

2 Piruvato + 6 ATP + 6 H_2O + 2 NADH → Glicose + 6 ADP + 6 P_i + 2 NAD^+ + 2 H^+

A equação a partir de glutamina é:

2 Glutamina → 2 Oxaloacetato (Seção 17.2.1).

2 Oxaloacetato + 4 ATP + 4 H_2O + 2 NADH + 2 H^+ ¡ Glicose + 2 CO_2 + 4 ADP + 2 NAD^+ + 4 P_i

Se o composto inicial for o lactato, a equação transforma-se em:

$$2\,\text{Lactato} + 2\,NAD^+ \longrightarrow 2\,\text{Piruvato} + 2\,NADH + 2\,H^+$$
$$2\,\text{Piruvato} + 6\,ATP + 6\,H_2O + 2\,NADH \longrightarrow \text{Glicose} + 6\,ADP + 6\,P_i + 2\,NAD^+ + 2\,H^+$$
$$\overline{2\,\text{Lactato} + 6\,ATP + 6\,H_2O \longrightarrow \text{Glicose} + 6\,ADP + 6\,P_i + 4\,H^+}$$

No caso do glicerol, a síntese de uma molécula de glicose consome apenas 2 ATP na reação catalisada pela glicerol quinase:

2 Glicerol + 2 ATP → 2 Glicerol 3-fosfato + 2 ADP + 2 P_i + 2 H^1

O glicerol 3-fosfato é substrato da glicerol 3-fosfato desidrogenase, convertendo-se em di-hidroxiacetona fosfato:

$$2\ \text{Glicerol 3-fosfato} + 2\ NAD^+ \rightarrow 2\ \text{Di-hidroxiacetona fosfato} + 2\ NADH + 2\ H^+$$

A di-hidroxiacetona fosfato transforma-se em glicose pelas reações reversíveis da glicólise e pelas reações da frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase.

A equação geral da gliconeogênese a partir de glicerol é:

$$2\ \text{Glicerol} + 2\ ATP + 2\ H_2O + 2\ NAD^+ \rightarrow \text{Glicose} + 2\ ADP + 2\ P_i + 2\ NADH + 4\ H^+$$

Para fornecer glicose aos tecidos que dela dependem, o fígado e os rins têm um gasto adicional de ATP, além daquele necessário à sua manutenção. Nas condições em que a gliconeogênese está ativada, a obtenção de ATP provém da oxidação de ácidos graxos.

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. Não é, portanto, verdadeira a ideia difundida que a degradação de proteínas com finalidade de obter energia só se processa quando estão esgotadas as reservas de carboidratos e de lipídios do organismo — a degradação dos três tipos de macronutrientes é acionada simultaneamente, induzida por glucagon. 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.*

A síntese de glicose à custa de aminoácidos significa uma diminuição da capacidade de reposição de proteínas. Ou seja, os períodos de jejum correspondem a perda de proteínas. No organismo humano, não há reserva de proteínas: todas as proteínas são funcionais e a diminuição de sua concentração traz prejuízos. Do ponto de vista quantitativo, os aminoácidos

utilizados pela gliconeogênese são provenientes dos músculos, onde está a maior parte das proteínas corpóreas. Entretanto, a meia-vida de enzimas é muito menor do que a de proteínas estruturais e sua degradação provê aminoácidos para a gliconeogênese mais precocemente. Qualitativamente, a diminuição da concentração de enzimas é mais importante porque afeta todo o metabolismo.

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, esta grande maioria de ácidos graxos são convertidos a acetil-CoA e *não há vias de conversão de acetil-CoA a glicose nos mamíferos*. Os ácidos graxos de número ímpar de carbonos ou contendo ramificações na sua cadeia originam, quando oxidados, além de acetil-CoA, propionil-CoA (Seção 16.2.2); este composto pode ser transformado em succinil-CoA, um intermediário do ciclo de Krebs, que pode 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 tal pelos mamíferos. Vegetais e bactérias são capazes de sintetizar glicose a partir de ácidos graxos, por possuírem as enzimas do ciclo do glioxilato (Seção 10.3), *ausente nos mamíferos.*

Assim, o catabolismo 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.

As atividades destas duas vias são inversamente reguladas, como é analisado na Seção 20.2.

Bibliografia

Boden GJ: Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes. *Investig Med* **52** (6): 375-378, 2004.

Gerich JE: Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med* **27**(2): 136-142, 2010.

Marcolongo P *et al*.: Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: state of the art and future trends. *Biochim Biophys Acta* **1830** (3): 2608-18, 2013.

Sprague JE, Arbeláez AM: Glucose counterregulatory responses to hypoglycemia. *Pediatr Endocrinol Rev* **9** (1): 463-473, 2011.

[1]Deve-se ressaltar a atuação distinta de dois componentes do rim: a *medula renal* consome glicose, que é oxidada a lactato pela glicólise, e o *córtex renal* produz glicose: os túbulos proximais, localizados no córtex, são a única porção do rim que contém as enzimas da gliconeogênese.

OceanofPDF.com

15 Fotossíntese

Para o desempenho de suas funções, os seres vivos utilizam, fundamentalmente, a energia química contida nas moléculas de ATP e uma fonte de poder redutor, papel cumprido pelo NADPH. A fonte primária de energia necessária para a síntese de ATP, a partir de ADP e P_i, e de NADPH, a partir de $NADP^+$ e ($H^+ + e^-$) difere entre os organismos: pode ser *luminosa* ou *química*. Segundo este critério, os organismos podem ser separados em dois grandes grupos: os *fototróficos*, que produzem ATP e NADPH utilizando a energia luminosa (organismos que fazem fotossíntese) e os *quimiotróficos* que os sintetizam aproveitando a energia derivada da oxidação de compostos químicos, orgânicos ou inorgânicos.

A designação *fototróficos* precisa ser claramente compreendida. Tais organismos também não prescindem de compostos oxidáveis, que podem ser inorgânicos (H_2O, H_2S, H_2 etc.) ou orgânicos (ácidos, alcoóis etc.); diferem dos demais seres vivos porque a oxidação desses compostos resulta da emissão de elétrons por absorção de radiação luminosa. Tanto nos organismos fototróficos como nos quimiotróficos, os elétrons provenientes dos compostos oxidados são transferidos para transportadores de elétrons, gerando um gradiente de prótons, cuja energia potencial é utilizada para produzir ATP; nos fototróficos, os elétrons são doados para $NADP^+$, formando NADPH.

Fotossíntese é o processo pelo qual a energia luminosa é transformada em energia química, sob a forma de ATP, NADPH e carboidratos. 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 fotos***síntese*** porque as coenzimas produzidas,

ATP e NADPH, são utilizadas para adicionar CO_2 a moléculas orgânicas, caracterizando uma síntese de carboidratos.

A incorporação de CO_2 a compostos orgânicos não é privilégio de células fotossintéticas. Ao contrário, tem ocorrência generalizada, incluindo as células animais: por reações 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 de sintetizar glicose a partir de aminoácidos ou lactato (gliconeogênese) e de sintetizar macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos, glicogênio e lipídios, a partir de moléculas precursoras pequenas. Em todos estes casos, entretanto, a energia (ATP e NADPH) empregada é sempre derivada da oxidação de compostos orgânicos, com liberação de CO_2, de tal maneira que, no saldo final, *nunca* há incorporação líquida de CO_2. Nos organismos fotossintéticos, por outro lado, as coenzimas ATP e NADPH consumidas na incorporação de CO_2 são obtidas com a utilização da energia luminosa e de doadores de elétrons do meio, havendo aumento *real* da massa de compostos orgânicos. Estes seres, por poderem viver tendo CO_2 como única fonte de carbono, são designados *autotróficos*. Os organismos que não fazem fotossíntese dependem dos autotróficos para a obtenção de carbono na forma de compostos orgânicos, razão pela qual são designados *heterotróficos*.

Como os organismos heterotróficos dependem da energia química presente nos compostos produzidos pelos seres autotróficos fotossintéticos, é possível afirmar que a energia consumida pelos sistemas biológicos deriva, em última instância, da energia solar. Como em muitos organismos a fixação de CO_2 é acompanhada da liberação de O_2, a fotossíntese contribui simultaneamente para gerar uma fonte de energia prontamente utilizável (ATP) e uma atmosfera aeróbia, dois fatores fundamentais para a manutenção da vida no planeta.

15.1 Fotossíntese *versus* oxidação da glicose

A equação geral da fotossíntese em muitos organismos é:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +2.870\ kJ \cdot mol^{-1}$$

Esta equação é o inverso da equação geral de oxidação da glicose, que ocorre em todas as células aeróbias:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -2.870\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Entretanto, deve ser ressaltado que a fotossíntese ***não*** é o inverso da oxidação de glicose, ao contrário do que as equações gerais parecem indicar. Deve-se lembrar que uma equação geral ***não*** representa uma reação química e mostra a transformação geral efetuada por uma via metabólica (Seção 8.3).

O valor do $\Delta G^{o\prime}$ (ou da constante de equilíbrio, da ordem de 10^{-500}) da equação geral da fotossíntese revela a inviabilidade de sua ocorrência espontânea. A produção de glicose a partir de CO_2 e H_2O 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.

Uma comparação entre a oxidação da glicose e a fotossíntese está apresentada na Figura 15.1. Nos dois processos, são gerados elétrons de alta energia — à custa da *energia química* das reações de oxidação-redução no caso da degradação da glicose e à custa da *energia luminosa* na fotossíntese — que são doados para cadeias de transporte de elétrons. Na oxidação da glicose, o doador inicial de elétrons, eles originam coenzimas reduzidas, NADH principalmente, que os entregam à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, cujo aceptor final é o oxigênio, que é reduzido a água. Nas cadeias de transporte de elétrons integrantes da fotossíntese, o doador inicial de elétrons é a água e o aceptor final, a coenzima $NADP^+$, que é reduzida a NADPH; o oxigênio é um dos produtos do processo. Em ambos os casos, o transporte de elétrons origina um gradiente de prótons, a partir do qual o ATP é sintetizado.

A comparação entre fotossíntese e oxidação da glicose tem interesse apenas didático e justifica-se pela intensa síntese deste carboidrato nas células de vegetais superiores.

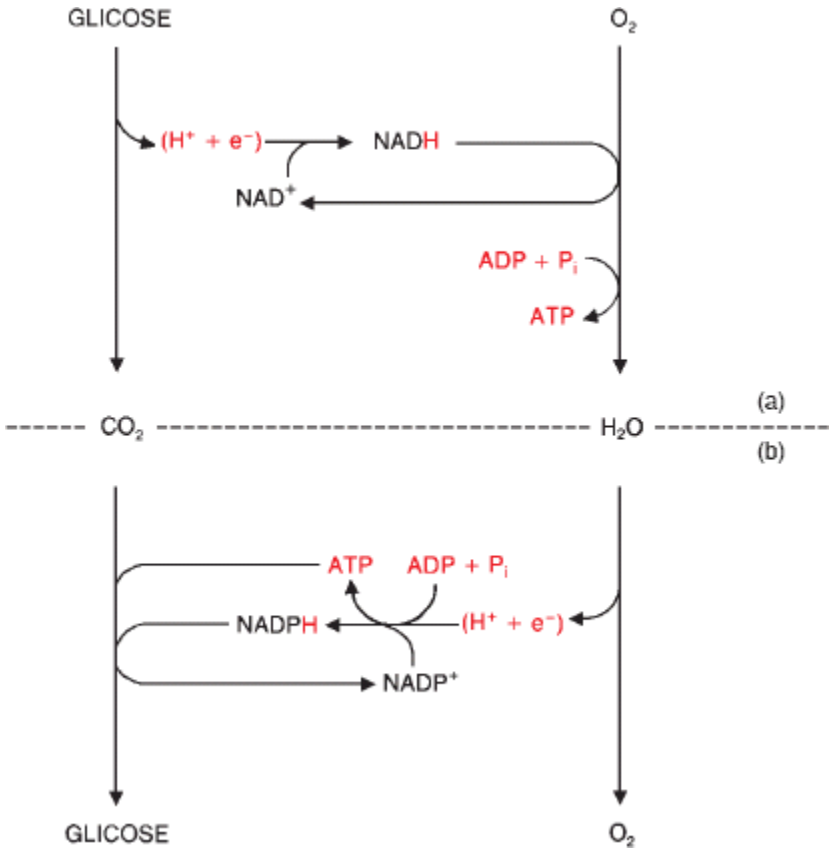


Figura 15.1 Esquema comparativo entre a oxidação da glicose (a) e a sua síntese pela fotossíntese (b).

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, oxidando parcialmente compostos orgânicos disponíveis no meio, por fermentação; alcoóis e ácidos orgânicos resultantes das fermentações eram excretados para o meio. Em um estágio posterior da evolução, a escassez crescente de material orgânico prontamente 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 são produzidos por fermentação; ainda mais, os doadores de hidrogênio disponíveis — ácidos orgânicos originados de

fermentação, H_2S, H_2 etc. — tinham 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 $NAD(P)^+$ formando NAD(P)H, estes, sim, compostos capazes de reduzir CO_2. Em outras palavras, estas condições permitiram o aparecimento das primeiras bactérias fotossintéticas.

Essas bactérias, que originaram as bactérias verdes e púrpuras 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 (NAD^+ ou $NADP^+$). Como consequência desta transferência, a molécula que havia captado a energia luminosa ficava com deficiência de um elétron, ou seja, ficava oxidada; para o processo prosseguir, era necessária a existência, no meio ambiente, de compostos redutores capazes de repor o elétron: H_2S, H_2 etc. (Figura 15.2). A sobrevivência dessas bactérias estava, então, restrita aos locais onde havia disponibilidade desses redutores.

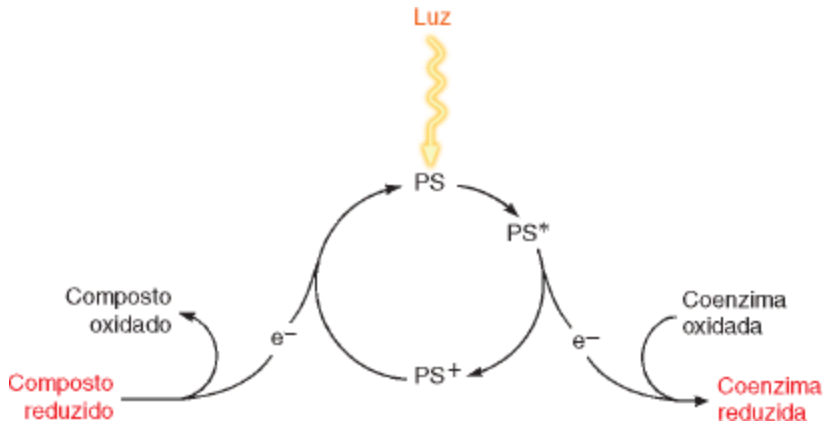


Figura 15.2 Funcionamento de um fotossistema simples (PS) que, por absorção de luz, torna-se excitado (PS*) e emite elétrons (e^-), recebidos por uma coenzima; o fotossistema oxidado (PS^+) recupera sua forma original recebendo elétrons de um composto redutor presente no meio.

Foram as cianobactérias os primeiros organismos a se libertarem do uso de redutores específicos, ao desenvolverem um aparelho fotossintético

capaz de utilizar um redutor abundante: a *água*. Como redutor, a água origina quatro prótons e quatro elétrons, liberando oxigênio molecular; os elétrons e prótons são usados na redução de $NADP^+$. A equação geral do processo pode ser desmembrada em duas etapas:

$$2\,H_2O \longrightarrow 4\,(H^+ + e^-) + O_2$$

$$2\,NADP^+ + 4\,(H^+ + e^-) \longrightarrow 2\,NADPH + 2\,H^+$$

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ \xrightarrow{\text{luz}} 2\,NADPH + 2\,H^+ + O_2$$

A fotossíntese provocou modificações profundas na composição da atmosfera terrestre primitiva. O ambiente, antes desprovido de oxigênio, era fortemente redutor. Gradativamente foi tornando-se oxidante, criando condições propícias para o metabolismo aeróbio e, portanto, para o desenvolvimento dos animais.

Segue-se a análise da fotossíntese em plantas, precedida por uma breve descrição de estruturas celulares e compostos relacionados com o processo fotossintético; posteriormente, é descrita a fotossíntese bacteriana.

15.2 Absorção de luz: fotossistemas

A fotossíntese ocorre em organelas especiais

Nas algas e plantas superiores, a fotossíntese processa-se em organelas especializadas, os *cloroplastos* (Figura 15.3), presentes nas células em número que varia de 1 a 1.000. Estas organelas são compostas de duas membranas: uma externa, bastante permeável, e uma interna, com permeabilidade seletiva. O conteúdo do cloroplasto é chamado *estroma*. Imersa no estroma encontra-se a *membrana tilacoide*, que delimita um compartimento denominado *tilacoide*, cujo lúmen fica isolado do estroma. A membrana tilacoide apresenta múltiplos dobramentos, que se empilham formando os *grana*, e também segmentos não dobrados. Nela estão contidos os pigmentos fotossintéticos, associados a proteínas integradas, e as enzimas necessárias para a utilização da luz e a síntese de ATP e NADPH. No estroma, encontram-se as enzimas que catalisam a redução de CO_2 a carboidrato.

Os pigmentos fotossintéticos efetuam a absorção da energia luminosa e podem ser de três tipos principais: clorofilas, carotenoides e ficobilinas.

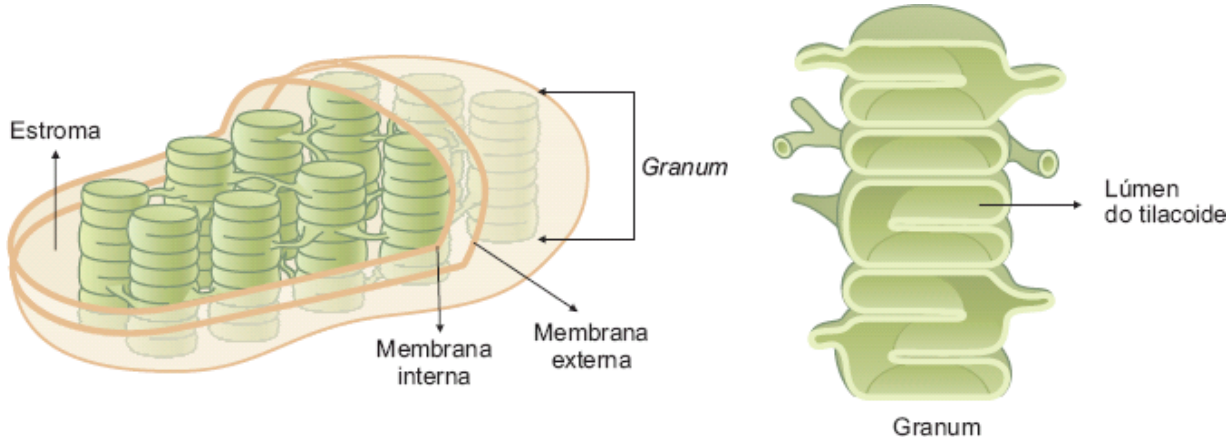


Figura 15.3 Estrutura simplificada de um cloroplasto.

As *clorofilas* (Figura 15.4) são as moléculas fotorreceptoras mais importantes. São compostos derivados da protoporfirina IX (Seção 3.2), como o grupo heme. Nas clorofilas, os átomos de nitrogênio dos quatro núcleos pirrólicos 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; a longa cadeia hidrofóbica do álcool *fitol* (C_{20}) está esterificada à carboxila do substituinte do anel IV. Nos cloroplastos das células de vegetais superiores, há dois tipos principais de clorofila, *a* e *b*, que diferem pelo substituinte do anel II: metila na *clorofila a* e formila na *clorofila b*. As bacterioclorofilas (tipos *a* e *b*) distinguem-se das clorofilas das plantas quanto ao substituinte do anel I e à redução do anel II.

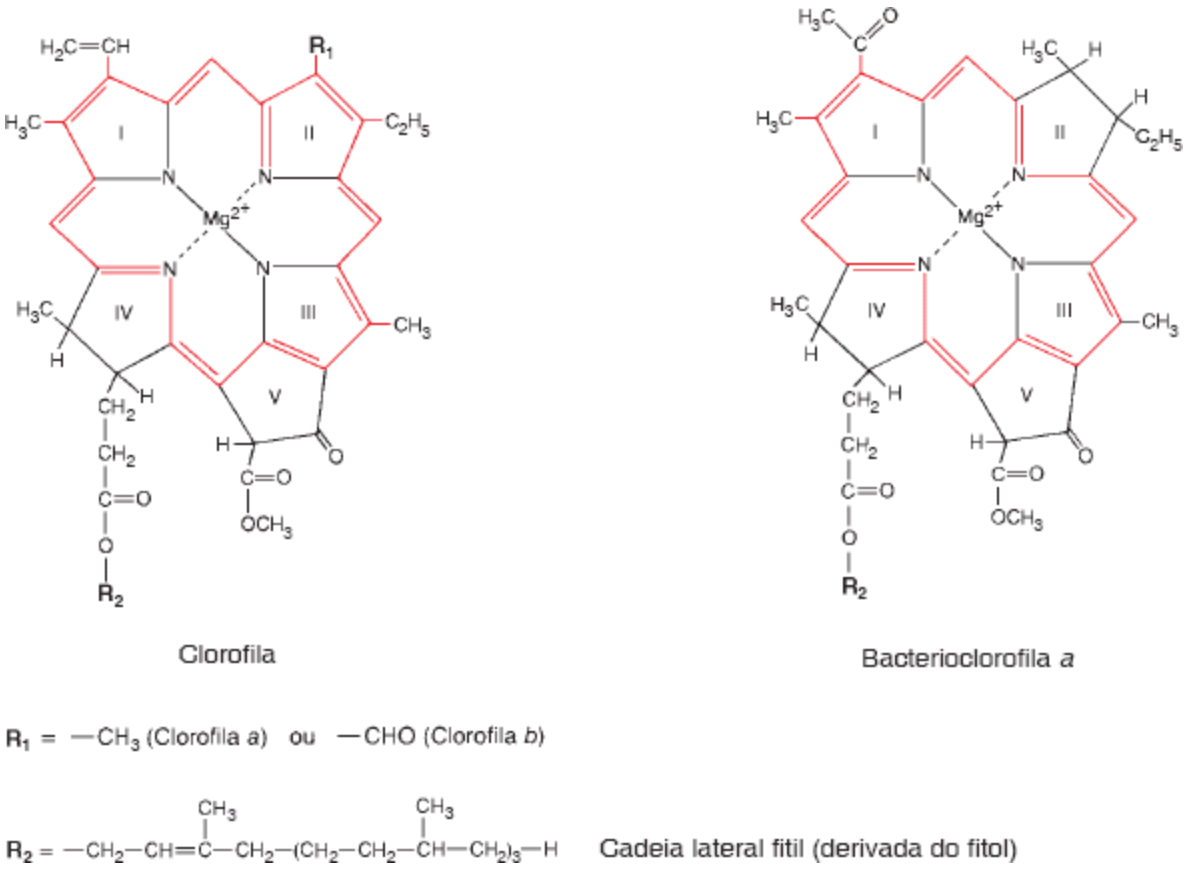


Figura 15.4 Estruturas da clorofila *a* e *b* e da bacterioclorofila *a*. Os sistemas de ligações conjugadas (ligações simples e duplas alternadas), responsáveis pela absorção de luz, estão assinalados em vermelho.

Dentre os *carotenoides*, pigmentos alaranjados, estão os *carotenos*, dos quais o mais importante é o β-*caroteno* (Figura 15.5), e as *xantofilas*, que são carotenos oxigenados. O β-caroteno é precursor da vitamina A nos mamíferos.

As algas apresentam ainda pigmentos chamados *ficobilinas*, que são cadeias lineares formadas por núcleos tetrapirrólicos.

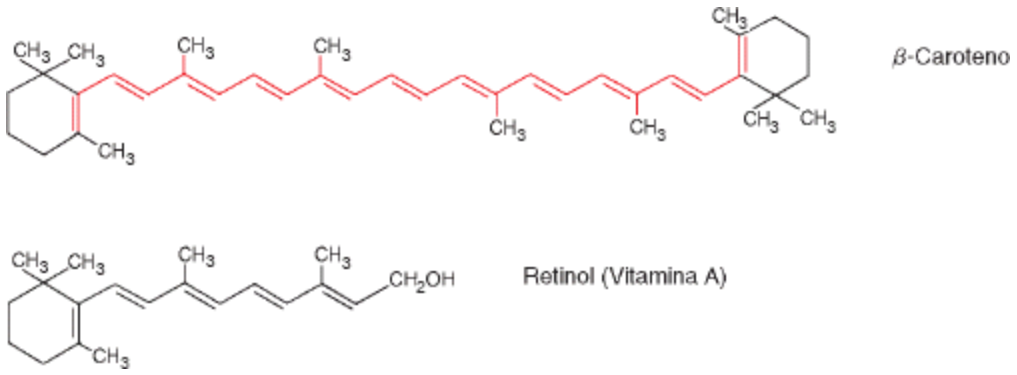


Figura 15.5 Estrutura do b-caroteno que, como as clorofilas e outros pigmentos fotossintéticos, apresenta alternância de ligações simples e duplas, mostradas em vermelho. Nos mamíferos, é precursor da vitamina A.

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 um fóton, o *quantum*, depende do comprimento de onda da radiação luminosa e é expressa pela equação de Planck:

$$E = h\nu$$

onde h é a constante de Planck ($6{,}62 \times 10^{-34}$ J · s) e ν, a frequência da radiação (ciclos/s). A frequência é a razão entre a velocidade da luz c ($3{,}00 \times 10^{8}$ m/s) e o comprimento de onda λ (m). Resulta:

$$E = hc/\lambda$$

A equação mostra que, quanto menor o comprimento de onda, maior a energia dos fótons. Radiações ultravioleta, com pequeno comprimento de onda ($\lambda < 400$ nm) e alta frequência, têm energia suficiente para romper 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 ($\lambda > 750$ nm) e baixa frequência, têm energia apenas para estimular as vibrações moleculares, ou seja, produzir calor. A radiação utilizada pela fotossíntese,

na maioria dos organismos, 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. Moléculas contendo ligações conjugadas, com ligações simples e duplas alternadas (Figuras 15.4 e 15.5), como as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas, são capazes de absorver luz visível. Ao absorver 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) por transferência da energia de excitação para outra molécula ou (4) emitindo um elétron, captado por uma molécula vizinha, que sofre fotoxidação. 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 embebidos na membrana tilacoide, chamados *fotossistemas*, que são as unidades funcionais das reações da fotossíntese que dependem de luz. Cada fotossistema pode conter centenas de moléculas de clorofila, carotenoides e ficobilinas, todas capazes de absorver energia luminosa, sendo, por isto, chamadas de *moléculas antena*. Os carotenoides e as ficobilinas apresentam absorção em regiões do espectro luminoso em que as clorofilas absorvem pouco, fazendo expandir a faixa do espectro luminoso efetivamente utilizado para a fotossíntese. Os pigmentos fotorreceptores ficam "pendurados" nas subunidades proteicas constituintes dos fotossistemas, assumindo uma disposição espacial que torna muito eficiente a propagação da energia absorvida. A energia luminosa coletada pelos pigmentos antena é transmitida, de molécula a molécula (a forma número 3 de dissipação de energia, mencionada anteriormente), até atingir o *centro de reação* (Figura 15.6). 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 subunidades do fotossistema. O que torna estas moléculas especiais é o fato de sofrerem

fotoxidação, emitindo elétrons (a forma número 4 de dissipação de energia), que são transferidos 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 tipo de proteína à qual está associada e pelo microambiente onde se situa no interior da proteína.

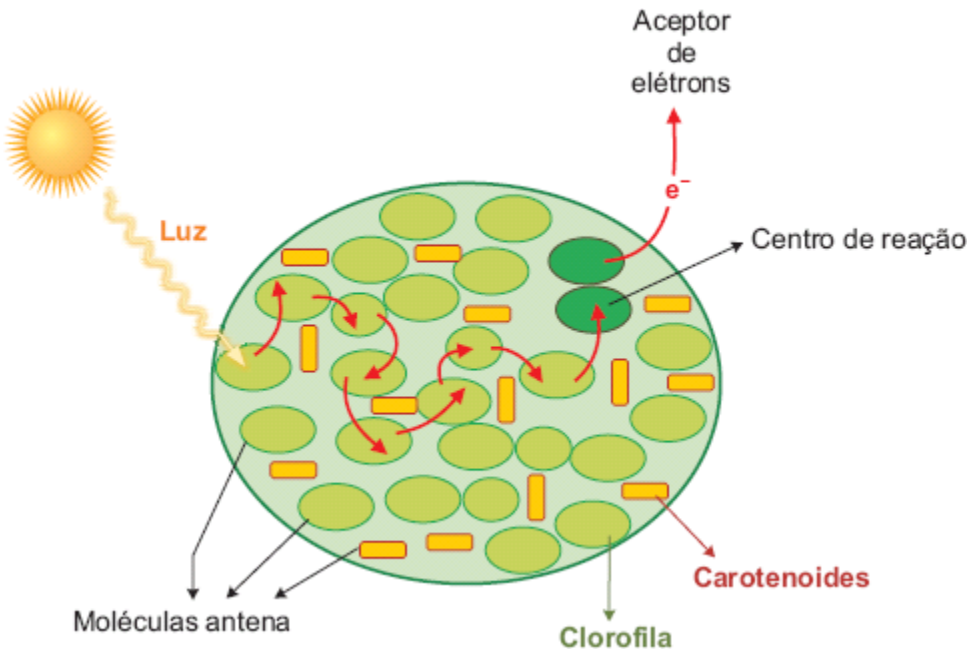


Figura 15.6 Esquema de um fotossistema, evidenciando clorofilas e carotenoides como moléculas antena e o centro de reação, onde se situam as moléculas de clorofila capazes de sofrerem fotoxidação, o par especial.

Estão presentes na membrana tilacoide dois tipos de fotossistemas (*PS* de ***p**hotos**y**stem*): fotossistema I (*PSI*) e fotossistema II (*PSII*). Ambos são complexos proteicos transmembranares contendo, cada um, 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 do par de moléculas de clorofila que o constitui: o de PSI é designado *P700* — *P* de ***P**igmento* 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.

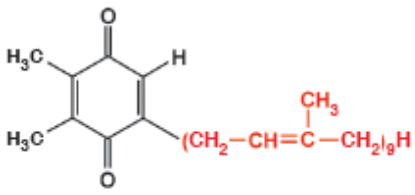
15.3 Fotossíntese em vegetais: fase clara

A fase clara da fotossíntese produz ATP, NADPH e O_2

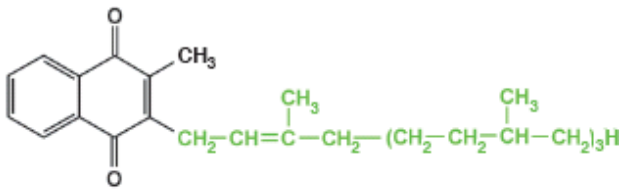
É costume dividir a fotossíntese em duas fases: a *fase clara*, em que a luz é utilizada para síntese de ATP e NADPH na membrana tilacoide, e a *fase escura*, em que ATP e NADPH produzidos na fase clara são utilizados para a fixação de CO_2 no estroma do cloroplasto. Esta denominação para as etapas da fotossíntese é inadequada, porque mecanismos reguladores determinam que a chamada "fase escura" também seja dependente de luz (Seção 15.5).

A fase clara inicia-se com a absorção de fótons por moléculas antena e transferência da excitação para moléculas adjacentes, até atingir um centro de reação. O centro de reação, excitado, emite elétrons que são transportados até o $NADP^+$ — os elétrons são repostos por H_2O, que se oxida, liberando O_2.

O transporte de elétrons da água ao $NADP^+$ é efetuado por compostos organizados em três complexos proteicos que atravessam a membrana tilacoide — *PSI*, *PSII* e citocromo b $_6f$ — e por dois transportadores móveis, a plastoquinona e a plastocianina. A *plastoquinona* (Figura 15.7) se assemelha à ubiquinona (coenzima Q) e a *plastocianina* é uma proteína solúvel, com estrutura parecida à do citocromo *c* mitocondrial. Como os elétrons percorrem transportadores com potenciais de redução crescentes (valores aproximados de $E^{0\prime}$ estão apresentados na Figura 15.8), as transferências são espontâneas. Os transportadores nos cloroplastos são organizados segundo os mesmos princípios básicos observados na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, mas sua identidade é bem menos conhecida.



Plastoquinona A (PQ_A)



Filoquinona (FQ)

Figura 15.7 Estruturas da plastoquinona A e da filoquinona. As plastoquinonas diferem entre si, e também da ubiquinona, apenas quanto ao número de unidades isoprênicas na cadeia lateral (em vermelho). A filoquinona (vitamina K_1) apresenta a mesma cadeia lateral fitil (em verde) das clorofilas.

O complexo PSII absorve luz pelo centro de reação, P680, que passa para uma forma excitada, P680*, com potencial de redução muito menor, e emite elétrons, convertendo-se na forma oxidada, $P680^+$ (Figura 15.8). $P680^+$ é um forte oxidante capaz de oxidar a água — sua regeneração à forma reduzida, P680, é obtida por elétrons provenientes da água. A fotoxidação da água, uma das reações mais endergônicas dos seres vivos, é catalisada por um complexo denominado *OEC* (de ***oxygen-e****volving* ***c****omplex*). Este complexo contém um centro formado por quatro íons de manganês [Mn_4] e interage com um resíduo de tirosina, conhecido como Tyr_Z, de PSII. Por absorção de um fóton, há liberação de um elétron do centro de manganês, que passa da valência 0 para +1. Três absorções subsequentes têm resultado análogo, até ser atingida a carga +4 do grupamento; nesta condição, o centro de manganês torna-se um oxidante capaz de promover a cisão de duas moléculas de água, produzindo H^+ e O_2 e recuperando os elétrons "perdidos":

$$[Mn_4]^{4+} + 2\ H_2O \rightarrow [Mn_4]^0 + 4\ H^+ + O_2$$

Os elétrons resultantes da absorção dos fótons pelo centro de manganês são transferidos, um a um, para $P680^+$, via Tyr_Z, e os prótons são liberados no lúmen do tilacoide, contribuindo para a formação do gradiente que permitirá a síntese de ATP; a formação de oxigênio molecular caracteriza este tipo de fotossíntese como *fotossíntese oxigênica*. Diversas outras cadeias laterais de aminoácidos de PSII participam indiretamente das transferências de elétrons, estabilizando intermediários instáveis e formando um canal de prótons, que devem migrar de OEC até o lúmen do espaço tilacoide.

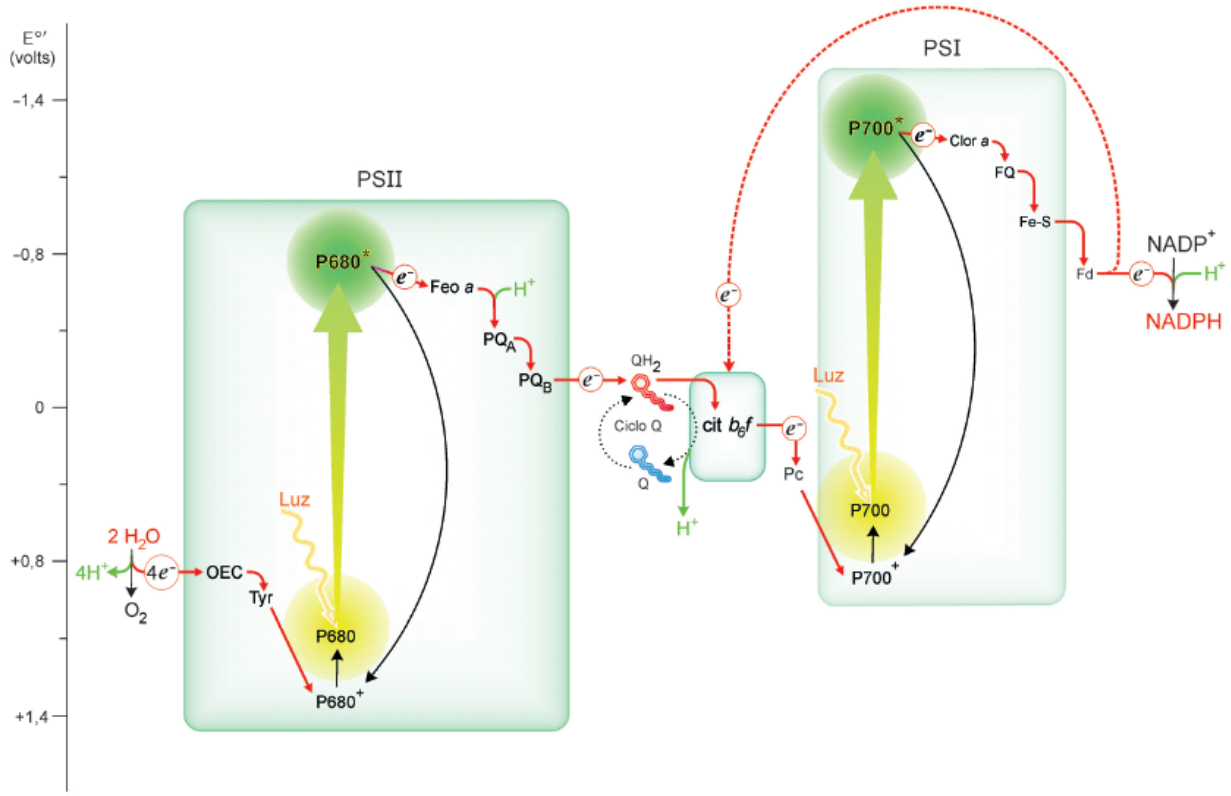


Figura 15.8 Transferências de elétrons que se processam na fotossíntese de plantas. Quando iluminados, os centros de reação de PSII (P680) e de PSI (P700) passam para formas excitadas (P680* e P700*), com potencial de redução padrão ($E^{o\prime}$) muito menor e emitem elétrons, convertendo-se nas formas oxidadas ($P680^+$ e $P700^+$). A reposição de elétrons em PSII é feita por elétrons provenientes da água e, em PSI, por elétrons provenientes de PSII. Na fotofosforilação não cíclica, os elétrons originários da água reduzem o $NADP^+$. Na fotofosforilação cíclica (seta vermelha tracejada), os elétrons emitidos por ferredoxina são transferidos ao citocromo b_6 *f*, retornando a P700, via plastocianina. OEC: *oxygen-evolving complex*; Tyr: resíduo de tirosina Tyr_Z; Feo *a*: feofitina *a*; PQ_A e PQ_B: plastoquinonas A e B; cit b_6 *f*: citocromo b_6f; PC: plastocianina; Clor *a*: clorofila *a*; FQ: filoquinona; Fe-S: centros ferro-enxofre; Fd: ferredoxina.

Os elétrons emitidos por P680* são recebidos por uma cadeia de transportadores de elétrons constituintes de PSII. O primeiro componente desta cadeia (Figuras 15.8 e 15.9) é a feofitina *a* (Feo *a*). As *feofitinas* são moléculas análogas às clorofilas, mas com dois prótons substituindo o íon

magnésio. Os transportadores seguintes são as *plastoquinonas A* e *B* (PQ_A e PQ_B). A redução de uma molécula de plastoquinona (Figura 15.7) a plastoquinol requer 2 ($H^+ + e^-$); como o sítio de PSII onde ocorre essa reação fica em contato com o estroma, é deste compartimento que os prótons são retirados.

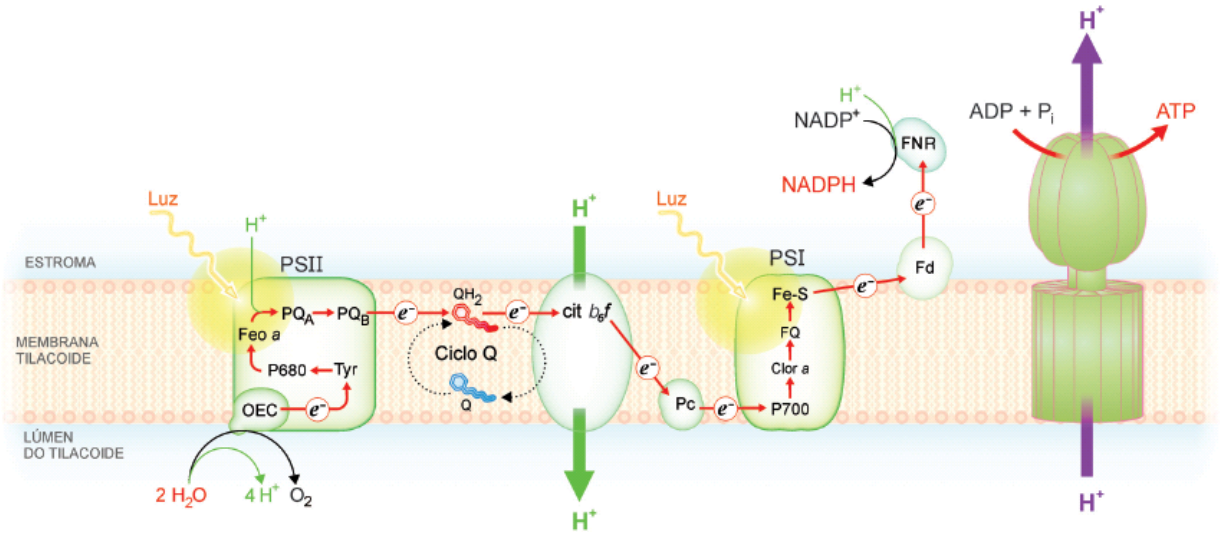


Figura 15.9 Esquema de um segmento da membrana tilacoide, mostrando a disposição dos componentes que participam do transporte de elétrons desde a água até $NADP^+$, acoplado à fotofosforilação. Os complexos proteicos — PSII, PSI e citocromo b_6f — são interligados por transportadores solúveis: plastocianina e ferredoxina. Ao longo das transferências de elétrons (setas vermelhas), prótons são retirados do estroma, liberados no interior da vesícula tilacoide e bombeados para este compartimento (setas verdes) pelo citocromo b_6 *f* e ciclo Q, a principal etapa responsável pela formação do gradiente de prótons. Os prótons retornam para o estroma através da ATP sintase (seta roxa), que catalisa a síntese de ATP a partir de ADP e P_i. FNR: ferredoxina-$NADP^+$ oxirredutase. O significado das demais siglas está indicado na legenda da Figura 15.8.

A transferência de elétrons das moléculas de plastoquinol, acompanhada de movimentação de prótons, é catalisada pelo citocromo b_6f. Este complexo contém um citocromo do tipo *b* (citocromo b_6), um centro Fe-S e

um citocromo do tipo *c*, o citocromo *f*, assemelhando-se ao citocromo bc_1 mitocondrial; como este, promove o acoplamento do transporte de elétrons à translocação de prótons por meio do *ciclo Q* (Seção 11.2). O resultado é a oxidação das moléculas de plastoquinol (QH_2) a plastoquinona (Q): os prótons são bombeados para o interior do espaço tilacoide e os elétrons são doados à *plastocianina* (*Pc*). Da plastocianina, são entregues ao complexo PSI, também sob iluminação.

O complexo PSI absorve luz por meio de P700, que se converte em uma forma excitada, P700*, com potencial de redução muito baixo; ao emitir elétrons, origina a forma oxidada, $P700^+$ (Figura 15.8). O déficit de elétrons de $P700^+$ é reposto à custa de P680, via plastocianina. A partir de P700*, os elétrons percorrem uma cadeia de transporte de elétrons, constituída por uma clorofila do tipo *a* (*Clor a*), uma *filoquinona* (*FQ*) (Figura 15.7) e três centros ferro-enxofre (*Fe-S*). Os elétrons deixam PSI e reduzem a *ferredoxina* (*Fd*), uma proteína ferro-enxofre presente no estroma; por ação da *ferredoxina-NADP$^+$ oxirredutase* (*FNR*) são transferidos para o $NADP^+$, o aceptor final de elétrons, que reage com prótons do estroma, originando NADPH.

Resumindo, a resposta de PSII ao estímulo luminoso é a geração de um potente oxidante, $P680^+$, capaz de clivar a água em elétrons, prótons e O_2; os elétrons, originários da água, são emitidos por P680 e chegam a P700. A resposta de PSI ao mesmo estímulo é gerar um potente redutor, P700*, capaz de doar os elétrons a $NADP^+$, levando à formação de NADPH. O transporte de elétrons é acoplado ao deslocamento de prótons, cujo número é incerto, do estroma para o interior do tilacoide. A equação de oxidação-redução da fase clara da fotossíntese é:

$$2\,H_2O + 2\,NADP^+ + nH^+\ (\text{estroma}) \xrightarrow{\text{luz}} 2\,NADPH + 2\,H^+ + O_2 + nH^+\ (\text{tilacoide})$$

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 também é explicado pela hipótese quimiosmótica.

A conexão entre a água e o $NADP^+$ é efetuada por três complexos proteicos que atravessam a membrana tilacoide, ligados por dois transportadores solúveis. Os complexos são orientados de forma assimétrica com relação ao exterior/interior do tilacoide. O transporte de elétrons, como na mitocôndria, acontece em uma membrana impermeável a prótons e que delimita uma vesícula, fatores essenciais para que se estabeleça o gradiente de prótons. O sentido do transporte dos prótons é, de certo modo, oposto ao da mitocôndria: nos cloroplastos, os prótons são bombeados do estroma para o interior da vesícula tilacoide. Quando os elétrons são transferidos de um composto para outro, sempre com diminuição de energia livre, a energia é conservada como um gradiente de prótons através da membrana tilacoide.

As etapas que contribuem para gerar o gradiente de prótons são: a cisão da molécula de água, que libera prótons no lúmen do tilacoide; a redução das plastoquinonas, que retira H^+ do estroma; o bombeamento de prótons do estroma para o interior do tilacoide pelo citocromo b_6f via ciclo Q (quantitativamente, a etapa mais importante) e a redução de $NADP^+$ pela ferredoxina-$NADP^+$ oxirredutase, que consome H^+ do estroma (Figura 15.9).

Os prótons devem fluir do interior do tilacoide para o estroma e isto só é possível pela ATP sintase (Figura 15.9), que tem estrutura e propriedades semelhantes às da enzima mitocondrial. Todavia, em cloroplastos, tendo em vista a direção do fluxo de prótons, a porção F1 da enzima, que contém o sítio de formação de ATP, fica voltada para o estroma; este processo de síntese de ATP é chamado *fotofosforilação*. Agentes que transferem prótons através de membranas, como o 2,4-dinitrofenol, também desacoplam o transporte de elétrons da síntese de ATP em cloroplastos.

A absorção de um fóton provoca a emissão de um elétron por P680, de modo que 4 fótons são necessários para extrair os 4 elétrons de duas moléculas de água e produzir uma molécula de O_2; 4 fótons adicionais são absorvidos para a emissão de 4 elétrons por PSI. O resultado da absorção de 8 fótons e do transporte de 4 elétrons é a produção de 2 NADPH (a redução de um $NADP^+$consome 2 elétrons) e a liberação no lúmen do tilacoide de 12 H^+. A passagem desses prótons pela ATP sintase gera 3 moléculas de ATP. A equação geral da fotossíntese, incluindo os prótons bombeados, é:

$$2\,H_2O + 8\,\text{fótons} + 2\,NADP^+ + 12\,H^+\,(\text{estroma}) + 3\,ADP + 3Pi \longrightarrow$$
$$O_2 + 2\,NADPH + 12\,H^+\,(\text{tilacoide}) + ATP$$

A estequiometria da fotossíntese, entretanto, é controversa. Resultados experimentais indicam a necessidade de10-11 *quanta* de luz por molécula de O_2 produzida, em vez do valor teórico de 8 *quanta*; mostram também que a estrutura em anel do rotor da ATP sintase de cloroplastos é formada por 14 subunidades, ou seja, sua rotação completa requer a passagem de 14 H^+, para promover a síntese de 3 ATP.

Em resumo, o processo de fotoativação dos dois fotossistemas produz oxigênio, indispensável à sobrevivência dos organismos aeróbios, e a energia luminosa é transformada em energia química, armazenada sob a forma de ATP e de NADPH.

A fotossíntese pode ocorrer sem síntese de NADPH e desprendimento de O_2

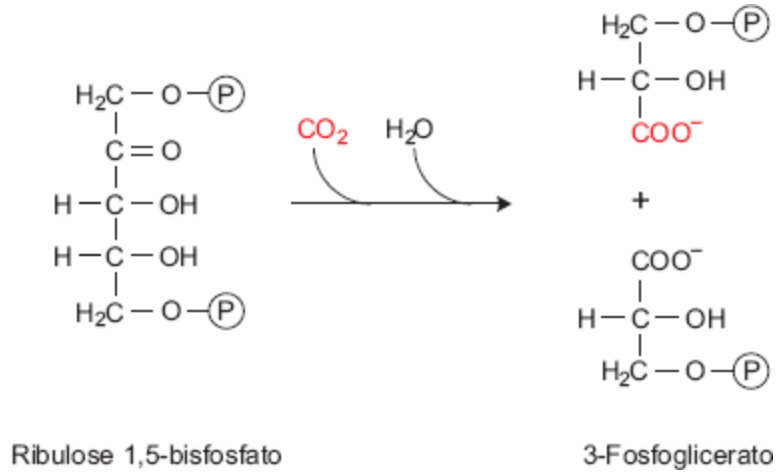
Os elétrons da água só são utilizados para a redução de $NADP^+$ quando os dois fotossistemas funcionam acoplados. PSI pode, entretanto, funcionar de modo independente, de tal maneira que os elétrons por ele emitidos a ele retornam, em um processo cíclico (seta vermelha tracejada na Figura 15.8). Os elétrons de P700*, depois de reduzirem ferredoxina, são transferidos para o citocromo b_6f, com translocação de H^+ para o lúmen do tilacoide; os elétrons, via 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. A síntese de ATP, sustentada pelo bombeamento de prótons através do citocromo b_6f, é chamada *fotofosforilação cíclica*, e este tipo de fotossíntese, *não oxigênica* ou *anoxigênica*.

15.4 Síntese de glicose a partir de CO_2 (a fase “escura” da fotossíntese)

A fixação de CO_2 é feita por carboxilação de ribulose 1,5-bisfosfato

Na fase “escura” da fotossíntese, ATP e NADPH produzidos na fase clara são utilizados para a redução de CO_2 a glicose. O conjunto de reações

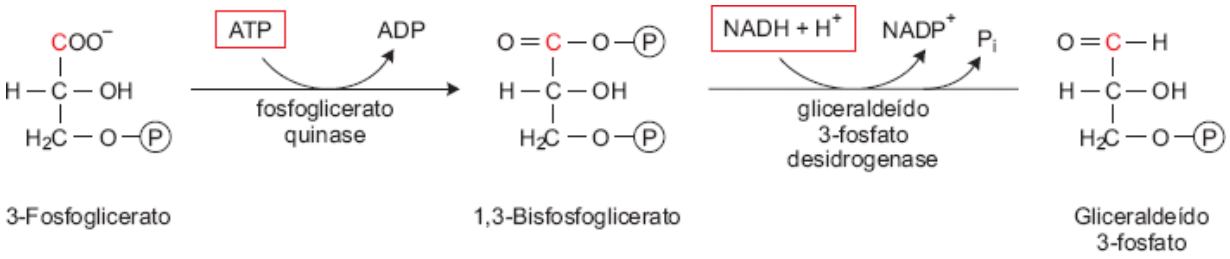
enzimáticas responsáveis por esta síntese ocorre nos cloroplastos e é chamado *ciclo de Calvin*. O ciclo inicia-se com a carboxilação de ribulose 1,5-bisfosfato (C_5) e clivagem em duas moléculas de 3-fosfoglicerato (2 C_3):



A reação é catalisada pela ***rib**ulose 1,5-**bis**fosfato **c**arboxilase/**o**xigenase*, também chamada *rubisco*, ausente de tecidos animais e, certamente, a enzima mais abundante da biosfera. O nome da enzima indica suas duas atividades: a de carboxilase, explicitada pela reação acima, e a de oxigenase, em que o CO_2 é substituído por O_2, e cujo significado está descrito na Seção 15.6.

A etapa fundamental de incorporação de CO_2 em uma molécula orgânica está, portanto, cumprida: a partir de ribulose 1,5-bisfosfato, são produzidas duas moléculas de 3-fosfoglicerato, uma das quais contém o átomo de carbono presente no CO_2. Seguem-se as reações do ciclo de Calvin que convertem 3-fosfoglicerato a glicose 6-fosfato, semelhantes às da gliconeogênese (Seção 14.2).

O 3-fosfoglicerato é fosforilado à custa de ATP, produzindo 1,3-bisfosfoglicerato, que é reduzido a gliceraldeído 3-fosfato. No cloroplasto, estas reações são irreversíveis e a coenzima utilizada pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase é $NADP^+$; na gliconeogênese, são reversíveis e a coenzima é NAD^+.



O gliceraldeído 3-fosfato é isomerizado a di-hidroxiacetona fosfato e os dois compostos condensam-se, formando frutose 1,6-bisfosfato; esta é hidrolisada a frutose 6-fosfato, que sofre isomerização a glicose 6-fosfato.

A conclusão do ciclo de Calvin requer a regeneração de ribulose 1,5-bisfosfato, efetuada por uma sequência de reações da qual participam enzimas da gliconeogênese, da via das pentoses-fosfato e enzimas características de cloroplastos (sedoeptulose 1,7-bisfosfatase e ribulose 5-fosfato quinase). Iniciando o ciclo com 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato e 6 CO_2, é possível verificar a produção líquida de uma molécula de glicose 6-fosfato e a regeneração das 6 moléculas de ribulose 1,5-bisfosfato utilizadas (Figura 15.10). Neste processo 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:

$$6\ CO_2 + 11\ H_2O + 18\ ATP + 12\ NADPH \rightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + 18\ ADP + 17\ P_i + 12\ NADP^+$$

Deve-se notar uma vez mais que, como ATP e NADPH são produzidos por utilização da energia luminosa, é esta a fonte energética primária para a síntese de glicose. Quando, à noite, esta fonte de energia não está disponível, as células e os organismos fotossintéticos 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 Lynen, ciclo de Krebs etc., e fosforilação oxidativa. O mesmo ocorre permanentemente em todas as partes dos vegetais que não fazem fotossíntese.

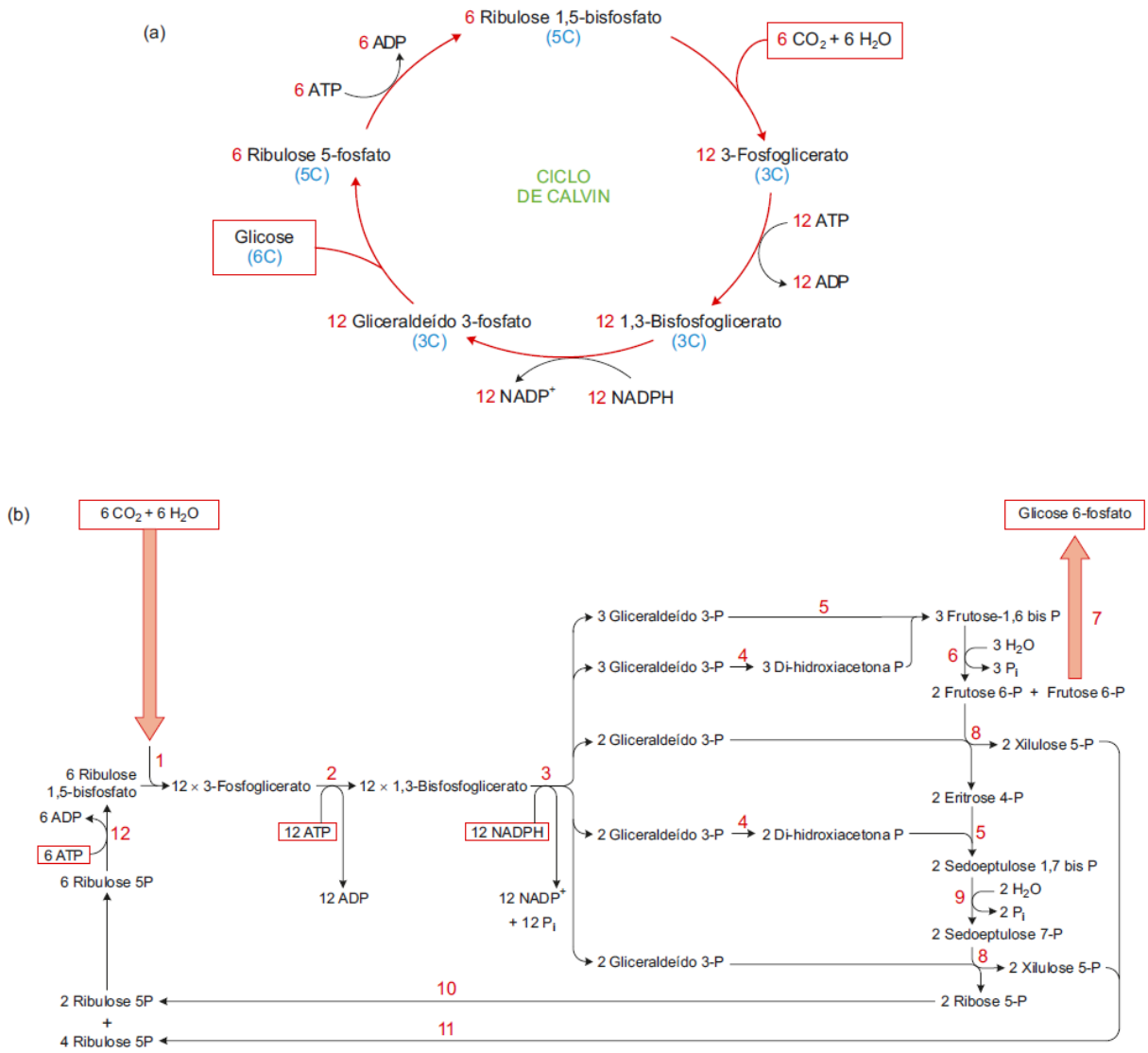


Figura 15.10 a) Esquema geral da síntese de uma molécula de glicose, a partir de 6 moléculas de CO_2 e 6 moléculas de H_2O, pelo ciclo de Calvin. b) Reações componentes do ciclo de Calvin e as enzimas que as catalisam: (1) rubisco, (2) fosfoglicerato quinase, (3) gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, (4) triose fosfato isomerase, (5) aldolase, (6) frutose 1,6-bisfosfatase, (7) fosfoglicoisomerase, (8) transcetolase, (9) sedoeptulose 1,7-bisfosfatase, (10) ribose fosfato isomerase, (11) fosfopentoepimerase e (12) ribulose 5-fosfato quinase.

Nas folhas, parte da glicose 6-fosfato produzida na fotossíntese permanece no cloroplasto como amido e parte origina sacarose no citosol (Seção 13.2, Figura 13.6). A sacarose, a principal forma de transporte de

carbono das folhas para outros tecidos da planta, pode ser utilizada como fonte de energia ou originar os polímeros de glicose característicos de vegetais, amido (Figura 13.7) e celulose.

15.5 Regulação do ciclo de Calvin

Embora seja chamado de *fase escura*, o ciclo de Calvin só ocorre em presença de luz. Esta dependência é consequência da regulação de enzimas, ativadas somente quando há transporte de elétrons induzido por absorção de energia luminosa.

A atividade da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase depende de maneira muito sensível do pH e da concentração de Mg^{2+}, aumentando à medida que estas variáveis aumentam. A rubisco está presente no estroma, e é deste compartimento que os prótons são bombeados para o interior da vesícula tilacoide, durante o transporte de elétrons; concomitantemente, há transferência de íons Mg^{2+} para o estroma. A elevação do pH e da concentração de Mg^{2+}ativa a enzima, resultando em eficiente fixação de CO_2. A regulação da rubisco é ainda mais complexa e continua a ser descrita na próxima seção.

Outro mecanismo, que também opera somente na vigência de luz, estimula o ciclo de Calvin. Três enzimas deste ciclo — frutose 1,6-bisfosfatase, sedoeptulose 1,7-bisfosfatase e ribulose 5-fosfato quinase — são funcionais apenas quando têm grupos SH preservados, inativando-se quando estes grupos são oxidados, fazendo ligações dissulfeto (R-S-S-R). A redução das pontes dissulfeto é obtida a partir dos elétrons emitidos por PSI sob iluminação e ocorre em etapas: os elétrons são doados à ferredoxina e, em seguida, a uma proteína denominada *tiorredoxina* (Figura 15.11). O resultado é a redução das pontes dissulfeto de *tiorredoxina* por ferredoxina reduzida, uma reação catalisada pela *ferredoxina-tiorredoxina redutase*; a tiorredoxina pode, então, reduzir as ligações dissulfeto das enzimas, convertendo-as em suas formas ativas. O encadeamento dessas reações de redução, alimentadas por elétrons resultantes da fotoativação de PSI, mantém os grupos SH das enzimas citadas na forma reduzida, ativando o ciclo de Calvin, que, portanto, é inapropriadamente chamado de fase *escura*.

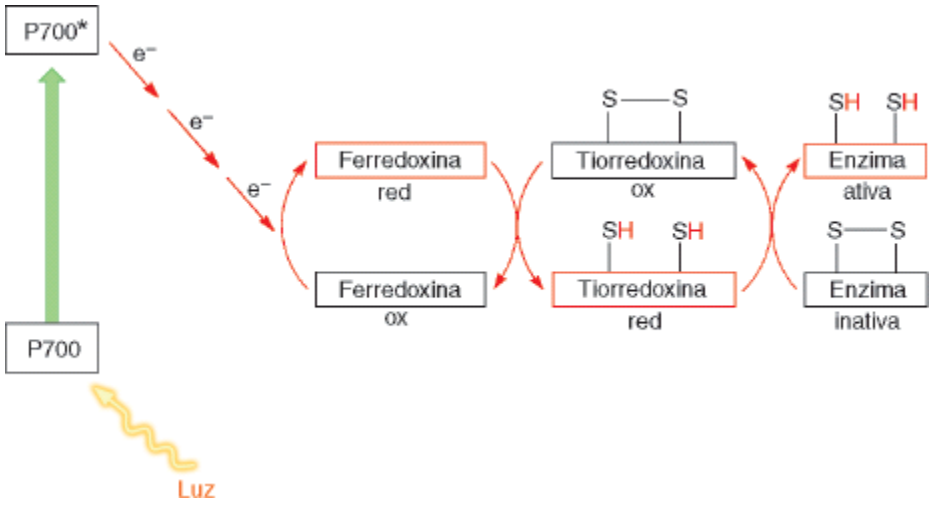
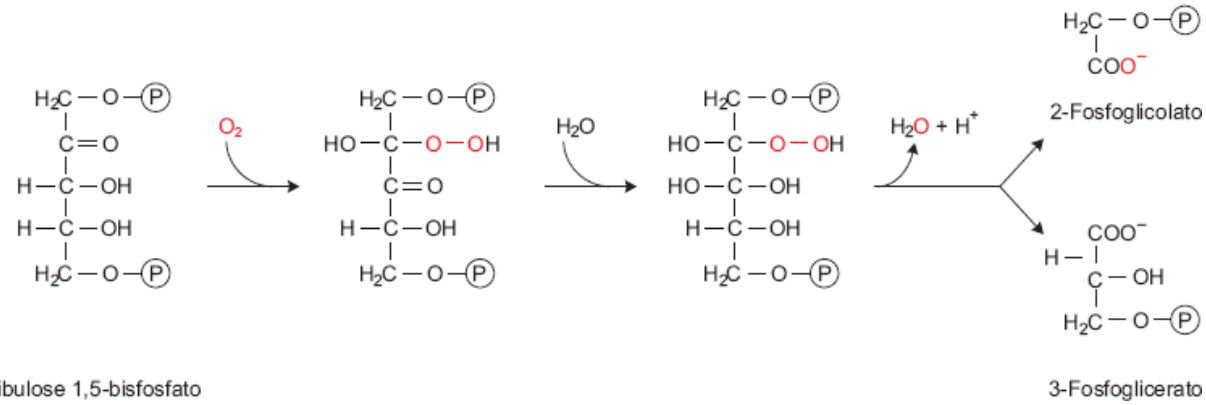


Figura 15.11 Reações que levam à redução de pontes dissulfeto de enzimas do ciclo de Calvin, à custa de elétrons originados de PSI fotoativado.

15.6 Fotorrespiração e plantas C_4

A fotorrespiração contrapõe-se à fotossíntese

O predomínio de uma das atividades da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase depende das concentrações relativas de CO_2 e O_2, já que estas moléculas competem como segundos substratos (o primeiro substrato é, naturalmente, a ribulose 1,5-bisfosfato). Quando o O_2 é usado como substrato, em condições de alta concentração de O_2 e baixa de CO_2, as reações que ocorrem são as seguintes:



A atividade de oxigenase da rubisco promove a oxidação da ribulose 1,5-bisfosfato e a sua cisão em 3-fosfoglicerato e 2-fosfoglicolato. O 2-fosfoglicolato passa por uma complexa série de reações, processadas em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos foliares, que envolvem consumo adicional de O_2 e produção de CO_2, razão pela qual a via é denominada *fotorrespiração*. O resultado desta via, além de um carbono ser "perdido" como CO_2, é o gasto inútil de ATP e NADPH produzidos pela fotossíntese.

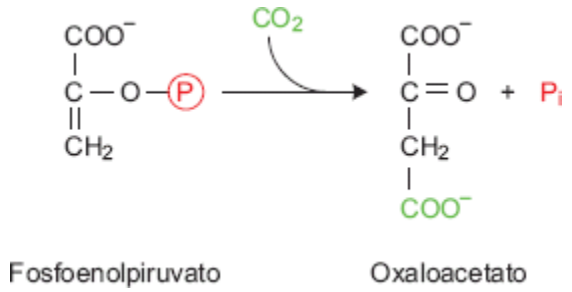
O significado biológico da fotorrespiração é muito pouco claro. Para a maioria dos vegetais, nas concentrações habituais de CO_2 atmosférico, a fotossíntese predomina sobre a fotorrespiração. Entretanto, quando a luminosidade é alta e a temperatura, elevada, a intensa fotossíntese faz diminuir a concentração 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/oxigenase. Ainda mais, a atividade de oxigenase da enzima aumenta mais com a temperatura do que a atividade de carboxilase, fazendo com que as intensidades de fotorrespiração e de fotossíntese se aproximem. Este resultado é um fator limitante para o crescimento de muitas plantas de interesse agrícola. 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

A fixação de CO_2 pela reação catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase, que inicia o ciclo de Calvin, ocorre nas chamadas *plantas* C_3, porque o primeiro produto da incorporação é o 3-fosfoglicerato, um composto de *três* carbonos. Plantas cultivadas de clima temperado, o trigo, por exemplo, são geralmente do tipo C_3. Algumas plantas tropicais, como cana-de-açúcar e milho, apresentam uma modificação do esquema de fixação: o ciclo de Calvin é precedido pela incorporação de CO_2 em um composto de *quatro* carbonos, o oxaloacetato — são, por isto, chamadas plantas C_4. Esta é uma forma de manter altas as concentrações de CO_2 nos cloroplastos destas plantas, evitando a fotorrespiração. As plantas C_3

representam mais de 90% da biomassa vegetal mundial; as plantas C_4 são particularmente numerosas na família das Gramíneas.

A ocorrência da via de assimilação de CO_2 em compostos de 4 carbonos está associada a um tipo especial de anatomia das folhas. Nas plantas C_4, as *células do mesófilo* localizam-se próximas à superfície da folha, ficando em contato com o ar atmosférico; são desprovidas de rubisco e contêm a *fosfoenolpiruvato carboxilase*, que tem afinidade por CO_2 muito maior do que a rubisco e origina o oxaloacetato (C_4). Esta enzima, ausente de tecidos animais, catalisa a reação:



As células do mesófilo envolvem completamente as *células da bainha*, que se situam no interior da folha, circundando o tecido vascular, 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 às células da bainha, as únicas capazes de incorporá-lo em glicose.

O oxaloacetato é reduzido a malato por uma malato desidrogenase dependente de NADPH e o malato é transferido para as células da bainha (Figura 15.12). Nestas células, o malato é descarboxilado pela enzima málica, produzindo CO_2, NADPH e piruvato. O CO_2 é, então, utilizado na reação catalisada pela rubisco, seguindo-se as demais reações do ciclo de Calvin. O piruvato é transportado para as células do mesófilo, onde regenera fosfoenolpiruvato, por ação da *piruvato fosfato diquinase*:

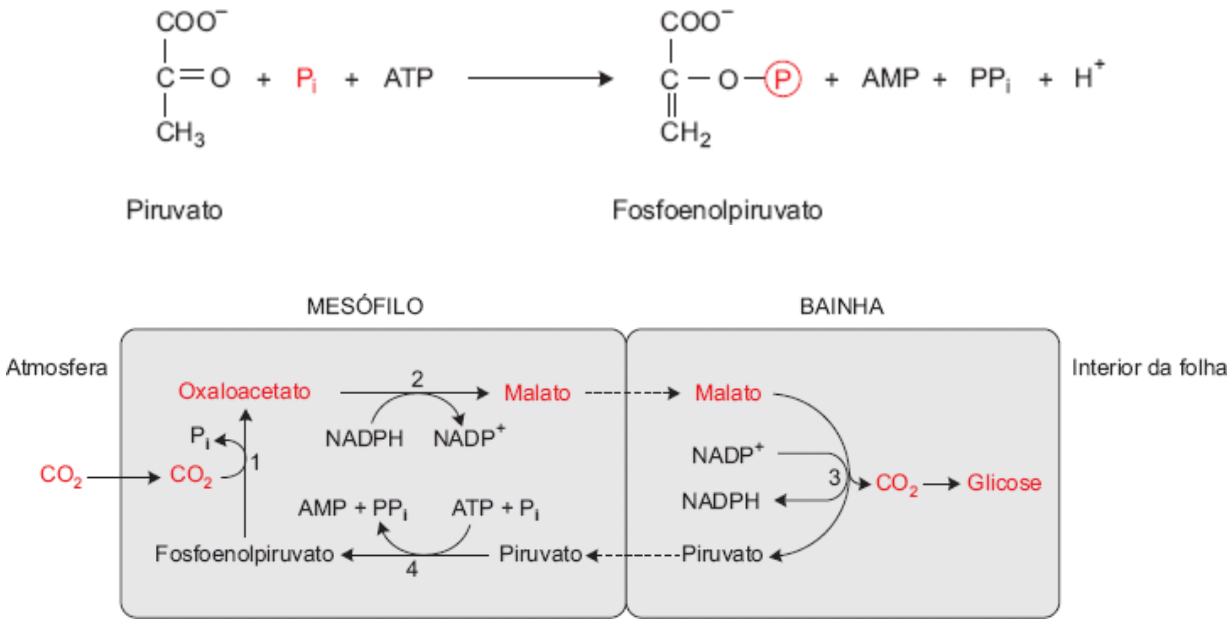


Figura 15.12 Fixação de CO_2 pelas plantas C_4. As enzimas que catalisam as reações são: (1) fosfoenolpiruvato carboxilase, (2) malato desidrogenase dependente de NADPH, (3) enzima málica e (4) piruvato-fosfato diquinase.

O pirofosfato é hidrolisado pela pirofosfatase, resultando em um consumo de 2 ATP por CO_2 transportado para as células da bainha. Desta maneira, a conversão de 6 moléculas de CO_2 em glicose nas plantas C_4 consome 12 ATP a mais do que nas plantas C_3.

Para as plantas tropicais, este processo 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. O conjunto de adaptações metabólicas e anatômicas das plantas C_4 propicia intensa fixação de CO_2 em glicose nas células da bainha. A glicose é armazenada como amido: os cloroplastos destas células são muito ricos em grãos de amido.

15.7 Fotossíntese 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 membrana plasmática ou em estruturas resultantes de invaginações da membrana.

A fotossíntese bacteriana 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 redução; parte de energia liberada gera um gradiente de prótons, que é utilizado para sintetizar ATP. Outros aspectos do processo podem diferir bastante entre cianobactérias, bactérias verdes e bactérias púrpuras.

A fotossíntese das cianobactérias (*Oscillatoria*, *Anabaena* etc.) assemelha-se à das plantas superiores e algas em múltiplos aspectos. A redução de $NADP^+$ a NADPH é um evento mediado pela luz, ou seja, a fotossíntese produz coenzimas reduzidas — os elétrons para reduzi-las são obtidos por fotólise da água, resultando na produção de O_2. A fotossíntese é do tipo oxigênico, empregando dois fotossistemas, cujos centros de reação são constituídos por clorofila *a*.

Nas bactérias verdes (*Chlorobium*, *Chloroflexus* etc.) e nas bactérias púrpuras (*Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* etc.), a fotossíntese é não oxigênica, porque não há fotólise da água — os doadores de elétrons utilizados são H_2S, H_2 ou compostos orgânicos presentes no meio. Há somente um fotossistema e os pigmentos fotorreceptores são bacterioclorofilas e carotenoides. As bacterioclorofilas exibem diferenças estruturais discretas em relação às clorofilas (Figura 15.4), mas que resultam em deslocamento da absorção máxima para comprimentos de onda mais longos (até 1.040 nm), o que viabiliza habitarem nichos ecológicos com baixa iluminação. A fotossíntese não oxigênica pode (caso das bactérias verdes) ou não (bactérias púrpuras) envolver a redução de coenzimas.

A fotossíntese não oxigênica é mais bem 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 fotossistema é um complexo proteico que atravessa a membrana plasmática, ao qual se associam quatro moléculas de bacterioclorofila, duas moléculas de bacteriofeofitina (Bfeo), um íon de ferro e duas quinonas Q_A (menaquinona ou vitamina K_2) e Q_B (ubiquinona). Em algumas espécies, o fotossistema contém também um citocromo do tipo *c* com quatro grupos heme. Duas das quatro moléculas de bacterioclorofila formam o par especial, responsável pela dissipação da energia luminosa absorvida por 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 (Figura 15.13). Segue-se a oxidação das quinonas pelo citocromo bc_1 (análogo ao citocromo b_6f de cloroplastos e ao Complexo III mitocondrial), acoplada ao bombeamento 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 recomeçar o transporte cíclico de elétrons. Forma-se um gradiente de prótons através da membrana plasmática e, na volta desses prótons do espaço periplasmático para o citosol pela ATP sintase, produz-se ATP. O processo é uma fotofosforilação cíclica e, como na fotofosforilação cíclica dos vegetais, não há fotólise da água, nem produção de coenzimas reduzidas.

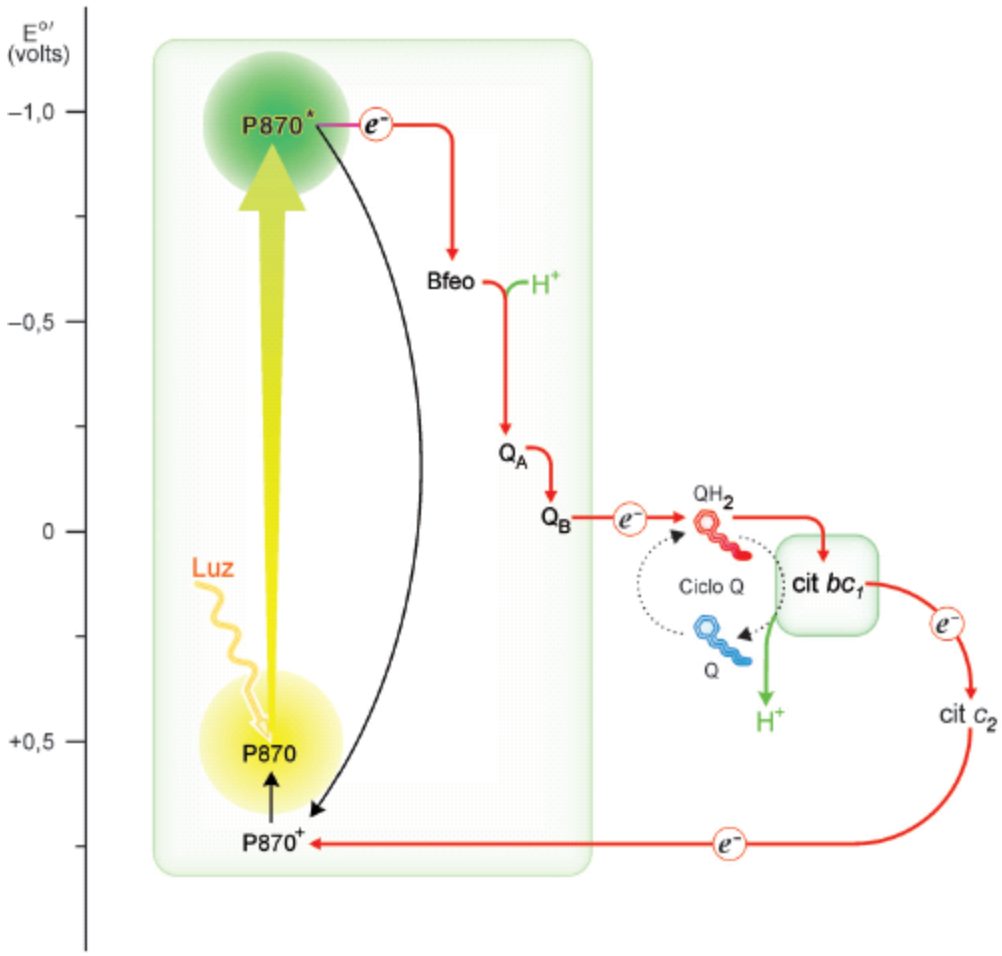


Figura 15.13 Fluxo cíclico de elétrons durante a fotossíntese não oxigênica de bactérias púrpuras. O significado das siglas encontra-se no texto referente à figura.

As bactérias verdes usam a energia da luz para transferir elétrons para $NADP^+$. Estas bactérias têm um único fotossistema que absorve luz, passa para uma forma excitada e emite elétrons. Os elétrons são transferidos para ferredoxina, e depois para ferredoxina:$NADP^+$ redutase, que converte $NADP^+$ a NADPH.

Na fotossíntese das bactérias verdes e púrpuras, os elétrons são repostos por redutores do meio (H_2S, H_2, NO_2^-, alcoóis, ácidos). A dependência da disponibilidade de tais compostos limita a sobrevivência destas bactérias a nichos ecológicos restritos, como lagoas de águas turvas, onde H_2S é gerado por decomposição de matéria orgânica.

A fixação de CO_2 nas bactérias fotossintéticas pode ser obtida pelo ciclo de Calvin ou por vias metabólicas específicas, que não serão analisadas neste texto.

Bibliografia

Joliot P, Joliot A: Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** (15): 10209-10214, 2002.

Meyer TJ: The art of splitting water. *Nature* **451**: 778-779, 2008.

Porter JR, Wollenweber B: The Rubisco enzyme and agricultural productivity. *Nature* **463** (7283): 876, 2010.

Sanderson K: The photon trap. *Nature* **452** (7186): 400-402, 2008.

Schlichting I: Structural biology: Photosynthetic complex in close-up. *Nature* **517**: 26-27, 2015.

Zhao Q *et al*.: C4 photosynthetic machinery: insights from maize chloroplast proteomics. *Front Plant Sci* **4** (85): 1-16, 2013.

OceanofPDF.com

16 Metabolismo de Lipídios

Os lipídios da dieta humana, absorvidos no intestino, e aqueles sintetizados endogenamente são distribuídos aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas, para utilização ou armazenamento. Os triacilgliceróis (triglicerídios ou triglicérides) são os lipídios dietéticos mais abundantes 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. Por serem insolúveis em água, podem ser acumulados sob forma anidra em grandes quantidades, sem causar efeitos osmóticos adversos. Como são compostos mais reduzidos que os carboidratos, sua oxidação apresenta rendimento maior: 9 kcal/g, enquanto a oxidação de carboidratos produz 4 kcal/g.

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, a reserva de carboidratos equivalente a 15 kg de triacilgliceróis deveria ser 37,5 kg. Considere-se que os carboidratos fazem ligações de hidrogênio com a água: 1 g de glicogênio adsorve 3 g de água e 37,5 kg de glicogênio adsorveriam 112,5 kg de água. Portanto, uma reserva constituída por glicogênio, com a mesma quantidade de energia contida em 15 kg de triacilgliceróis, corresponderia a cerca de 150 kg. Ou seja, o indivíduo, em vez de 70 kg, pesaria 220 kg!

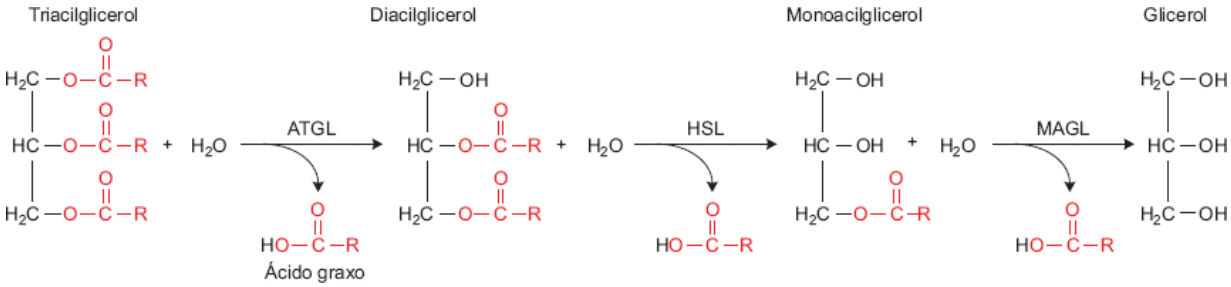
Nos vertebrados, o armazenamento das reservas lipídicas é feito especialmente no tecido adiposo branco (assim denominado em

contraposição ao tecido adiposo marrom, tratado na Seção 11.5). Os triacilgliceróis são acumulados no citosol do adipócito branco como uma única grande gota, que pode ocupar mais de 95% do volume celular. A porção restante da célula, embora pequena, desempenha funções essenciais — o tecido adiposo branco, que por muito tempo foi considerado apenas como uma reserva de energia, é hoje reconhecido como um órgão endócrino ativo. Ele sintetiza uma série de hormônios peptídicos (*adipocinas*), que incluem leptina, adiponectina, resistina etc. A secreção destes peptídios é alterada sempre que a massa do tecido adiposo branco (a ser referido como *tecido adiposo*) sofre variações, seja por aumento ou redução. O tecido adiposo está claramente envolvido na etiopatogenia, tanto da obesidade quanto da caquexia, além do diabetes e das doenças cardiovasculares.

A utilização do depósito de triacilgliceróis pelo organismo e a sua reconstrução processam-se por vias metabólicas diferentes, localizadas em compartimentos celulares diferentes e, obviamente, submetidas a regulações antagônicas (Seção 20.7).

16.1 Degradação de triacilgliceróis

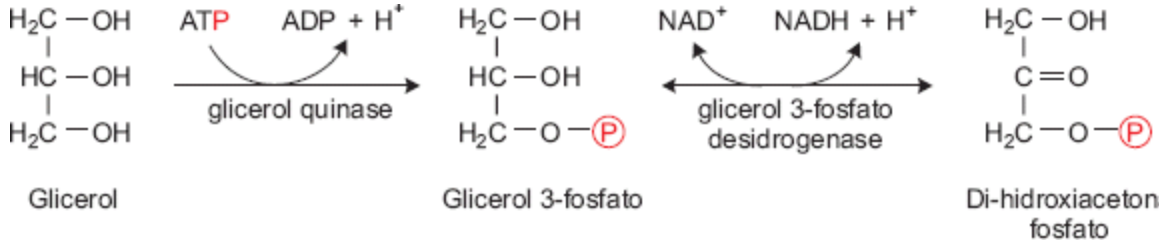
Durante mais de quatro décadas, conhecia-se uma única enzima capaz de promover a mobilização do depósito de triacilgliceróis do tecido adiposo de mamíferos, a *lipase hormônio-sensível*. A partir de 2004, ficou evidenciado que a hidrólise completa do triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol (lipólise) resulta da ação de três enzimas principais. Primeiramente, a *lipase de triacilgliceróis do adiposo* (*ATGL*, de *Adipose Triglyceride Lipase*) catalisa a hidrólise do triacilglicerol em ácido graxo e diacilglicerol; em seguida, a *lipase hormônio-sensível* (*HSL*) remove outro ácido graxo do diacilglicerol, que se converte em monoacilglicerol; finalmente, a *monoacilglicerol lipase* (*MAGL*) atua, formando glicerol e ácido graxo. O esquema a seguir mostra a hidrólise genérica de um triacilglicerol.



A lipólise nos adipócitos depende da interação das enzimas com a gota de triacilgliceróis. A gota é delimitada por uma monocamada de fosfolipídios e colesterol, à superfície da qual se associam numerosas proteínas, da família das *perilipinas*. Elas medeiam a fixação das lipases na periferia da gota e o acesso a seus substratos, além de regularem a sua atividade (Seção 20.7). A gota de triacilgliceróis constitui uma organela dinâmica, cuja estrutura sofre alterações frente a situações fisiológicas diferentes. A lipólise é ativada durante períodos de aumento da demanda de energia por ação hormonal.

Os produtos da hidrólise de triacilgliceróis são oxidados por processos distintos.

O *glicerol* é pouco reaproveitado pelos adipócitos, que têm baixos níveis de *glicerol quinase*, sendo então liberado na circulação. Em outros tecidos, como fígado e rins, por ação desta quinase, é convertido a *glicerol 3-fosfato*, que pode ser transformado em di-hidroxiacetona fosfato, um intermediário da glicólise ou da gliconeogênese.



Os *ácidos graxos* liberados dos adipócitos são transportados pelo sangue ligados à albumina e utilizados como fonte de energia pelos tecidos, incluindo fígado e músculos; o tecido nervoso e as hemácias são exceções, porque obtêm energia exclusivamente a partir da degradação de glicose (o sistema nervoso, no jejum prolongado, passa a utilizar corpos cetônicos — Seção 21.3).

Os triacilgliceróis da dieta, transportados pelos quilomícrons e VLDL (Seção 6.2.7), 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 das lipases dos adipócitos, são glicerol e ácidos graxos, que se tornam, assim, disponíveis para as células. Os remanescentes dos quilomícrons, empobrecidos de triacilgliceróis e proporcionalmente enriquecidos de colesterol, são retirados da circulação pelo fígado, por endocitose (Seção 7.4.2).

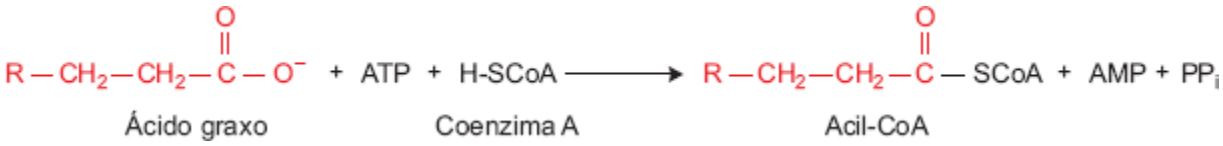
Os ácidos graxos, mobilizados do tecido adiposo ou provenientes da dieta, são oxidados por uma via que se processa no interior das mitocôndrias.

16.2 Degradação de ácidos graxos: ativação, transporte e oxidação

16.2.1 Ácidos graxos saturados

Os ácidos graxos são ativados e transportados para a matriz mitocondrial, onde são oxidados

Para ser oxidado, o ácido graxo é primeiramente convertido em uma forma ativada, uma *acil-CoA*. Esta etapa prévia é catalisada pela *acil-CoA sintetase*, associada à face citosólica da 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 (H-SCoA), produzindo uma acil-CoA. As acil-CoAs, como a acetil-CoA, são compostos ricos em energia. Sua ligação tioéster é formada à custa da energia derivada de uma ligação anidrido fosfórico, por clivagem do ATP em adenosina monofosfato (AMP) e pirofosfato ($HP_2O_7^{3-}$ ou PP_i). O pirofosfato é hidrolisado a dois fosfatos

inorgânicos (2 HPO_4^{2-} ou 2 P_i) em uma reação irreversível, o que torna o processo de ativação do ácido graxo a acil-CoA igualmente irreversível.

A membrana interna da mitocôndria é impermeável a acil-CoA, mas os grupos acila podem ser introduzidos na mitocôndria, quando ligados à *carnitina*. Este composto, sintetizado a partir de aminoácidos, é amplamente distribuído nos tecidos animais e vegetais, sendo especialmente abundante em músculos. A ligação reversível do grupo acila à carnitina é catalisada pela *carnitina-acil transferase* (Figura 16.1 a). Existem duas isoformas da enzima, denominadas *I* e *II*, que se localizam na membrana externa e no interior da mitocôndria, respectivamente. O sistema utilizado para o transporte de grupos acila consta de quatro etapas (Figura 16.1 b): (1) na membrana externa, a carnitina-acil transferase I transfere o grupo acila da coenzima A para a carnitina; (2) a acil-carnitina resultante é transportada através da membrana interna pela acil-carnitina/carnitina translocase; (3) na matriz mitocondrial, a carnitina-acil transferase II doa o grupo acila da acil-carnitina para a coenzima A, liberando carnitina; (4) a carnitina retorna ao citosol pela mesma translocase. Deste modo, o grupo acila dos ácidos graxos atinge o interior da mitocôndria, onde ocorre a sua oxidação.

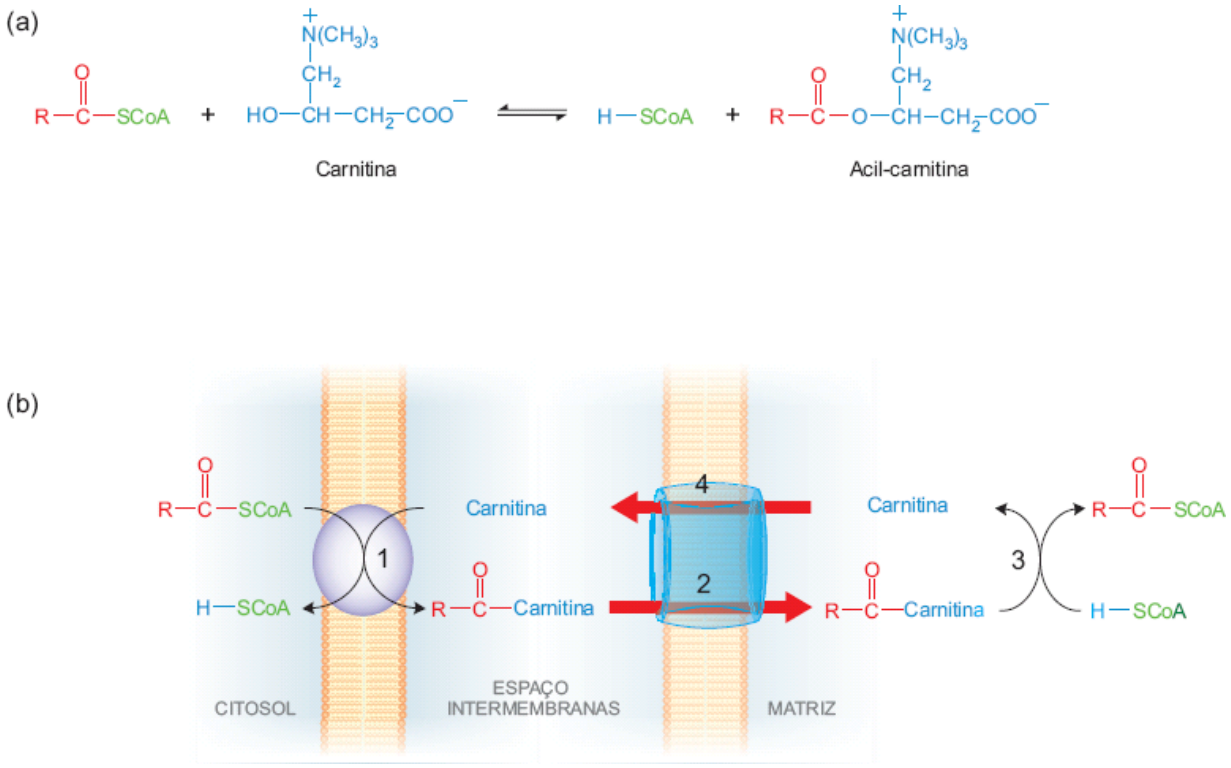


Figura 16.1 Transporte de grupos acila para a mitocôndria. a) Reação catalisada pela carnitina-acil transferase. b) Sistema de transporte de grupos acila — os números referem-se às etapas descritas no texto.

Na β-oxidação, a acil-CoA é oxidada a acetil-CoA, produzindo $FADH_2$ e NADH

A acil-CoA presente na matriz mitocondrial é oxidada por uma via denominada β-*oxidação*, porque promove a oxidação do carbono β do ácido graxo, ou *ciclo de Lynen* (Figura 16.2). Esta via consta de uma série cíclica de quatro reações, ao final das quais a acil-CoA é encurtada de dois carbonos, que são liberados sob a forma de acetil-CoA, com produção de $FADH_2$ e NADH. As quatro reações e as enzimas que as catalisam são:

1. Oxidação da acil-CoA a uma enoil-CoA (acil-CoA β-insaturada) de configuração *trans*, à custa da conversão de FAD a $FADH_2$, a única reação irreversível da via — *acil-CoA desidrogenase*
2. Hidratação da dupla ligação *trans*, produzindo o isômero L de uma β-hidroxiacil-CoA — *enoil-CoA hidratase*

3. Oxidação do grupo hidroxila a carbonila, resultando uma β-cetoacil-CoA e NADH — β-*hidroxiacil-CoA desidrogenase*
4. Cisão da β-cetoacil-CoA por reação com uma molécula de coenzima A (H-SCoA), com formação de acetil-CoA e de uma acil-CoA com dois carbonos a menos; esta acil-CoA refaz o ciclo várias vezes, até ser totalmente convertida a acetil-CoA — *tiolase*.

As enzimas da β-oxidação podem ocorrer como enzimas individualizadas ou como *enzimas multifuncionais*. O termo *enzima multifuncional* é aplicado para designar enzimas que apresentam várias atividades catalíticas, cada qual associada a um domínio específico de uma única cadeia polipeptídica.

A atividade da β-oxidação em diferentes condições fisiológicas é discutida na Seção 20.7.

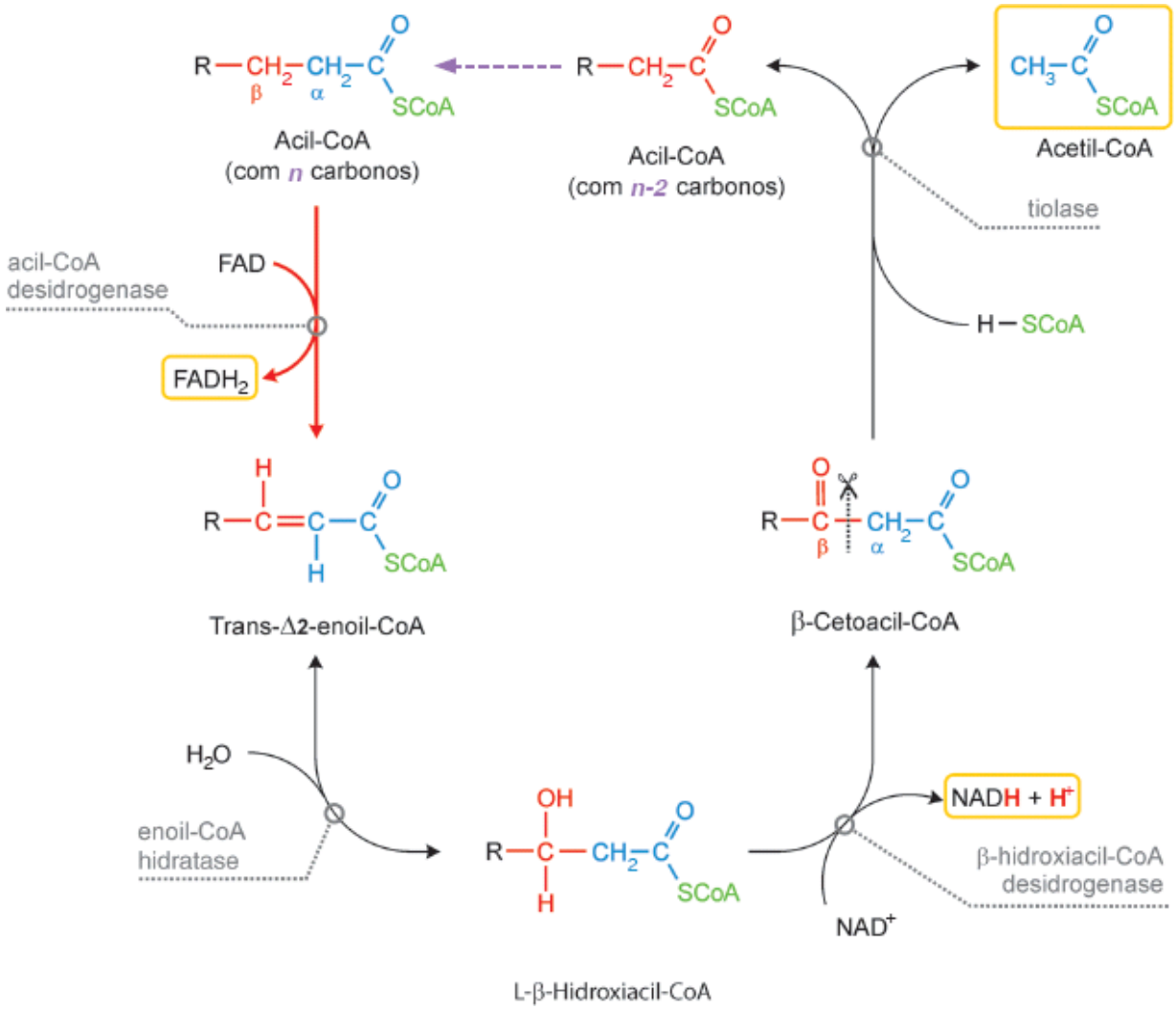


Figura 16.2 Via da β-oxidação ou ciclo de Lynen: a acil-CoA formada no final de cada volta tem dois carbonos a menos e reinicia o ciclo (seta pontilhada). A única reação irreversível é aquela catalisada pela acil-CoA desidrogenase (setas vermelhas). Os produtos finais da via — acetil-CoA, $FADH_2$ e NADH — estão incluídos em retângulos amarelos.

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 grupo acetila 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 formam-se *duas* moléculas de acetil-CoA. O resultado final são 8 moléculas de acetil-CoA. A oxidação de cada acetil-CoA no ciclo de Krebs origina 3 NADH, 1 $FADH_2$ e 1 ATP (ou GTP). Pela fosforilação oxidativa, NADH e $FADH_2$ formam, respectivamente, 3 e 2 ATP. A produção de ATP resultante da oxidação completa do ácido palmítico está discriminada na Tabela 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 + 2 P_i e, portanto, consumo de duas ligações ricas em energia, o que equivale a um gasto de 2 ATP (conversão de 2 ATP a 2 ADP). O rendimento final da oxidação do ácido palmítico é, então, 129 ATP.

Como a síntese de ATP na fosforilação oxidativa é acompanhada da formação de água, a oxidação de ácidos graxos também gera uma quantidade considerável de água. Esta produção de água assume importância fundamental durante a hibernação (Seção 11.2).

Tabela 16.1 Produção de ATP na oxidação de ácido palmítico.

Produtos da β-oxidação	Produtos da oxidação de 8 acetil-CoA no ciclo de Krebs	Total (β-oxidação + Krebs)	Mols de 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[1]			131

[1]O rendimento energético da oxidação do ácido palmítico é igual a 129 ATP, porque, dos 131 produzidos, devem ser descontados 2 ATP consumidos na ativação do ácido graxo.

A oxidação de ácidos graxos ocorre também nos peroxissomos

Peroxissomos são organelas citoplasmáticas, envoltas por uma membrana única, presentes em praticamente todas as células eucarióticas. Estas organelas apresentam características peculiares: sofrem proliferação e alteração do seu conteúdo enzimático segundo as necessidades celulares. Os peroxissomos encarregam-se de diversos processos metabólicos, que incluem, invariavelmente, a degradação de ácidos graxos; outras funções variam com o organismo ou o tipo de célula considerado.

Nos mamíferos, a oxidação de ácidos graxos ocorre nas mitocôndrias, peroxissomos e retículo endoplasmático. As mitocôndrias são responsáveis pela β-oxidação de ácidos graxos de cadeia linear curta, média e longa, que são convertidos a CO_2 e H_2O.

A β-oxidação peroxissômica promove o encurtamento de ácidos graxos de cadeia linear muito longa (com mais de 20 carbonos), de ácidos graxos ramificados (α-oxidação, Seção 16.2.2), de ácidos graxos dicarboxílicos e da cadeia lateral de intermediários da síntese de ácidos biliares. Os ácidos graxos encurtados são transferidos para as mitocôndrias para oxidação completa; os sais biliares sintetizados nos peroxissomos dos hepatócitos são exportados e incorporados à bile.

Os ácidos graxos de cadeia muito longa são transportados para o interior dos peroxissomos, onde são convertidos nas respectivas acil-CoA. A primeira etapa de oxidação, como aquela mitocondrial, é a transformação das acil-CoAs muito longas nas respectivas trans-Δ2-enoil-CoA, com redução de FAD, catalisada por uma flavoproteína. No caso da flavoproteína mitocondrial, a acil-CoA desidrogenase, os elétrons do $FADH_2$ são entregues à cadeia de transporte de elétrons, gerando ATP; na reação promovida pela enzima peroxissômica, a *acil-CoA oxidase*, os elétrons do $FADH_2$ são transferidos diretamente ao oxigênio, que é reduzido a água oxigenada (Figura 16.3). A água oxigenada é decomposta em H_2O e ½ O_2 por ação da catalase presente nos peroxissomos.

A trans-Δ2-enoil-CoA é oxidada pelas mesmas três etapas da β-oxidação mitocondrial, catalisadas, todavia, por apenas duas enzimas: uma enzima multifuncional, que exibe as atividades de enoil-CoA hidratase e β-hidroxiacil-CoA desidrogenase, e uma tiolase.

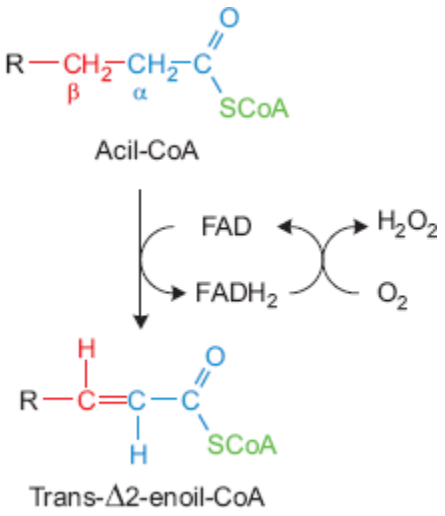


Figura 16.3 β-Oxidação peroxissômica — oxidação de uma acil-CoA muito longa (R com 20 ou mais carbonos), catalisada pela acil-CoA oxidase.

Doenças graves são causadas por defeitos genéticos relacionados com a oxidação peroxissômica de ácidos graxos. A de maior incidência (1:15.000) é a *adrenoleucodistrofia ligada ao cromossomo X*, que se manifesta geralmente na infância e tem consequências fatais. Resulta da deficiência da permease que transfere os ácidos graxos de cadeia muito longa através da membrana dos peroxissomos. A consequência é o acúmulo desses ácidos graxos no cérebro, no córtex adrenal e testículos, além de seu aumento moderado na maioria dos tecidos e no plasma. A moléstia afeta, principalmente, o sistema nervoso central, havendo uma destruição progressiva da bainha de mielina das fibras nervosas componentes da substância branca do cérebro, que origina a denominação adreno*leuco*distrofia (*leuko*, em grego, significa branco); outras disfunções são insuficiência adrenocortical e hipogonadismo. Durante a década de 1980, foi testada uma terapia para a doença, baseada na atuação dos ácidos graxos oleico e erúcico como inibidores competitivos do alongamento de

ácidos graxos. A conduta consistia na administração oral de uma mistura de trioleilglicerol e trierucilglicerol na proporção 4:1. Esta mistura foi denominada *Óleo de Lorenzo* em homenagem a Lorenzo Odone, o primeiro paciente tratado com a mistura (tema do filme "O Óleo de Lorenzo"). Realmente, o tratamento reduzia os níveis plasmáticos dos ácidos graxos de cadeia muito longa, mas não melhorava os sintomas neurológicos e endócrinos, nem impedia a progressão da doença. Além disso, a mistura de triacilgliceróis provocava efeitos adversos. Depois de mais de 20 anos de controvérsias, conclui-se que o tratamento com o óleo de Lorenzo não apresenta nenhuma eficácia clínica.

Outra moléstia, a *síndrome de Zellweger* é devida a mutações em diversos genes relacionados com a biogênese dos peroxissomos, com perda de múltiplas funções; caracteriza-se por disfunções graves do sistema nervoso, fígado e rins, principalmente, que levam à morte no primeiro ano de vida. As alterações metabólicas comuns às doenças hereditárias peroxissômicas são os níveis aumentados de ácidos graxos muito longos, de precursores dos ácidos biliares e de ácidos graxos ramificados, no sangue e nos tecidos. O mecanismo que relaciona estas alterações à instalação das moléstias não é conhecido até o presente.

Nos vegetais, a β-oxidação de ácidos graxos é feita nos peroxissomos e glioxissomos (um tipo especializado de peroxissomos, característico de sementes oleaginosas). Os peroxissomos de tecidos foliares de certos tipos de plantas participam, ainda, da fotorrespiração (Seção 15.6). A acetil-CoA produzida nos glioxissomos pode ser convertida em glicose graças à presença, nestas organelas, das enzimas do *ciclo do glioxilato* (Seção 10.3). Estas enzimas são ausentes de células animais, que, por isto, são incapazes de utilizar acetil-CoA como composto gliconeogênico.

No retículo endoplasmático de mamíferos, encontra-se uma via de oxidação de ácidos graxos de importância menor, a ω-*oxidação*. A via inicia-se com a hidroxilação do carbono ω, o terminal metila dos ácidos graxos (Seção 6.2.1). A reação é catalisada por enzimas pertencentes à família do citocromo P_{450} e requer a participação de O_2 e NADPH. Seguem-se etapas de oxidação do ácido graxo ω-hidroxilado, originando um ácido graxo dicarboxílico, que é substrato da β-oxidação peroxissômica.

Enzimas da família do citocromo P_{450} participam também de reações de hidroxilação na síntese de eicosanoides, de sais biliares, oxiesteroides, hormônios esteroides e vitamina D. Têm atividade fundamental no metabolismo de drogas, o etanol inclusive, e de fármacos, que, uma vez hidroxilados, tornam-se mais solúveis em água, facilitando a sua excreção na urina.

16.2.2 Ácidos graxos insaturados, com número ímpar de átomos de carbono, ramificados e hidroxilados

A oxidação de ácidos graxos insaturados requer enzimas adicionais às da β-oxidação

O esquema da β-oxidação mitocondrial apresentado na Figura 16.2, consistindo em uma sequência cíclica de quatro reações, efetua a oxidação de acil-CoAs com cadeias de carbonos lineares e saturadas, mas não a de cadeias modificadas. Este é o caso da presença de duplas ligações em ácidos graxos poli-insaturados, que são muito comuns nos triacilgliceróis e em outros lipídios de tecidos animais e vegetais. As duplas ligações são separadas por grupos metileno, resultando em sua localização tanto em posições de número par como ímpar. Além disto, apresentam quase sempre a configuração *cis* (Seção 6.2.1), que não é reconhecida pela enoil-CoA hidratase do ciclo de Lynen. Assim sendo, a β-oxidação de ácidos graxos insaturados requer a participação de enzimas adicionais.

Após a remoção de algumas unidades de dois carbonos (como acetil-CoA) pela β-oxidação, o ácido graxo insaturado pode originar dois tipos de enoil-CoA, conforme a posição original da dupla ligação em sua molécula (Figura 16.4): se a dupla ligação for de número ímpar, como a Δ5 no exemplo da figura (ou a Δ9 do ácido oleico), forma-se uma cis-Δ3-enoil-CoA; se for de número par, como a Δ6 na figura (ou a Δ12 do ácido linoleico), resulta uma cis-Δ4-enoil-CoA[1]. Para a oxidação dessas acil-CoAs insaturadas, são necessárias enzimas que as convertam em trans-Δ2-enoil-CoA, o intermediário insaturado da β-oxidação, substrato da enoil-CoA hidratase.

No caso em que é obtida cis-Δ3-enoil-CoA (Figura 16.4 a), a *Δ3-Δ2-enoil-CoA isomerase* possibilita a sua transformação em trans-Δ2-enoil-CoA.

O segundo tipo de enoil-CoA que pode ser produzida, cis-Δ4-enoil-CoA (Figura 16.4 b), é reconhecida pela acil-CoA desidrogenase do ciclo de Lynen, que a converte, porém, em uma *trans-Δ2-cis-Δ4-dienoil-CoA*, que não é aceita pela enoil-CoA hidratase. Para o prosseguimento de sua oxidação, é necessária a participação da *2,4-dienoil-CoA redutase*, que reduz a ligação cis-Δ4 à custa de NADPH, originando *trans- Δ3-enoil-CoA*. Na sequência, a Δ3-Δ2-enoil-CoA isomerase transforma a dupla ligação trans-Δ3 em trans-Δ2 — a enzima converte tanto cis-Δ3 quanto trans-Δ3-enoil-CoA em trans-Δ2-enoil-CoA —, chegando-se, portanto, ao intermediário insaturado da β-oxidação.

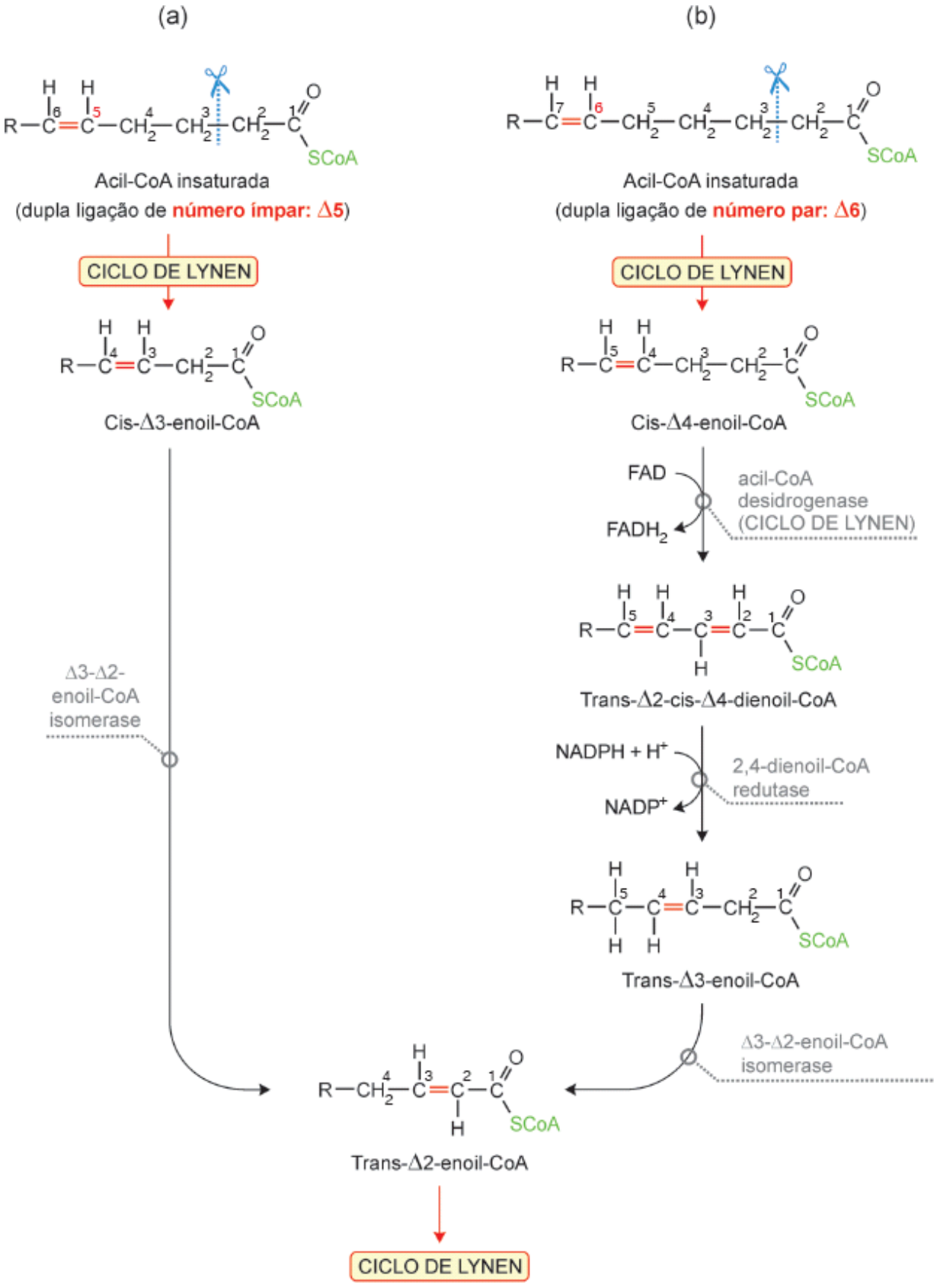

(a)
(b)
Acil-CoA insaturada
(dupla ligação de número ímpar: Δ5)
Acil-CoA insaturada
(dupla ligação de número par: Δ6)
CICLO DE LYNEN
CICLO DE LYNEN
Cis-Δ3-enoil-CoA
Cis-Δ4-enoil-CoA
FAD
FADH2
acil-CoA desidrogenase (CICLO DE LYNEN)
Trans-Δ2-cis-Δ4-dienoil-CoA
NADPH + H+
NADP+
2,4-dienoil-CoA redutase
Trans-Δ3-enoil-CoA
Δ3-Δ2-enoil-CoA isomerase
Δ3-Δ2-enoil-CoA isomerase
Trans-Δ2-enoil-CoA
CICLO DE LYNEN

Figura 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 — Δ5 no exemplo considerado — após algumas voltas do ciclo, resulta uma cis-Δ3-enoil-CoA; b) quando tem uma dupla ligação de número par — Δ6 no exemplo — é produzida uma cis-Δ4-enoil-CoA.

A β-oxidação de ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono produz propionil-CoA

Os ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono constituem uma fração minoritária dos ácidos graxos da dieta e são 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, em vez de duas de acetil-CoA. A propionil-CoA origina-se também da degradação de alguns aminoácidos (Seção 17.2.2).

Para sua oxidação, a *propionil-CoA* é convertida a *succinil-CoA*, um intermediário ciclo de Krebs. A conversão (Figura 16.5) inicia-se com carboxilação a D-metilmalonil-CoA, em uma reação que requer *biotina* (vitamina B7). Esta coenzima, com gasto de ATP, liga-se ao CO_2, que é transferido ao substrato, como acontece em outras reações de carboxilação: conversão de piruvato a oxaloacetato (Seção 14.2) e de acetil-CoA a malonil-CoA (Seção 16.5). Em seguida, D-metilmalonil-CoA forma succinil-CoA em duas etapas: transformação do isômero D em L e isomerização da L-metilmalonil-CoA por troca de posição dos substituintes (– CO-SCoA e H) de dois carbonos adjacentes. A última reação é catalisada por uma mutase, que utiliza a coenzima B_{12} (*5′-desoxiadenosil-cobalamina*), um derivado da vitamina B_{12} (cobalamina).

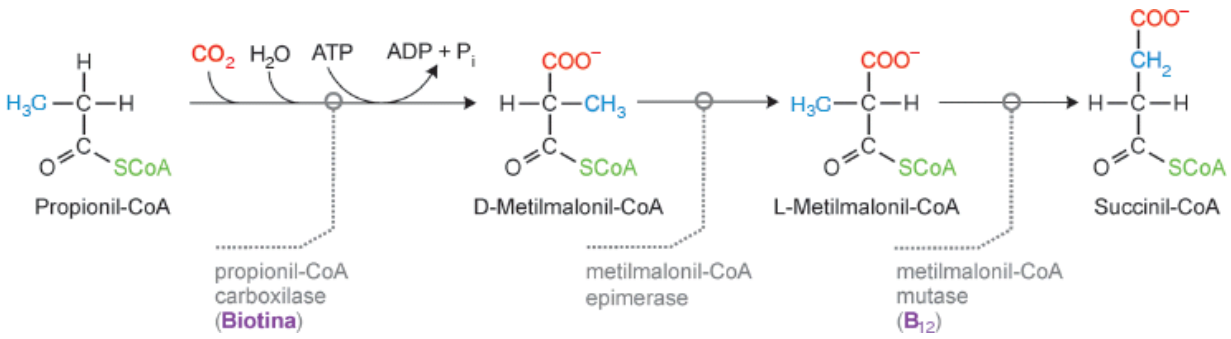


Figura 16.5 Conversão de propionil-CoA, proveniente da oxidação de ácidos graxos de número ímpar de carbonos, a succinil-CoA.

Ácidos graxos ramificados ou hidroxilados são oxidados por α-oxidação

Ácidos graxos contendo ramificações ou hidroxilações são pouco frequentes nos animais superiores. Nestes organismos, os ácidos graxos ramificados ocorrem apenas como componentes da cera produzida pelas glândulas sebáceas, e os hidroxilados, como componentes de esfingolipídios do sistema nervoso. Um ácido graxo ramificado constitui uma exceção: é o *ácido fitânico* (*fitanato*, no pH fisiológico), derivado do *fitol* (Figura 16.6 a), um álcool com 20 carbonos que constitui a cadeia lateral isoprenoide da clorofila (Seção 15.2).

Os animais ruminantes, herbívoros, ingerem grandes quantidades de clorofila, da qual o fitol é eficientemente removido pelas bactérias do trato digestório; uma vez na forma livre, o fitol é oxidado a ácido fitânico, que é absorvido pelos tecidos. Como os ruminantes têm uma capacidade reduzida de degradar ácido fitânico, ele é incorporado aos lipídios do tecido adiposo e do leite. Os seres humanos não dispõem de enzimas capazes de hidrolisar a ligação éster entre a cadeia de fitol e a estrutura em anel da molécula de clorofila: a clorofila ingerida passa praticamente intacta pelo trato digestório humano. Deste modo, o ácido fitânico presente nos tecidos humanos origina-se dos alimentos. As principais fontes dietéticas do composto são as gorduras, o leite e os laticínios provenientes de ruminantes.

O ácido fitânico possui um grupo metila no carbono β (e em outros carbonos de número ímpar), que não é reconhecido pela acil-CoA desidrogenase, que catalisa a primeira reação da β-oxidação. Esta situação é contornada pela α-*oxidação* (Figura 16.6 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. Segue-se uma descarboxilação e uma oxidação, resultando um ácido graxo com um carbono a menos, que tem o grupo metila agora no carbono α e apresenta o carbono β não substituído, podendo ser ativado e oxidado pela β-oxidação peroxissômica.

A deficiência hereditária da enzima que catalisa a hidroxilação do carbono α resulta em acúmulo de fitanato no sangue e nos tecidos, e ocorrência de lesões neurológicas múltiplas na fase adulta — trata-se da *moléstia de Refsum*, que é muito rara, com apenas 150 casos diagnosticados. Defeitos genéticos da biogênese de peroxissomos, como a síndrome de Zellweger, também determinam níveis anormais de fitanato, embora, nestes casos, a α-oxidação defectiva seja apenas uma dentre outras anomalias metabólicas.

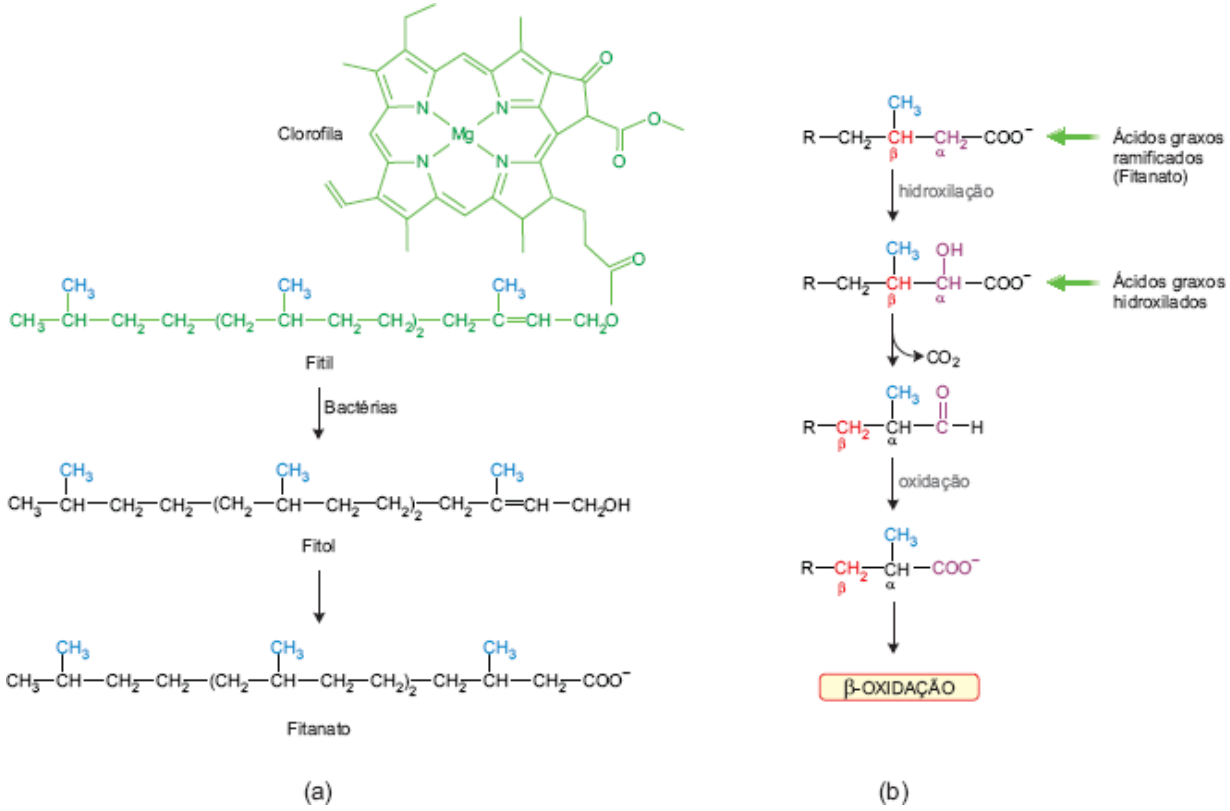


Figura 16.6 a) As bactérias do trato digestório de animais ruminantes removem o radical fitil da molécula de clorofila, originando o fitol, um álcool de 20 carbonos, que é oxidado a ácido fitânico (fitanato, no pH

fisiológico). b) Etapas principais da α-oxidação peroxissômica de ácidos graxos ramificados (fitanato) e hidroxilados: por hidroxilação do carbono α, ácidos graxos ramificados originam ácidos graxos hidroxilados, que, após descarboxilação e oxidação, são convertidos em substratos da β-oxidação.

16.3 Corpos cetônicos

Os corpos cetônicos são produzidos no fígado e oxidados nos tecidos extra-hepáticos

Uma pequena quantidade de acetil-CoA é normalmente transformada em *acetoacetato* e β *-hidroxibutirato* nos hepatócitos de mamíferos. O acetoacetato sofre descarboxilação espontânea, originando *acetona*. Os três compostos são chamados em conjunto, de *corpos cetônicos*[2], e sua síntese, de *cetogênese*. Esta ocorre na matriz mitocondrial, pela condensação de três moléculas de acetil-CoA em duas etapas (Figura 16.7). Na primeira, catalisada pela tiolase, duas moléculas de acetil-CoA originam acetoacetil-CoA; esta reação, embora transcorrendo no sentido oposto, constitui a última reação da última volta do ciclo de Lynen. A reação só ocorre no sentido da síntese quando há acúmulo de acetil-CoA. 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 (Figura 16.7). Estes órgãos são capazes de utilizar os dois compostos por possuírem uma enzima, ausente do fígado, a β-*cetoacil-CoA transferase*. Esta enzima mitocondrial catalisa a transferência da CoA de succinil-CoA para acetoacetato, formando acetoacetil-CoA e succinato. A acetoacetil-CoA é um intermediário do ciclo de Lynen e, por ação da tiolase, é cindida 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, catalisada pela β-*hidroxibutirato desidrogenase*. A acetona é volatilizada nos pulmões. Em condições em que há grande formação de corpos cetônicos, como o jejum prolongado e o

diabetes, o cérebro passa a oxidá-los. A alta concentração de corpos cetônicos na circulação induz a síntese de *monocarboxilato translocase*, que permite a entrada desses compostos nas células do sistema nervoso central, e a síntese das enzimas necessárias para a sua oxidação.

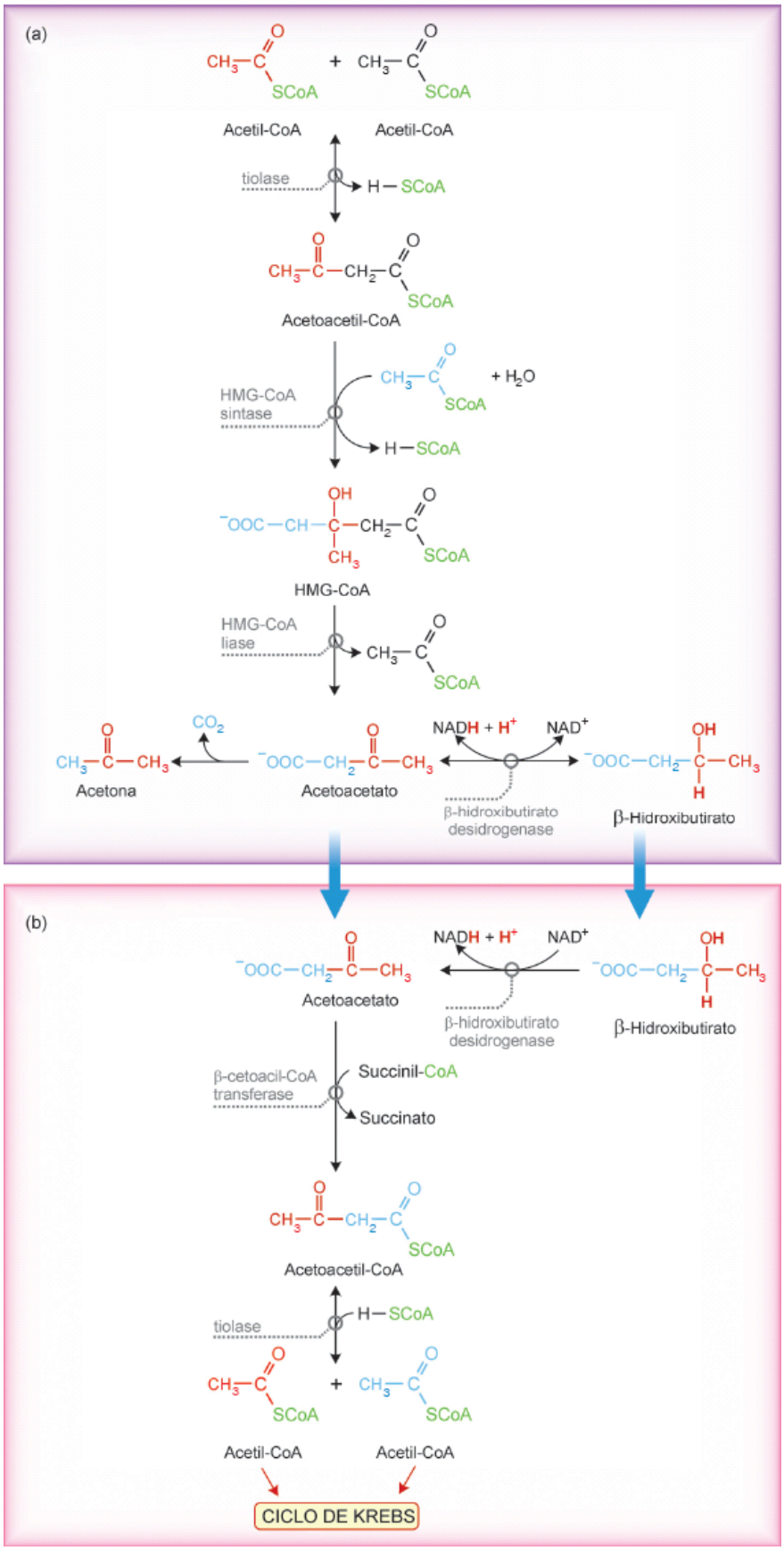
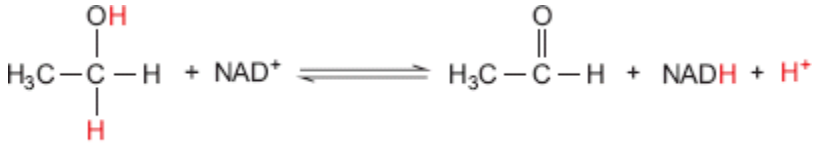

(a)
Acetil-CoA
Acetil-CoA
tiolase
H — SCoA
Acetoacetil-CoA
HMG-CoA sintase
+ H2O
H — SCoA
HMG-CoA
HMG-CoA liase
CO2
Acetona
Acetoacetato
NADH + H+
NAD+
β-hidroxibutirato desidrogenase
β-Hidroxibutirato
(b)
Acetoacetato
NADH + H+
NAD+
β-hidroxibutirato desidrogenase
β-Hidroxibutirato
β-cetoacil-CoA transferase
Succinil-CoA
Succinato
Acetoacetil-CoA
tiolase
H — SCoA
Acetil-CoA
Acetil-CoA
CICLO DE KREBS

Figura 16.7 Reações de formação de corpos cetônicos no fígado e reações que permitem seu aproveitamento por músculos e coração. As setas azuis representam transporte pelo sangue.

Os corpos cetônicos constituem, portanto, uma forma de transferência de carbonos oxidáveis 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 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 de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs, há necessidade de níveis compatíveis de oxaloacetato, para promover a reação de condensação que inicia o ciclo. Na ausência de carboidratos, diminui a concentração de piruvato e, consequentemente, a 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 baixa concentração de oxaloacetato reduz drasticamente a velocidade de oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs: a acetil-CoA acumulada condensa-se, formando os corpos cetônicos. É o que ocorre quando há redução drástica da ingestão de carboidratos (jejum — Seção 21.3, e dieta hipocalórica rigorosa) ou distúrbios do seu metabolismo (diabetes — Seção 21.4). Quando a produção ultrapassa o aproveitamento pelos tecidos extra-hepáticos, estabelece-se uma condição denominada *cetose*, caracterizada por uma concentração elevada (até centenas de vezes maior do que a normal) de corpos cetônicos no plasma (*cetonemia*) e na urina (*cetonúria*). Outro sintoma peculiar de indivíduos com cetose é o odor de acetona de seu hálito. Acetoacetato e β-hidroxibutirato são transportados para o plasma por um simporte com prótons. Por isto, quando a concentração celular destes corpos cetônicos se eleva, a cetonemia resulta em *acidose* (diminuição do pH sanguíneo), que pode ocasionar coma e morte; esta condição é denominada *cetoacidose*.

16.4 Metabolismo do etanol

O etanol ingerido pelos seres humanos é rapidamente absorvido, a maior parte no intestino, sendo detectado no sangue minutos após a ingestão. Ele difunde-se através de membranas, distribuindo-se por todas as células, inclusive o cérebro. No fígado, o principal órgão responsável por seu metabolismo, é oxidado a acetaldeído pela *álcool desidrogenase* citosólica, em uma reação idêntica à última etapa da fermentação alcoólica por leveduras, ocorrendo, neste caso, em sentido inverso:



Etanol Acetaldeído

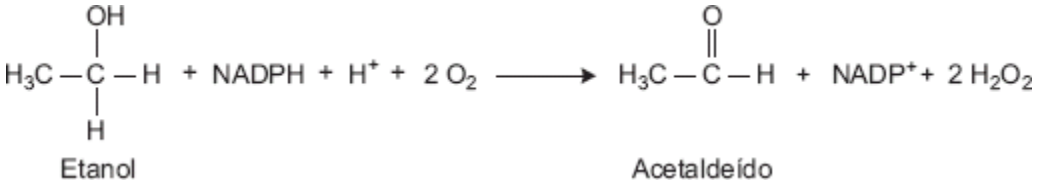
O equilíbrio da reação favorece a formação de etanol, mas sua oxidação prossegue graças à conversão de acetaldeído em *acetato*, catalisada pela *acetaldeído desidrogenase* mitocondrial:

Acetaldeído Acetato

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 e NADH. Sendo assim, o consumo eventual 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 (Tabela 18.7, Seção 18.2.2). Todavia, quando há ingestão continuada de etanol, nem sequer o seu conteúdo calórico é aproveitado pelo organismo.

A ingestão de etanol a longo prazo determina a indução de uma via secundária de oxidação de etanol que se processa sem rendimento energético. Esta via é catalisada por um sistema enzimático localizado no retículo endoplasmático, denominado *sistema microssomal de oxidação de etanol* (*MEOS*, de ***m**icrosomal **e**thanol-**o**xidizing **s**ystem*). O principal

componente deste sistema é um citocromo P_{450}, que oxida etanol a acetaldeído, utilizando NADPH e O_2 e formando água oxigenada:



A álcool desidrogenase é a principal responsável pelo metabolismo do etanol, após ingestão episódica; no consumo crônico, o citocromo P_{450} torna-se mais importante: sua concentração aumenta até 10 vezes e esta indução contribui para o desenvolvimento da tolerância e dependência.

Os efeitos metabólicos do álcool ilustram a importância da concentração relativa das formas oxidada e reduzida de coenzimas, como um fator regulador do metabolismo. Na ingestão episódica de grandes quantidades de etanol, sua oxidação a acetaldeído produz níveis altos de NADH no citosol das células hepáticas, onde normalmente a concentração de NAD^+ é 1.000 vezes maior do que a de NADH. A alta concentração de NADH favorece a formação de lactato na reação catalisada pela lactato desidrogenase (Figura 16.8).

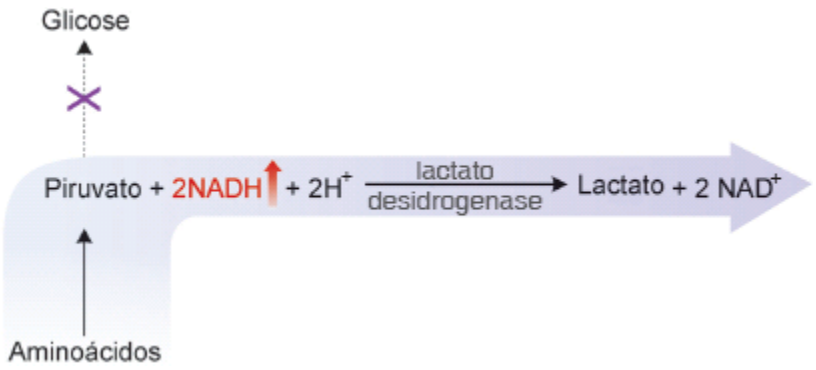


Figura 16.8 A alta concentração de NADH (em vermelho) resultante da oxidação de etanol a acetaldeído determina a produção de lactato na reação catalisada pela lactato desidrogenase, impedindo que o piruvato derivado de aminoácidos possa ser convertido a glicose pela gliconeogênese (seta pontilhada cruzada).

A contínua conversão de piruvato a lactato impossibilita a gliconeogênese a partir de aminoácidos: como eles devem ser primeiramente convertidos a piruvato e depois a glicose, nesta situação, em vez de originarem glicose, são transformados em lactato. O impedimento da gliconeogênese pode ter consequências graves, já que a tomada de álcool, muitas vezes, não é acompanhada da ingestão de nutrientes e, diminuída a reserva de glicogênio, pode ocorrer hipoglicemia e, finalmente, coma.

Os níveis mitocondriais de NADH também se elevam, devido à oxidação do acetaldeído, provocando a inibição do ciclo de Krebs (Seção 20.5) e do ciclo de Lynen (Seção 20.7). No primeiro caso, resulta o acúmulo de acetil-CoA (derivada da ativação do acetato) e sua conversão a corpos cetônicos, o que resulta em cetoacidose; no segundo caso, os ácidos graxos não são degradados. No alcoolismo crônico, há acúmulo de triacilgliceróis no fígado, ocasionando o chamado fígado gorduroso alcoólico; a esteatose é o primeiro estágio da hepatopatia alcoólica. Com o consumo continuado, o quadro evolui para cirrose, caracterizada por redução de tecido hepático funcional, que, obviamente, acarreta complicações múltiplas.

Os dois sistemas de oxidação de etanol produzem *acetaldeído*, que atinge concentrações elevadas, causando efeitos tóxicos no fígado e, por extravasar para a circulação, também nos outros tecidos. Trata-se de uma substância muito reativa, que se liga covalentemente a proteínas e fosfolipídios, alterando a sua estrutura e função. O acetaldeído forma compostos de adição com o DNA e estes aductos são mutagênicos e têm sido apontados como os agentes responsáveis pelo efeito carcinogênico do etanol. O etanol é comprovadamente carcinogênico, como se verifica pela alta incidência de vários tipos de câncer nos alcoolistas, particularmente de orofaringe, laringe, esôfago, estômago e fígado.

Por outro lado, o aumento intencional da concentração de acetaldeído tem finalidades terapêuticas. Fármacos empregados no tratamento do alcoolismo elevam a concentração plasmática de acetaldeído, como é o caso do *dissulfiram*, um inibidor irreversível da acetaldeído desidrogenase. Provoca grande desconforto após a ingestão de álcool, semelhante à “ressaca”, a indisposição que se manifesta após o consumo exagerado de álcool. O objetivo é causar aversão ao etanol, contribuindo para manter a abstinência e evitar a recidiva em pacientes alcoólicos. Novos agentes, com

estes mesmos objetivos, têm sido testados, mas sua eficácia é modesta, limitada pela baixa aderência dos pacientes ao tratamento.

O metabolismo do etanol pela via do citocromo P_{450} produz H_2O_2, um forte oxidante, capaz de gerar radicais livres, que causam dano a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Ademais, esta via consome NADPH, que participa da regeneração de glutationa (Seção 12.3), um importante antioxidante — o dano a macromoléculas é ampliado. As moléculas modificadas pelos mecanismos descritos induzem uma reação imune, que tem sido implicada na patogênese da doença hepática alcoólica. Os efeitos metabólicos do alcoolismo crônico são mal compreendidos, especialmente aqueles que induzem a dependência.

O consumo abusivo de álcool constitui um grave problema social e de saúde pública. Uma parcela significativa dos gastos totais com saúde é consumida pela assistência médica aos danos causados pelo alcoolismo − doenças crônicas, lesões traumáticas decorrentes de acidentes no trânsito, de agressões físicas etc. Além do mais, é responsável por um alto índice de óbitos. A ingestão de álcool durante a gravidez tem efeito deletério sobre o desenvolvimento do feto, particularmente do sistema nervoso central; é uma das principais causas determinantes de retardo mental e perda da visão em crianças.

16.5 Síntese de ácidos graxos

Para a síntese de ácidos graxos, a acetil-CoA tem de ser transportada para o citosol

Nos seres humanos, a via de síntese de ácidos graxos inicia-se com acetil-CoA e produz ácido palmítico.

A síntese de ácidos graxos é sujeita a diversos mecanismos de controle (Seção 20.7), mas ocorre, invariavelmente, quando a carga energética celular (razão ATP/ADP) é alta e a acetil-CoA disponível pode ser armazenada como gordura. Carboidratos e proteínas, os precursores dos ácidos graxos, são degradados a piruvato, que origina acetil-CoA pelo complexo piruvato desidrogenase e oxaloacetato pela piruvato carboxilase (Figura 16.9). Estes dois compostos 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 (Seção 20.5) e sua concentração aumenta.

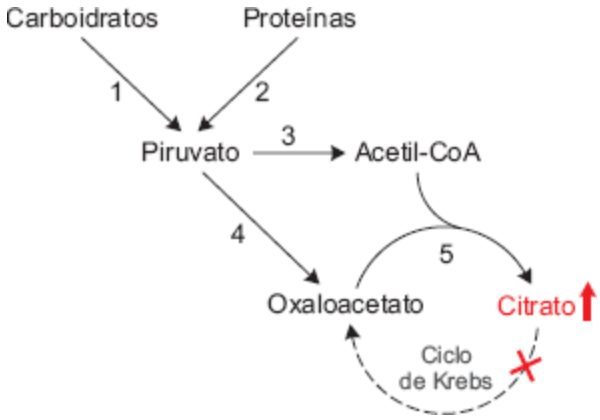
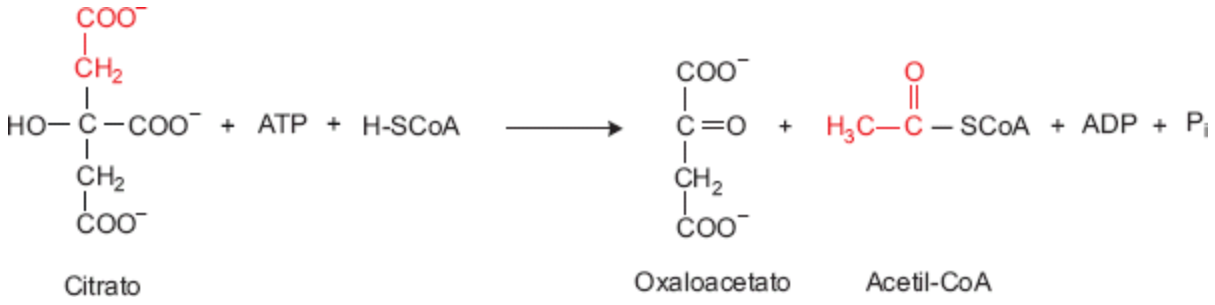


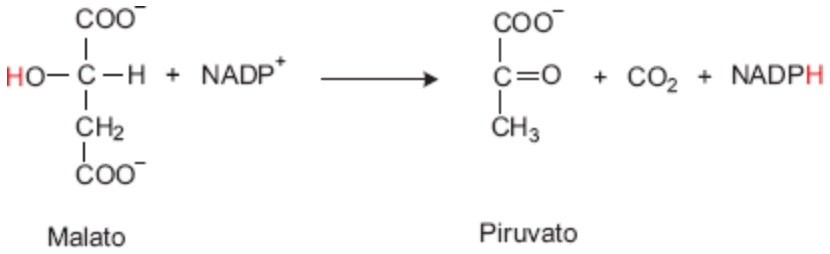
Figura 16.9 Esquema simplificado do acúmulo de citrato, quando o ciclo de Krebs encontra-se inibido. Os números referem-se às vias metabólicas e enzimas envolvidas: (1) glicólise (Seção 9.2); (2) vias de oxidação de alguns aminoácidos (Seção 17.2.2); (3) complexo piruvato desidrogenase (Seção 9.2); (4) piruvato carboxilase (Seção 10.3); (5) citrato sintase (Seção 10.1).

A síntese de ácidos graxos ocorre no citosol e o substrato inicial da via, a acetil-CoA, é formada na mitocôndria, fundamentalmente a partir de piruvato. Como a membrana interna da mitocôndria é impermeável a acetil-CoA, os carbonos do grupo acetila são transportados sob a forma de citrato, acumulado na situação analisada.

O citrato é transportado para o citosol pela tricarboxilato translocase (Figura 16.10), onde é cindido em oxaloacetato e acetil-CoA, à custa de ATP, em uma reação catalisada pela *citrato liase*:



O oxaloacetato é reduzido a malato pela *malato desidrogenase* citosólica, uma isoenzima da malato desidrogenase mitocondrial. O malato é substrato da *enzima málica* em uma reação que produz piruvato e NADPH:



O piruvato, através da piruvato translocase, retorna à mitocôndria, onde é convertido a oxaloacetato, por ação da piruvato carboxilase.

O resultado final desta sequência de reações é o transporte dos carbonos da acetil-CoA (sob a forma de citrato) da mitocôndria para o citosol com gasto de ATP, e produção de NADPH. Acetil-CoA e NADPH, ambos no citosol, podem ser utilizados para formar ácidos graxos. O NADPH constitui o agente redutor dessa síntese.

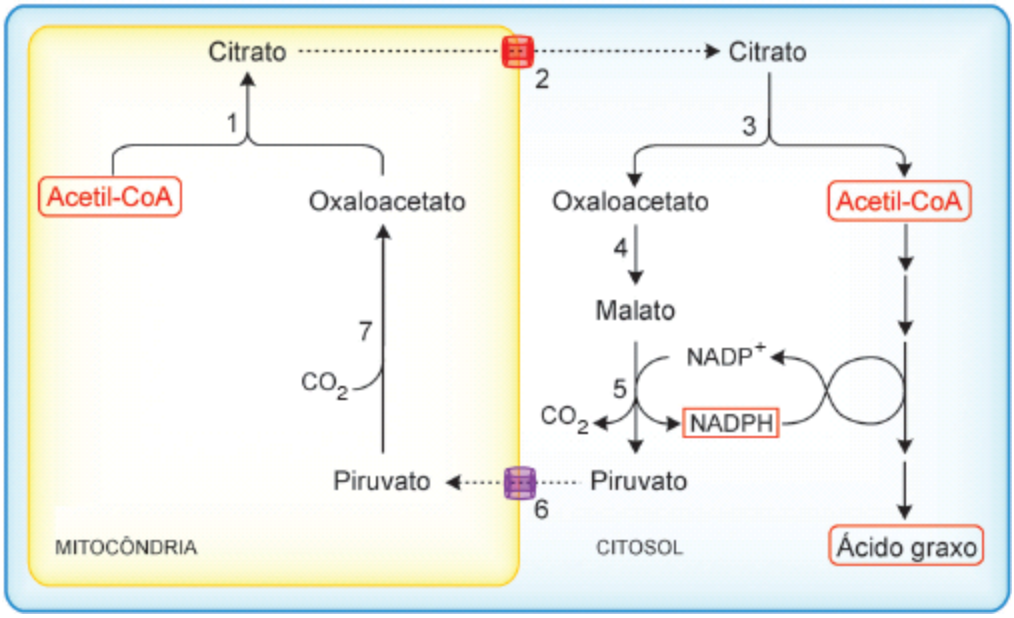
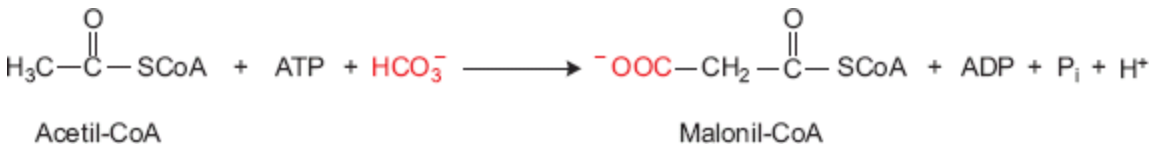


Figura 16.10 Transporte do grupo acetila da acetil-CoA, sob a forma de citrato, da mitocôndria para o citosol. As enzimas e as translocases (da membrana interna da mitocôndria) que participam do processo são: (1) citrato sintase, (2) tricarboxilato translocase, (3) citrato liase, (4) malato desidrogenase, (5) enzima málica, (6) piruvato translocase e (7) piruvato carboxilase. As setas tracejadas indicam transporte através de translocases.

A síntese de ácidos graxos tem acetil-CoA e malonil-CoA como doadores de carbonos

A síntese de ácidos graxos consiste na união sequencial de unidades de dois carbonos: a primeira unidade é proveniente de *acetil-CoA*, e todas as subsequentes, de *malonil-CoA*.

A malonil-CoA é formada por carboxilação de acetil-CoA, em uma reação 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 piruvato carboxilase (Seção 14.2) e a propionil-CoA carboxilase (Seção 16.2.2).



A acetil-CoA carboxilase de bactérias é composta por três subunidades distintas; a de vertebrados é uma enzima multifuncional (as três atividades catalíticas existem em domínios diferentes de um único polipeptídio) e em plantas, ocorrem as duas formas. Na maioria das plantas superiores, a enzima de cloroplastos é semelhante à de bactérias, com subunidades individualizadas, e a do citosol é multifuncional.

A forma ativa da acetil-CoA carboxilase em mamíferos e outros animais é um polímero filamentoso, resultante da associação de protômeros inativos. A formação de malonil-CoA constitui um ponto importante da regulação do metabolismo de ácidos graxos (Seção 20.7).

A síntese de ácidos graxos é catalisada por um sistema enzimático denominado *sintase de ácidos graxos*. A organização estrutural das sintases de ácidos graxos varia conforme o organismo, mas as reações catalisadas são as mesmas. Nas bactérias e plantas, as enzimas responsáveis pela síntese são entidades monofuncionais independentes. Nos vertebrados e fungos, as sintases são enzimas multifuncionais, trazendo grande eficiência ao processo de síntese. Nos mamíferos é composta por duas cadeias polipeptídicas idênticas associadas em um dímero e cada um dos monômeros contém todas as atividades necessárias para a síntese. Na descrição a seguir, os domínios da sintase de mamíferos que catalisam essas atividades serão denominados *enzimas*.

O único domínio da sintase que não tem atividade enzimática é a *proteína carregadora de acila* ou *ACP* (***A**cyl-**C**arrier **P**rotein*), 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. O ACP, como a coenzima A, une-se a grupos acila por ligação tioéster com a sulfidrila terminal do grupo fosfopanteteína (Figura 16.11). A longa e flexível cadeia de fosfopanteteína do ACP transporta o substrato entre os diferentes centros ativos da sintase, à semelhança da atuação do ácido lipoico no complexo piruvato desidrogenase (Seção 9.2) e da biotina na piruvato carboxilase (Seção 14.2).

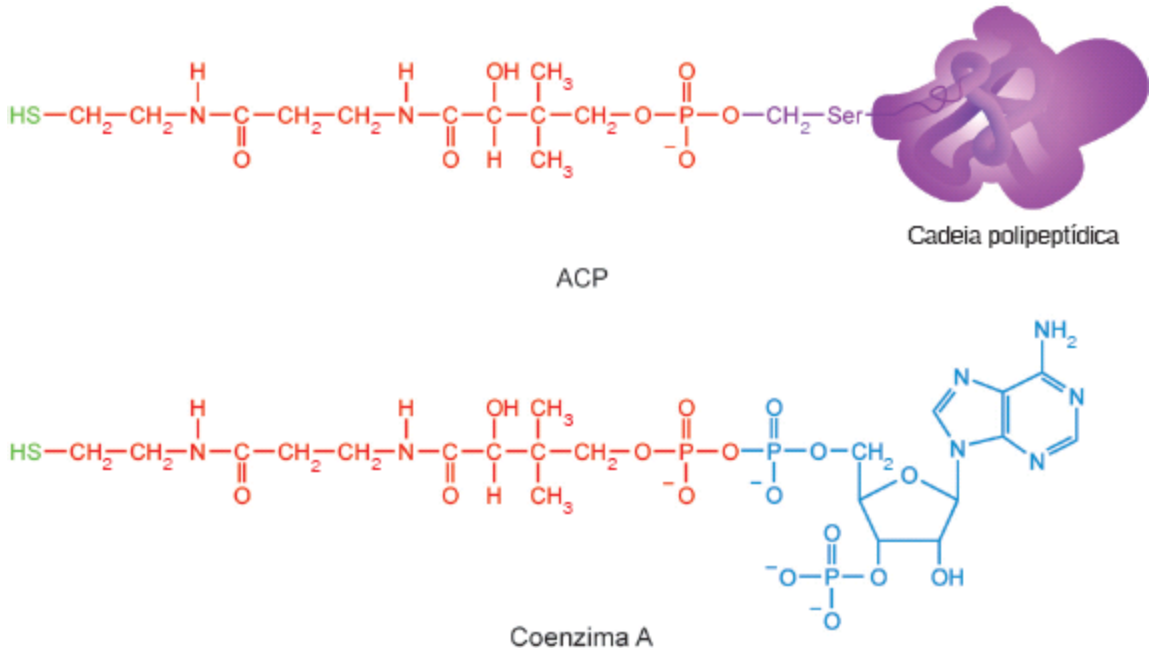


Figura 16.11 Estrutura do ACP e da coenzima A. A sulfidrila terminal está assinalada em verde e o grupo fosfopanteteína em vermelho. No ACP, a fosfopanteteína está ligada a um resíduo de serina da cadeia polipeptídica (em roxo) e na coenzima A, ao grupo fosfato da 3′-fosfoadenosina (em azul).

A síntese (Figura 16.12) inicia-se com a transferência do grupo acetila da acetil-CoA para o ACP; em seguida, a acetila é transferida para o grupo SH de um resíduo de cisteína de uma das enzimas da sintase, a β-cetoacil-ACP sintase; o ACP, agora livre, pode receber o grupo malonila da malonil-CoA, formando malonil-ACP. Estas etapas são catalisadas pela *malonil/acetil-CoA-ACP transferase* (enzima 1). Segue-se uma condensação dos grupos acetila e malonila, catalisada pela β-*cetoacil-ACP sintase* (enzima 2), originando um β-cetoacil-ACP de quatro carbonos, 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 condensação termodinamicamente desfavorável de duas moléculas de dois carbonos.

O β-cetoacil-ACP de quatro carbonos formado (contendo o terminal metila do ácido graxo a ser formado) sofre redução, desidratação e nova redução, catalisadas, respectivamente, por β-*cetoacil-ACP redutase* (enzima 3), β-*hidroxiacil-ACP desidratase* (enzima 4) e *enoil-ACP redutase* (enzima 5). As duas redutases usam NADPH como doador de elétrons. Neste ponto, termina o primeiro ciclo de síntese, com a formação de *butiril-ACP*.

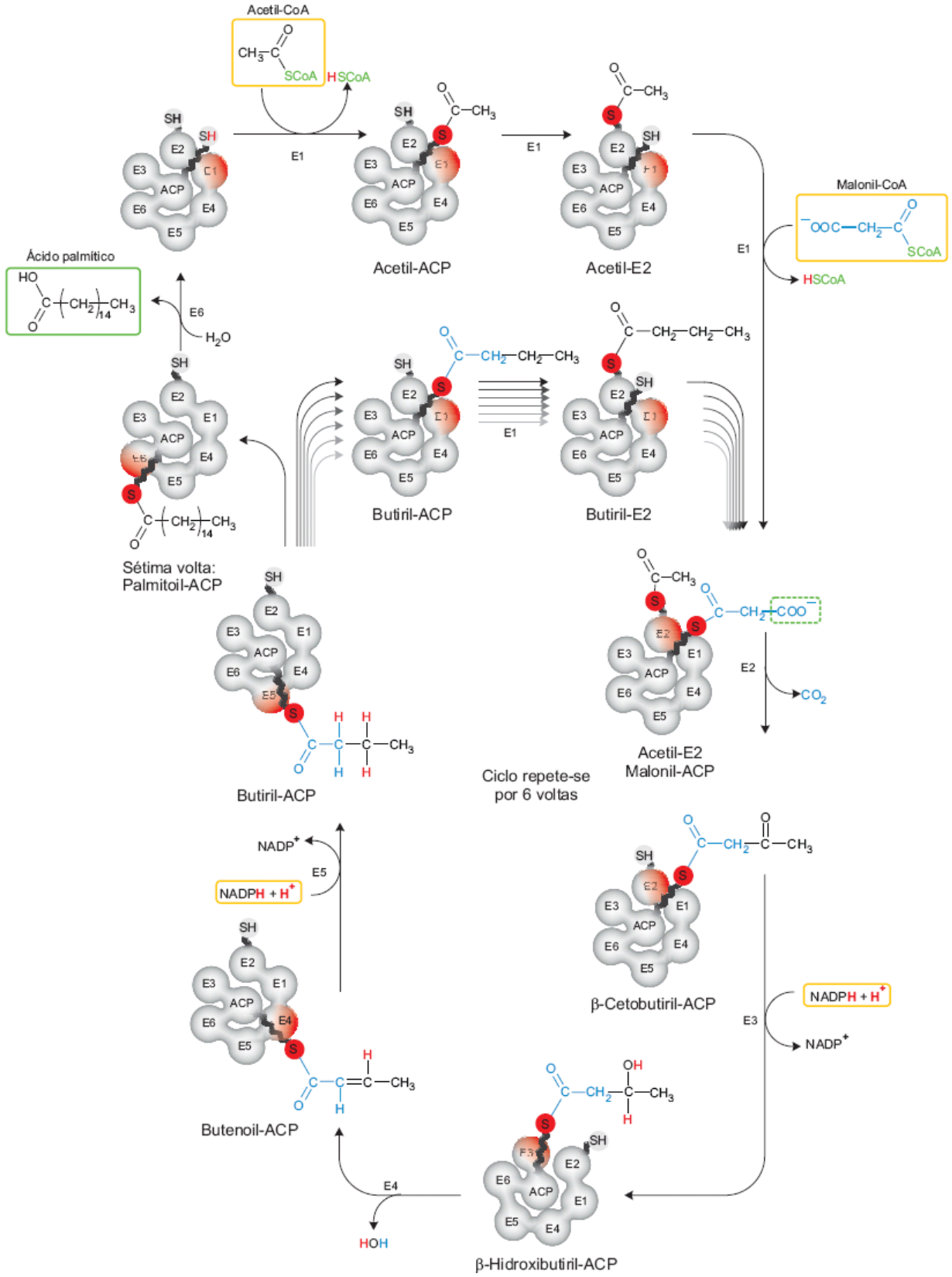

Acetil-CoA
HSCoA
E1
Acetil-ACP
Acetil-E2
Malonil-CoA
HSCoA
Ácido palmítico
E6
H_2O
Butiril-ACP
Butiril-E2
Sétima volta:
Palmitoil-ACP
Butiril-ACP
Acetil-E2
Malonil-ACP
E2
CO_2
Ciclo repete-se
por 6 voltas
$NADP^+$
$NADPH + H^+$
E5
Butenoil-ACP
β-Cetobutiril-ACP
E3
$NADPH + H^+$
$NADP^+$
E4
HOH
β-Hidroxibutiril-ACP
ACP
SH
S

Figura 16.12 Reações catalisadas por uma sintase de ácidos graxos. As enzimas (ou atividades enzimáticas) constituintes da sintase são: malonil/acetil-CoA-ACP transferase (E1), β-cetoacil-ACP sintase (E2), β-cetoacil-ACP redutase (E3), β-hidroxiacil-ACP desidratase (E4), enoil-ACP redutase (E5) e tioesterase (E6). Os componentes da sintase estão representados por esferas, destacando-se o ACP, com sua sulfidrila terminal e o grupo SH de um resíduo de cisteína da β-cetoacil-ACP sintase (E2). A primeira volta do ciclo de síntese leva à formação de butiril-ACP. Para o alongamento da cadeia carbônica (setas pontilhadas), o butiril-ACP sofre a mesma sequência de reações que o acetil-ACP: o grupo butirila é transferido para o grupo SH da E2 e o ACP pode ligar-se a um segundo grupo malonila prosseguindo as reações catalisadas pelas enzimas E1 a E5. O ciclo é repetido por mais seis vezes e, no final da sétima volta, é sintetizado palmitoil-ACP, que, por ação da tioesterase (E6), é liberado como ácido palmítico.

Para prosseguir o alongamento da cadeia — por adição de unidades de dois carbonos fornecidos por malonil-CoA — o grupo butirila é transferido para o SH da β-cetoacil-ACP sintase (à semelhança do que ocorreu com o grupo acetila), liberando o ACP, que pode, então, receber outro grupo malonila. A repetição do ciclo por mais seis voltas, perfazendo um total de *sete* voltas, leva à formação de *palmitoil-ACP*, que é reconhecido pela *tioesterase* (enzima 6): a ligação tioéster do substrato é hidrolisada, liberando o *ácido palmítico*. A sintase de ácidos graxos de mamíferos produz ácidos graxos saturados de até 16 carbonos, o mais frequente sendo o ácido palmítico.

A síntese de ácido palmítico (16 C), no total, requer: 1 acetil-CoA, 7 malonil-CoA, 7 ATP consumidos na formação de 7 malonil-CoA a partir de 7 acetil-CoA e 14 NADPH utilizados nas 7 voltas da síntese.

O NADPH tem duas origens: provém da reação catalisada pela enzima málica e das reações da via das pentoses-fosfato catalisadas por desidrogenases (Seção 12.2), que sofrem uma regulação paralela (Seção 20.3) à regulação da síntese de ácidos graxos (Seção 20.7). A importância relativa entre as duas fontes de poder redutor depende do tecido considerado. Nos vegetais, a síntese de ácidos graxos ocorre nos

cloroplastos, onde NADPH é produzido pelas reações da fase clara da fotossíntese (Seção 15.3).

A sequência dos *tipos de reações* da síntese de um ácido graxo (condensação, redução, desidratação e redução) é oposta à sequência da oxidação de um ácido graxo pelo ciclo de Lynen (oxidação, hidratação, oxidação e cisão da cadeia carbônica) (Figura 16.13). A despeito disto, uma via ***não*** é o inverso da outra: elas diferem quanto às enzimas e coenzimas utilizadas, ao compartimento celular onde se processam e ao suporte da cadeia carbônica (ACP ou CoA). Em resumo, os processos de síntese e de degradação de ácidos graxos são absolutamente distintos, como habitualmente acontece no metabolismo.

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 da produção de ácidos graxos ocorre no fígado e, em menor extensão, no tecido adiposo. Os ácidos graxos são sintetizados a partir dos componentes da dieta: carboidratos, principalmente, e do excedente de proteínas (este pouco usual na dieta da maioria da população); são exportados para os outros tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas. Nas plantas, a síntese de ácidos graxos acontece nos cloroplastos; no citosol, há o processo de alongamento, originando os ácidos graxos de cadeia muito longa, componentes das ceras vegetais.

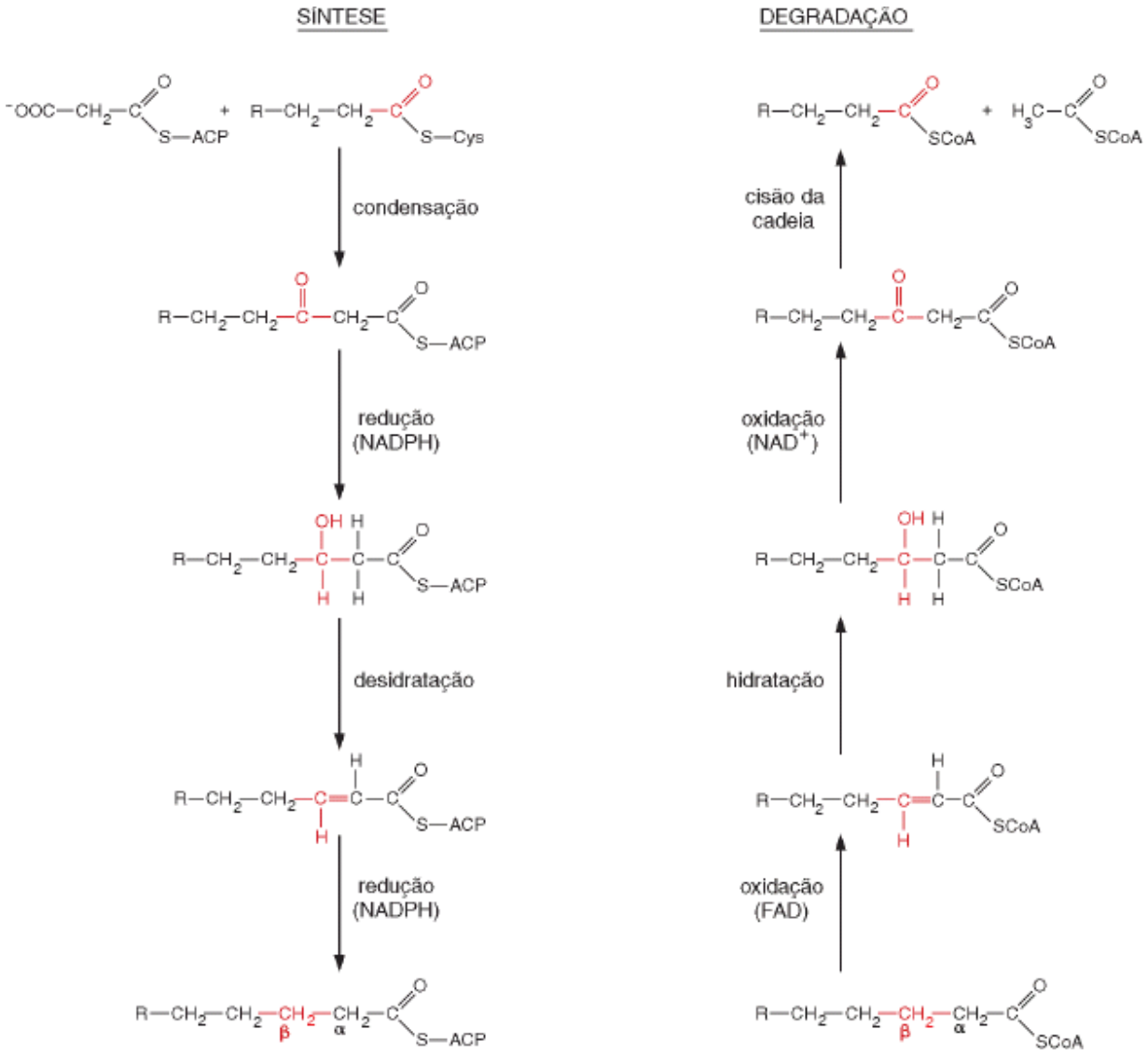


Figura 16.13 Comparação entre a síntese e a degradação de um ácido graxo — os dois processos compreendem os mesmos tipos de reações, ocorrendo, todavia, em sentido e sequência opostos.

A regulação da síntese de ácidos graxos encontra-se na Seção 20.7.

16.6 Alongamento e insaturação de ácidos graxos — Ácidos graxos essenciais

Nos mamíferos, uma fração significativa dos ácidos graxos produzidos pela sintase ou fornecidos pela dieta originam ácidos graxos saturados mais longos. O principal sistema enzimático incumbido do alongamento de ácidos graxos situa-se no retículo endoplasmático, sendo o ácido palmítico o precursor mais utilizado. O sistema promove adições sucessivas de unidades de dois carbonos, por meio de uma reação de condensação, seguida por redução, desidratação e nova redução, ou seja, a mesma sequência de etapas descritas para a sintase de ácidos graxos. Em oposição à sintase, as quatro etapas de alongamento são desempenhadas por proteínas individuais. O substrato doador de carbonos é malonil-CoA e o agente redutor, NADPH.

Alguns ácidos graxos insaturados são essenciais para os mamíferos

Os lipídios dos animais e vegetais são muito ricos em ácidos graxos insaturados, os quais exercem funções muito diversificadas.

A presença de ácidos graxos insaturados nas moléculas dos lipídios faz diminuir a sua temperatura de fusão (Seção 6.2.1). Assim, a alta porcentagem (cerca de 60%) de ácidos graxos insaturados constituintes dos triacilgliceróis do tecido adiposo humano determina que permaneçam líquidos à temperatura do organismo, impedindo que cristalizem e causem dano às estruturas celulares. Os ácidos graxos insaturados são componentes de fosfolipídios estruturais das membranas celulares e, pela mesma razão, determinam sua fluidez adequada, indispensável para a ocorrência das funções a elas associadas. Participam, também, do transporte de colesterol (Seção 20.8). Determinados ácidos graxos insaturados, que não podem ser sintetizados pelas células de mamíferos, destacam-se ainda mais, por originarem moléculas reguladoras (ver *Eicosanoides* a seguir).

As células animais têm uma capacidade de sintetizar ácidos graxos insaturados muito menores do que as células vegetais. Os mamíferos, incluindo os seres humanos, dispõem de *acil-CoA dessaturases* que produzem insaturações *apenas* nas posições Δ4, Δ5, Δ6 e Δ9, não havendo possibilidade de introdução de duplas ligações entre carbonos mais distantes da carboxila do que C9, ou seja, entre este carbono e o carbono ω. Todavia, ácidos graxos contendo insaturações além de C9, como, por exemplo, Δ12 (ω-6) e Δ15 (ω-3), são imprescindíveis para esses

organismos. Tais ácidos graxos são obtidos de plantas, que têm dessaturases capazes de originar essas duplas ligações.

As acil-CoA dessaturases de mamíferos fazem parte de um sistema enzimático ligado ao retículo endoplasmático, que inclui o citocromo b_5 e requer NADH e O_2. Este sistema produz os ácidos graxos monoinsaturados mais comuns nos tecidos animais: *palmitoleico* (ω-7) e *oleico* (ω-9), por meio da introdução de uma dupla ligação na posição Δ9 dos ácidos palmítico e esteárico, respectivamente (Figura 16.14).

As dessaturases de células vegetais catalisam a formação de uma dupla ligação Δ12 no ácido oleico, convertendo-o em *ácido linoleico* (18:2 Δ9,12 ω-6), que sofre outra insaturação (Δ15) e origina o *ácido* α-*linolênico* (18:3 Δ9,12,15 ω-3).

Os ácidos graxos que não podem ser sintetizados pelos mamíferos devem ser obtidos da alimentação, sendo, por isto, ditos *essenciais*. Os ácidos graxos reconhecidamente essenciais para os seres humanos são os *ácidos linoleico* (ω-6) e α *-linolênico* (ω-3). A partir dos essenciais, o organismo humano sintetiza, por meio de reações alternadas de dessaturação e alongamento, duas famílias de ácidos graxos mais longos e com maior número de insaturações: a família ω-6, derivada do ácido linoleico, e a família ω-3, do ácido α-linolênico.

A dessaturação do ácido linoleico (Figura 16.14) produz o *ácido* γ-*linolênico* (18:3 Δ6,9,12 ω-6). Este ácido graxo sofre alongamento de dois carbonos, que resulta em alteração da posição das insaturações (deslocamento de dois carbonos a partir da carboxila), formando o ácido di-homo-γ-linolênico (20:3 Δ8,11,14 ω-6). A quarta insaturação introduzida é a Δ5, originando o *ácido araquidônico* (20:4 Δ5,8,11,14 ω-6), que é o ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa mais abundante nas membranas da maioria das células humanas. O ácido araquidônico pode sofrer reações adicionais de alongamento e insaturação.

O ácido α-linolênico é submetido a reações de insaturação e alongamento, formando diversos derivados, dentre os quais se salientam os ácidos *eicosapentaenoico* (*EPA*, da denominação inglesa, 20:5 ω-3) e *docosaexaenoico* (*DHA*, 22:6 ω-3). EPA e DHA são particularmente abundantes no sistema nervoso central e na retina. Nos seres humanos, uma fração muito pequena de ácido α-linolênico (ω-3) é convertida em EPA e

DHA porque os ácidos graxos ω-6 e ω-3 competem como substratos nas etapas de dessaturação e alongamento, e a ingestão de ácidos graxos ω-6 costuma ser muito maior do que a de ácidos graxos ω-3. Por não serem sintetizados em quantidades adequadas, EPA e DHA têm sido considerados como componentes essenciais da dieta humana. Adicionalmente, admite-se que atuem na prevenção de muitas doenças. Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar esse efeito protetor (ver ao final da Seção 16.6.1).

As deficiências de ácidos graxos essenciais ω-3 e/ou ω-6 acarretam diversas síndromes que podem ser fatais.

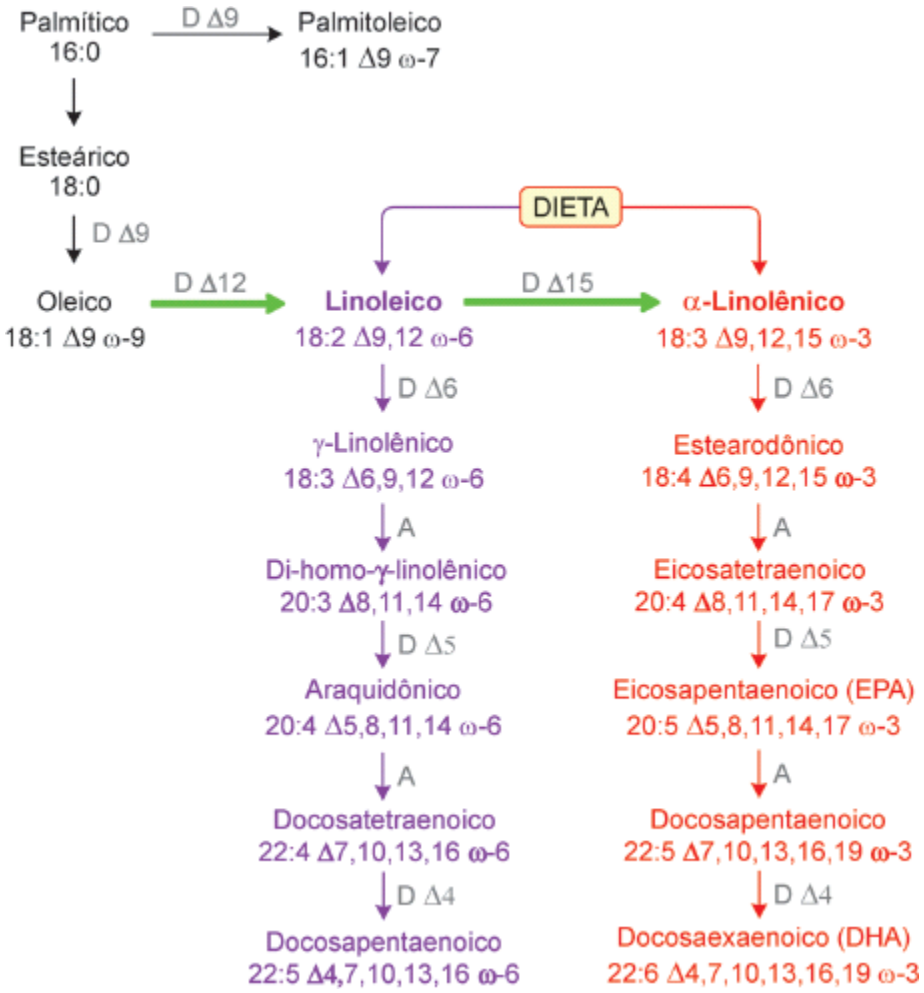


Figura 16.14 Síntese de ácidos graxos por alongamento e insaturação do ácido palmítico. As conversões que ocorrem nos vegetais estão indicadas por setas verdes. Os ácidos linoleico (ω-6) e α-linolênico (ω-3) são essenciais para os seres humanos, devendo ser fornecidos pela dieta. Os

ácidos graxos essenciais originam os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa das classes ω-6 (em roxo) e ω-3 (em vermelho), por meio de reações de dessaturação (D) e de alongamento (A).

As necessidades e as fontes dietéticas dos ácidos graxos essenciais são analisadas na Seção 18.2.2.

Um dos destinos metabólicos conhecidos dos ácidos graxos essenciais é a sua conversão em compostos fisiologicamente importantes, os eicosanoides.

16.6.1 Eicosanoides

Os eicosanoides são sintetizados a partir dos ácidos graxos essenciais

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa das séries ω-6 e ω-3, produzidos a partir dos ácidos graxos essenciais, são convertidos em compostos oxigenados estruturalmente relacionados: *prostaglandinas*, *prostaciclinas*, *tromboxanas*,*leucotrienos* etc. Essas famílias de substâncias são chamadas, conjuntamente, de *eicosanoides*, por terem 20 (*eikosi*, em grego) carbonos.

O precursor mais importante de eicosanoides é o ácido araquidônico (ω-6), constituinte de fosfolipídios de membrana. Por isto, a síntese de eicosanoides inicia-se com a liberação deste ácido graxos da bicamada lipídica, por meio de hidrólise, catalisada por uma fosfolipase específica, a fosfolipase A_2. O ácido araquidônico origina eicosanoides por duas vias principais (Figura 16.15), catalisadas por *ciclo-oxigenases* (*COX*), que sintetizam prostaglandinas (os primeiros eicosanoides descobertos), prostaciclinas e tromboxanas e *lipo-oxigenases* (*LOX*), que produzem leucotrienos.

Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa da série ω-3, como os ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA), são também substratos das enzimas das vias de síntese de eicosanoides. Existe, então, uma competição entre os ácidos graxos ω-6 e ω-3, que influencia o tipo de eicosanoide a ser produzido. Deste modo, o perfil de eicosanoides dependerá das enzimas presentes na célula e do tipo de ácido graxo

existente na membrana plasmática, característica esta que sofre forte influência da composição de ácidos graxos da dieta (Seção 18.2.4).

Os eicosanoides são sintetizados pela maioria das células nucleadas, em resposta a infecção, lesão, ação hormonal, estresse e outros estímulos. Atuam em concentrações tão baixas quanto os hormônios; ao contrário destes, não são transportados pela circulação e exercem seus efeitos localmente, por ligação a receptores específicos das membranas plasmática e nuclear. São mediadores de processos fisiológicos muito diversificados: contração de músculos lisos — e, consequentemente, regulação da pressão arterial, dilatação dos brônquios, contração uterina etc. —, reação inflamatória desencadeada por lesão ou infecção, manifestação de dor e febre, coagulação sanguínea, secreção de suco gástrico e outros. Os eicosanoides são envolvidos na patogênese de doenças devidas a interferências nesses processos, tais como: doenças inflamatórias agudas e crônicas, autoimunes (artrite reumatoide) e alérgicas (asma), aterosclerose, câncer, doença de Alzheimer e de Parkinson etc. Essas substâncias têm despertado enorme interesse médico, não somente devido ao seu largo espectro de ação, mas 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 anti-inflamatórios, analgésicos e antipiréticos de uso corrente interferem no metabolismo de eicosanoides (Figura 16.15). Os *corticosteroides*, por exemplo, inibem a fosfolipase A_2, reduzindo a disponibilidade de ácido araquidônico e afetando, portanto, a síntese de todos os eicosanoides dele derivados. Já os anti-inflamatórios não esteroídicos, como *aspirina* (mecanismo de ação na Seção 5.7), *indometacina*, *fenilbutazona*, *ibuprofeno*, *naproxeno*, *diclofenaco*, *piroxicam* etc., bloqueiam apenas a subdivisão da via que origina prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanas, não atuando sobre o metabolismo dos leucotrienos e lipoxinas. Estes fármacos inibem a atividade das ciclo-oxigenases, que catalisam a ciclização do ácido araquidônico (ligação dos carbonos 8 e 12) e a incorporação de oxigênio. A aspirina, em doses baixas, tem sido utilizada com sucesso na prevenção de infartos do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais (derrames) etc., por evitar a formação de trombos (coágulos); este efeito é devido à inibição da

síntese de tromboxanas (o principal eicosanoide sintetizado por plaquetas), que estimulam a agregação de plaquetas, o passo inicial da coagulação sanguínea.

As prostaglandinas, por estimularem a contração uterina, têm sido empregadas para a indução do parto normal ou como agentes abortivos. Os leucotrienos são mediadores de processos alérgicos, como a reação anafilática e a asma. Agentes terapêuticos que inibem a sua ação, evitando a constrição brônquica resultante, são adotados no tratamento da asma.

A inibição farmacológica da biossíntese de eicosanoides, graças à sua atuação pleiotrópica, tem igualmente efeitos deletérios. Por exemplo, o uso prolongado de doses baixas de aspirina desencadeia úlceras gastroduodenais.

Deve-se salientar que os eicosanoides originados de ácido araquidônico (ω-6) exercem efeitos pró-inflamatórios e pró-agregantes de plaquetas muito mais potentes do que aqueles sintetizados a partir de EPA e DHA (ω-3). Além disto, pesquisas recentes identificaram outros derivados oxigenados de EPA e DHA, com fortes efeitos anti-inflamatórios e de resolução da inflamação, denominados apropriadamente de *protectinas* e *resolvinas*.

As atuações dos derivados de EPA e DHA no controle da inflamação poderiam ser responsáveis por sua ação protetora. Como os ácidos graxos ω-6 e ω-3 competem pelas enzimas das vias de síntese de eicosanoides, justifica-se a recomendação de aumentar a ingestão de ácidos graxos ω-3 de cadeia longa (Seção 18.2.2) — dietas ricas em EPA e DHA propiciam maior incorporação desses ácidos graxos nos fosfolipídios componentes das membranas celulares e a formação dos eicosanoides deles derivados, que atenuam a reação inflamatória.

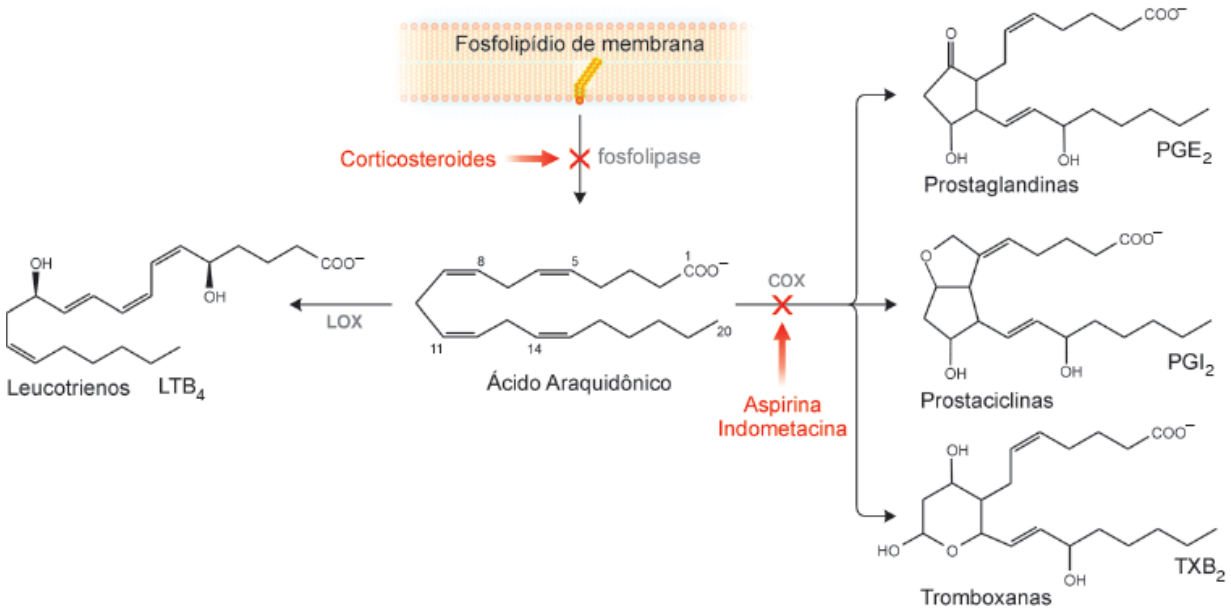


Figura 16.15 Esquema simplificado da síntese de eicosanoides a partir de ácido araquidônico, que deve ser primeiramente liberado de fosfolipídios de membrana, por ação da fosfolipase A_2. A figura mostra a estrutura de um membro representativo de algumas famílias de eicosanoides e os pontos de atuação de agentes anti-inflamatórios. COX: ciclo-oxigenases; LOX: lipo-oxigenases.

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, principalmente, por redução de di-hidroxiacetona fosfato, obtida a partir de carboidratos (Seção 9.1), aminoácidos e lactato (Seção 14.2). No fígado e nos rins, a fosforilação do glicerol é catalisada pela glicerol quinase (Figura 16.16).

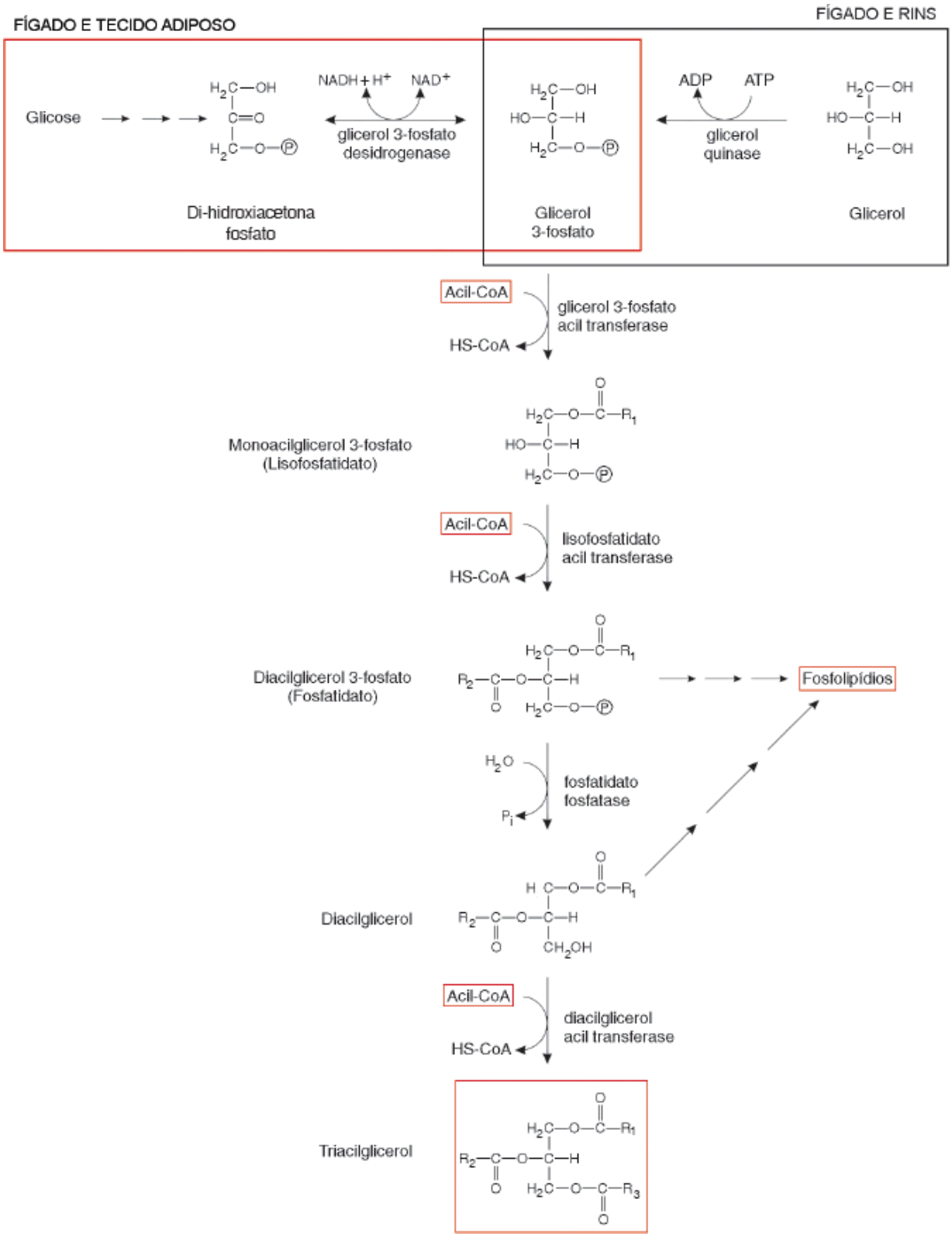


Figura 16.16 Síntese de triacilgliceróis — o fosfatidato e o diacilglicerol são intermediários comuns à via de síntese de fosfolipídios.

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 (Figura 16.16).

O fígado e o tecido adiposo são "parceiros" no metabolismo de triacilgliceróis

A maioria dos tecidos dos seres humanos é capaz de esterificar ácidos graxos, formando triacilgliceróis, mas o fígado e o tecido adiposo são os principais responsáveis por esse processo. 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 pelo próprio tecido adiposo — 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.

Os fosfolipídios, 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 por produção endógena ou a partir dos alimentos. A quantidade de colesterol sintetizado *de novo* varia de modo inverso com a quantidade ingerida. Um indivíduo adulto saudável sintetiza em torno de 800 mg de colesterol por dia, que corresponde a cerca de 70% do colesterol total diário e o restante é fornecido pela dieta. Os principais órgãos responsáveis pela produção de colesterol são o fígado e o intestino delgado. O colesterol, originário da síntese endógena ou dos alimentos, é transportado pelas lipoproteínas plasmáticas (Seção 6.2.7).

O cérebro também sintetiza grande quantidade de colesterol e seu conteúdo é, em média, seis vezes maior que o do fígado. Todavia, diferentemente do fígado e da maioria dos tecidos de mamíferos, o cérebro não é capaz de absorver ou de exportar colesterol associado a lipoproteínas plasmáticas, porque elas não atravessam a barreira hematoencefálica. Deste modo, todo o colesterol presente no cérebro é formado por síntese *de novo* e o excedente pode ser exportado sob a forma de derivados hidroxilados (ver adiante).

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 citosol 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 (Figura 16.17), que se polimerizam em um intermediário linear, que, após ciclização, origina o colesterol.

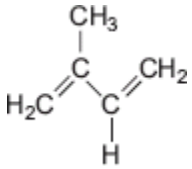


Figura 16.17 Molécula do isopreno.

A síntese (Figura 16.18 a) inicia-se com a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, produzindo acetoacetil-CoA; esta se condensa 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 citosólicas. Nos hepatócitos, estas duas enzimas são encontradas também nas mitocôndrias e a HMG-CoA formada é precursora dos *corpos cetônicos*.

A HMG-CoA é a seguir reduzida a *mevalonato*, à custa de 2 NADPH, em uma reação catalisada pela *HMG-CoA redutase*, uma enzima ligada ao retículo endoplasmático. Esta é a reação limitante da síntese de colesterol.

O mevalonato (C_6) sofre duas fosforilações, que consomem 3 ATP, e uma descarboxilação (Figura 16.18 b), originando a unidade isoprenoide, o *isopentenil-pirofosfato* (C_5). Além do colesterol, outros compostos importantes apresentam unidades isoprenoides em sua estrutura: clorofila, heme, ubiquinona, plastoquinona, vitaminas A, E e K, carotenoides e borracha.

Um total de 6 moléculas de isopentenil-pirofosfato são consumidas para formar *esqualeno* (C_{30}), o último intermediário linear da via (Figura 16.18 c). A síntese de esqualeno processa-se por reações de isomerização, condensação, redução por NADPH e eliminação de pirofosfato.

A etapa final (Figura 16.18 d) consiste no dobramento da molécula linear do esqualeno, de modo a formar o núcleo tetracíclico característico dos esteroides, além de um grupo hidroxila, a porção polar dessas moléculas. São mais de 20 reações complexas, incluindo incorporação de oxigênio, redução por NADPH, remoção de grupos metila e migração de duplas ligações, que levam, finalmente, à produção de colesterol.

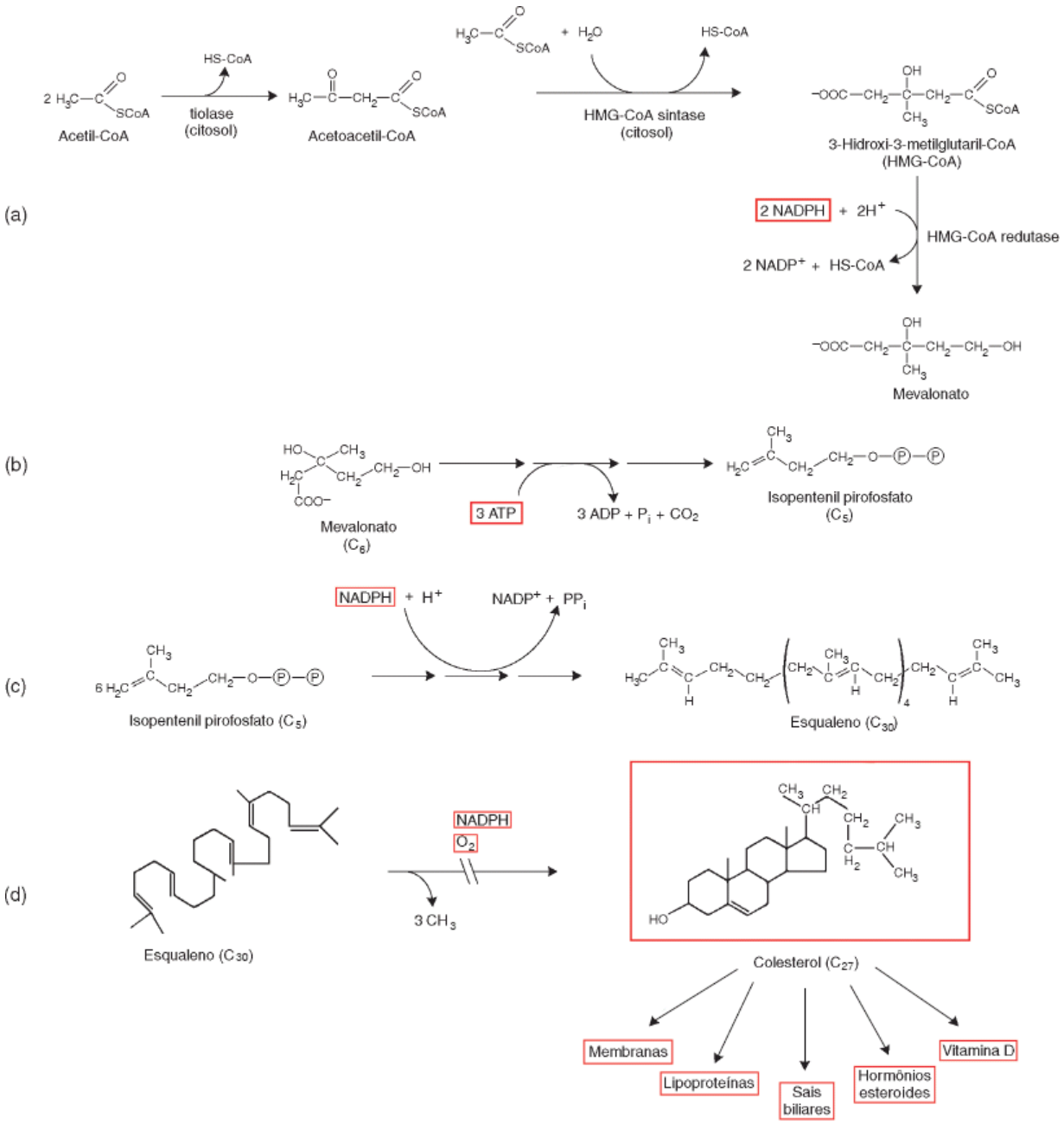


Figura 16.18 Etapas da síntese de colesterol. a) A condensação de 3 moléculas de acetil-CoA produz HMG-CoA, que é reduzida a mevalonato. b) Mevalonato (C_6) é convertido na unidade isoprenoide, o isopentenil-pirofosfato (C_5), por fosforilação à custa de ATP e descarboxilação. c) Seis unidades isoprenoides formam o esqualeno, um composto linear de 30 carbonos, com redução por NADPH e produção de PP_i. d) A conversão de esqualeno em colesterol (C_{27}) envolve a ciclização de esqualeno, por meio

de vários passos que incluem a perda de 3 grupos metila e o consumo de NADPH e O_2.

A síntese de colesterol é, portanto, uma síntese redutiva, que ocorre com grande consumo de energia: para cada molécula produzida são gastos 18 ATP e dezenas de NADPH.

O controle do metabolismo do colesterol está analisado na Seção 20.8.

O colesterol, apesar de tão temido, é indispensável ao organismo humano

O colesterol, além de ser um componente estrutural de membranas, é precursor dos ácidos biliares, oxiesteroides, hormônios esteroides e da 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 (Seção 20.8).

Os *ácidos biliares* são esteroides di-ou tri-hidroxilados, produzidos no fígado por modificações da molécula de colesterol, que incluem: hidroxilação do núcleo tetracíclico e encurtamento e oxidação da cadeia lateral. Estas reações consomem NADPH, O_2, acetil-CoA e ATP e são catalisadas por dezenas de enzimas, que incluem diversos citocromos P_{450}.

No pH fisiológico, os ácidos biliares ocorrem predominantemente na forma desprotonada, do que resulta a denominação mais apropriada de *sais biliares*; ambos os termos, todavia, costumam ser empregados. Nos seres humanos, os principais sais biliares são *colato* e *quenodesoxicolato* (*ácidos cólico e quenodesoxicólico*), secretados para a vesícula biliar, na sua maior parte, associados a glicina e a taurina por ligação amídica (Figura 16.19). A bile contém, ainda, outros compostos, dentre os quais, colesterol. Em determinados distúrbios crônicos do metabolismo de lipídios, há um aumento da secreção de colesterol para a bile, onde ele pode precipitar e originar cálculos ("pedras"). A incidência de cálculos de colesterol é muito alta na população idosa do mundo ocidental.

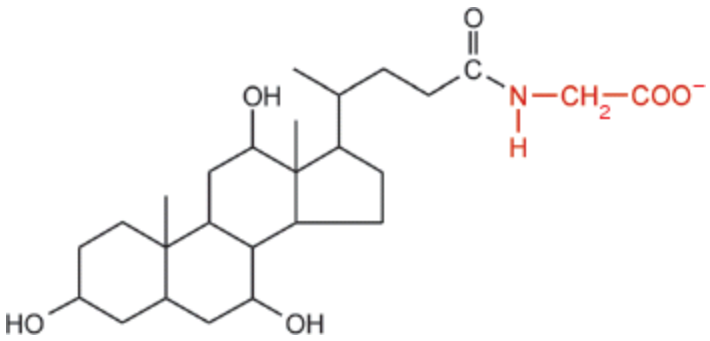


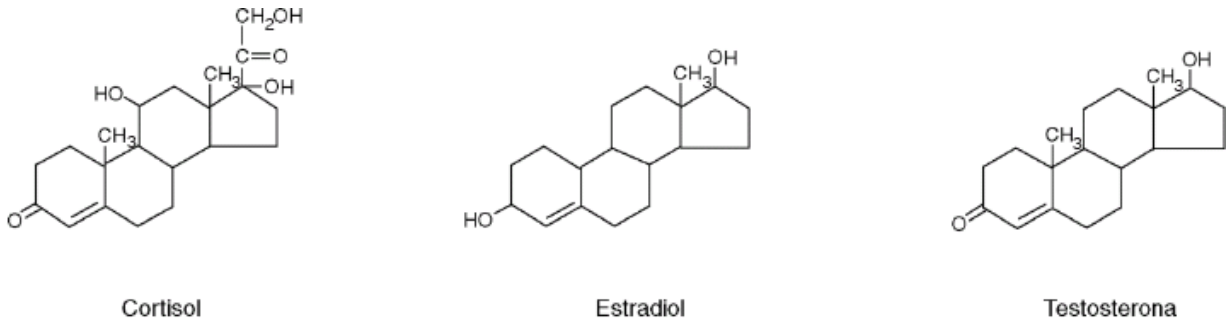
Figura 16.19 Estrutura do glicocolato, derivado do colato por ligação com glicina (em vermelho).

Os sais biliares são secretados da vesícula biliar para a porção superior do intestino delgado (duodeno), onde têm papel fundamental na digestão de lipídios: por suas propriedades anfifílicas, são responsáveis pela emulsificação e solubilização dos lipídios e das vitaminas lipossolúveis, facilitando sua digestão e absorção. A maior parte dos sais biliares é reabsorvida na porção inferior do intestino delgado (íleo) e retorna ao fígado, para novos ciclos de secreção. A parte restante é excretada nas fezes, depois de parcialmente degradada pelas bactérias intestinais.

Além de atuarem como detergentes fisiológicos, os sais biliares têm uma função primordial na eliminação do colesterol. O organismo humano não produz enzimas capazes de degradar o anel esteroide a CO_2 e H_2O, de modo que *a formação de sais biliares é a principal via de excreção de colesterol*. A inibição da reabsorção dos sais biliares aumenta a conversão de colesterol nestes compostos, ou seja, aumenta a excreção de colesterol. Este é o princípio de ação de alguns fármacos utilizados para reduzir o nível de colesterol plasmático (Seção 20.8).

Em alguns órgãos, como o cérebro, a exportação do colesterol para a circulação é viabilizada por sua conversão a compostos capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. São os *oxiesteroides*, derivados que contêm grupos hidroxilas em várias posições da cadeia lateral do colesterol, formados em reações catalisadas por citocromos P_{450}. Os oxiesteroides são também produzidos em outros tecidos extra-hepáticos e constituem uma forma de transporte e excreção de colesterol, porque podem ser oxidados a sais biliares no fígado.

A síntese dos hormônios esteroides inicia-se com a hidroxilação da cadeia lateral do colesterol, catalisada por um citocromo P_{450} mitocondrial, com a participação de NADPH e O_2. Os principais hormônios esteroides (Figura 16.20) são os *corticosteroides*, produzidos no córtex das glândulas suprarrenais e os *hormônios sexuais*, produzidos nas gônadas.



Cortisol Estradiol Testosterona

Figura 16.20 Estrutura de três hormônios esteroides. Notar a semelhança estrutural entre o estradiol (hormônio feminino) e a testosterona (hormônio masculino).

Os corticosteroides regulam o metabolismo de proteínas, carboidratos e eletrólitos. O *cortisol* (*hidrocortisona*) e seus derivados são largamente utilizados como agentes anti-inflamatórios, por inibirem a síntese de eicosanoides (Figura 16.15).

Os hormônios sexuais incluem a *testosterona*, o hormônio masculino, e os *estrógenos* e as *progestinas*, os hormônios femininos. Tais hormônios controlam a diferenciação dos órgãos sexuais e das características sexuais secundárias. Derivados sintéticos dos hormônios sexuais têm tido várias aplicações terapêuticas, 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 *esteroides anabolizantes*, para aprimorar o desempenho físico de atletas. Estes esteroides estimulam processos anabólicos, inclusive o aumento da massa muscular, mas acarretam sérios problemas ao organismo, como disfunção hepática e cardíaca, impotência etc.

Bibliografia

Arnold C *et al*.: Cytochrome P450-dependent metabolism of omega-6 and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids. *Pharmacol Rep* **62** (3): 536-547, 2010.

Ghisla S: Beta-oxidation of fatty acids. A century of discovery. *Eur J Biochem* **271** (3): 459-461, 2004.

Innis SM: Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res* **30** (1): 39-103, 1991.

Kemp S *et al*.: X-linked adrenoleukodystrophy: clinical, metabolic, genetic and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta* **1822** (9): 1465-1474, 2012.

Kim JJP, Miura R: Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. *Eur J Biochem* **271**: 483-493, 2004.

Lass A *et al*.: Lipolysis — A highly regulated multienzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res* **50** (1-4): 14-27, 2011.

Lee K *et al*.: Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is a part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *J Biol Chem* **286** (29): 25655-25662, 2011.

Lieber CS: Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* **9** (1): 1-35, 2005.

Michels PA *et al*.: Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes. *Mol Membr Biol* **22** (1-2):133-145, 2005.

Russell DW: Fifty years of advances in bile acid synthesis and metabolism. *J Lipid Res* **50**: S120-S125, 2009.

Samuelsson B: Role of basic science in the development of new medicines: examples from the eicosanoid field. *J Biol Chem* **287** (13): 10070-10080, 2012.

Theodoulou FL, Eastmond PJ: Seed storage oil catabolism: a story of give and take. *Curr Opin Plant Biol* **15** (3): 322-328, 2012.

Thompson H: Superhuman athletes. *Nature* **487** (7407): 287-289, 2012.

Van Veldhoven PP: Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *J Lipid Res* **51** (10): 2863-2895, 2010.

Walther TC, Farese RV Jr: Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem* **81**: 687-714, 2012.

Wanders RJA *et al*.: Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *FEBS J* **278** (2): 182-194, 2011.

Yu HS *et al*.: Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure. *Chem Biol Interact* **188** (3): 367-375, 2010.

[1]Os sistemas de representação de duplas ligações de ácidos graxos insaturados estão descritos na Seção 6.2.1.

[2]A denominação “corpos cetônicos” é inadequada porque são compostos solúveis, e não *corpos*, e apenas um deles é uma cetona; os outros dois são ácidos fracos, desprotonados no pH fisiológico. A designação teria se originado de tradução equivocada da expressão alemã “cetonas do corpo” e foi mantida por tradição.

OceanofPDF.com

17 Metabolismo de Aminoácidos

As proteínas, como os demais compostos constituintes de um organismo, não são permanentes, estando em contínuo processo de degradação e síntese. Estima-se que, em um ser humano adulto com uma dieta adequada, haja uma renovação de cerca de 400 g de proteínas por dia. Em qualquer instante deste período, determinadas proteínas estão sendo degradadas e outras tantas estão sendo sintetizadas.

A meia-vida das proteínas apresenta uma enorme variação (Tabela 17.1), mas os mecanismos que determinam velocidades diferentes de degradação para cada proteína são apenas parcialmente conhecidos. De qualquer modo, a manutenção da concentração de uma determinada proteína é obtida pela síntese desta proteína em quantidade equivalente à de sua degradação; embora existam flutuações transitórias, a concentração proteica geral mantém-se constante no indivíduo adulto e hígido.

Como a composição de aminoácidos das proteínas varia, o conjunto de aminoácidos originados das proteínas que estão sendo degradadas não é igual àquele necessário para compor as proteínas que estão sendo sintetizadas. Os aminoácidos excedentes não podem ser armazenados — eles são oxidados e seu nitrogênio, excretado. Um indivíduo adulto saudável, com uma dieta apropriada, elimina por dia uma quantidade de nitrogênio correspondente a 100 g de proteína aproximadamente (Seção 18.1). Tendo em vista que 400 g de proteínas devem ser renovados neste período, faltam os 100 g eliminados, que devem ser repostos pela alimentação.

Os aminoácidos presentes nas células animais originam-se das proteínas exógenas (as da dieta, hidrolisadas no trato digestório) e das proteínas endógenas (hidrolisadas intracelularmente); 1/4 desse conjunto é derivado da primeira procedência e os 3/4 restantes, da segunda. O conjunto de aminoácidos é utilizado para a síntese de proteínas e de outras moléculas

que contenham nitrogênio (Figura 17.1). Com efeito, os aminoácidos são precursores de todos os compostos nitrogenados não proteicos, que incluem as bases nitrogenadas dos nucleotídios (componentes dos ácidos nucleicos e coenzimas), os lipídios (fosfolipídios e glicolipídios) e os polissacarídios (quitina e glicosaminoglicanas) que contêm nitrogênio, as aminas e seus derivados (adrenalina, noradrenalina, tiroxina, serotonina, ácido γ-aminobutírico, melatonina, histamina, carnitina, creatina, porfirinas) etc.

Tabela 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

[1]Meia-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.

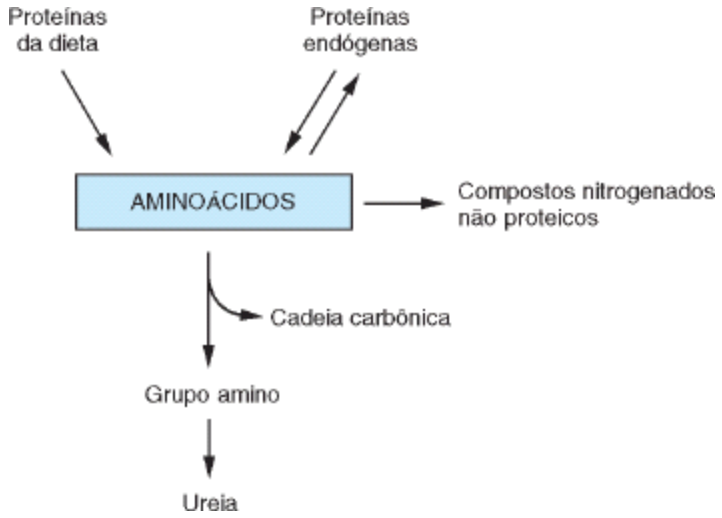


Figura 17.1 A degradação das proteínas endógenas e da dieta origina um conjunto de aminoácidos, precursores das proteínas endógenas e de todos os outros compostos nitrogenados. Os aminoácidos excedentes são degradados, restando as respectivas cadeias carbônicas e o grupo amino, que é convertido em ureia.

Os mamíferos, e a grande maioria dos seres vivos, são incapazes de armazenar aminoácidos ou proteínas[1], como tem sido reiterado neste texto. Consequentemente, satisfeitas as necessidades de síntese, os aminoácidos excedentes são oxidados. Em um indivíduo adulto saudável, com uma dieta adequada, a oxidação de aminoácidos responde por 10 a 15% das necessidades energéticas.

17.1 Degradação intracelular de proteínas

A hidrólise seletiva de proteínas exerce um papel essencial em inúmeros processos fisiológicos que são regulados pela variação da concentração de proteínas específicas: ciclo celular, transcrição gênica, resposta inflamatória e muitos outros, além de permitir controlar o nível de proteínas reguladoras no momento apropriado. Algumas proteínas devem estar presentes em apenas uma das fases do ciclo celular; outras, como as enzimas reguladoras das vias metabólicas, precisam ter suas concentrações ajustadas às variações das condições do organismo. Em alguns casos, como na regressão do tamanho do útero após o parto, o processo é extremamente acelerado.

Adicionalmente, a degradação de proteínas é essencial para que proteínas "defeituosas" sejam eliminadas e não comprometam a homeostase celular; diversas doenças, como as de Alzheimer, Parkinson etc., envolvem a formação de agregados de proteínas com conformação modificada. Alterações da estrutura proteica podem originar-se de mutações, erros no processo de síntese ou por danos sofridos no ambiente celular, causados por agentes oxidantes etc. Para manter o seu funcionamento adequado, a célula dispõe de sistemas de controle de qualidade das proteínas, que envolvem a atuação de chaperonas (Seção 2.8), que auxiliam no dobramento correto da proteína e, se isto não ocorrer, de vias de hidrólise de proteínas que asseguram a eliminação das proteínas danificadas.

A ligação com ubiquitina condena uma proteína à degradação

Há dois processos principais para a degradação proteica em células eucarióticas. O primeiro, mais restrito, é efetuado por proteases de lisossomos, as *catepsinas*, e é utilizado principalmente para a degradação de proteínas extracelulares, internalizadas por endocitose, e proteínas citosólicas de meia-vida longa.

O segundo processo, muito mais geral, ocorre no citosol e cumpre-se com a mediação de uma proteína chamada *ubiquitina*. Esta proteína, com 76 aminoácidos, está presente em todas as células eucarióticas e é altamente conservada. Para marcar a proteína destinada à degradação, várias moléculas de ubiquitina são ligadas sequencialmente à proteína, formando uma cadeia de poliubiquitina; essas reações são catalisadas por famílias de ligases e ocorrem com gasto de ATP. A proteína, então ubiquitinada, torna-se apta a interagir com um grande complexo proteolítico multienzimático, o *proteassomo*. Ele é formado por dezenas de subunidades e, à custa de ATP, é capaz de catalisar a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo praticamente qualquer aminoácido. A própria ubiquitina resiste à hidrólise, podendo participar de outros ciclos proteolíticos.

A seleção da proteína a ser degradada é obtida, em parte, a partir de sua própria estrutura primária: a meia-vida de uma proteína relaciona-se com o aminoácido (ou uma sequência de aminoácidos) presente na extremidade aminoterminal. Certos aminoácidos estabilizam as proteínas, que exibem, então, meias-vidas longas, da ordem de algumas dezenas de horas, enquanto

outros atribuem às proteínas meias-vidas de minutos. Admite-se que a identidade da extremidade aminoterminal é fundamental para o controle da estabilidade das proteínas em eucariotos.

Embora ainda bastante desconhecido, o mecanismo de identificação de proteínas alteradas é muito eficiente: a meia-vida da hemoglobina é de 120 dias, mas uma hemoglobina modificada, como a hemoglobina falciforme, tem a meia-vida reduzida para apenas 12 min.

17.2 Degradação de aminoácidos

A oxidação de aminoácidos não é efetuada por uma via única, diferentemente do que acontece com os carboidratos e os lipídios. A degradação dos carboidratos processa-se pela glicólise — algumas reações específicas transformam qualquer deles em intermediários desta via. Situação semelhante ocorre com os ácidos graxos, componentes dos triacilgliceróis: quando a cadeia carbônica não é alifática e/ou contém ramificações, reações adicionais convertem-na em compostos intermediários do ciclo de Lynen. Como os aminoácidos são constituídos por cadeias laterais com estruturas variadas, sua oxidação processa-se por vias também variadas. Há, entretanto, um padrão seguido na oxidação de todos eles: inicialmente há remoção do grupo amino e, a seguir, oxidação da cadeia carbônica remanescente. Nos mamíferos, o grupo amino é convertido a *ureia* e as 20 cadeias carbônicas resultantes são convertidas a compostos comuns ao metabolismo de carboidratos e lipídios.

17.2.1 Remoção do grupo amino dos aminoácidos

O grupo amino da maioria dos aminoácidos é coletado inicialmente como glutamato

O grupo amino de onze aminoácidos — alanina, arginina, aspartato, cisteína, fenilalanina, glutamato, 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:

Aminoácido + α-Cetoglutarato ⇋ α-Cetoácido + Glutamato

Este tipo de reação é catalisada por *aminotransferases*, também chamadas *transaminases*, enzimas presentes no citosol e na mitocôndria e que têm como coenzima *piridoxal-fosfato* (Figura 17.2). Esta coenzima participa de diversas outras reações do metabolismo de aminoácidos e é derivada da vitamina B_6 (piridoxina).

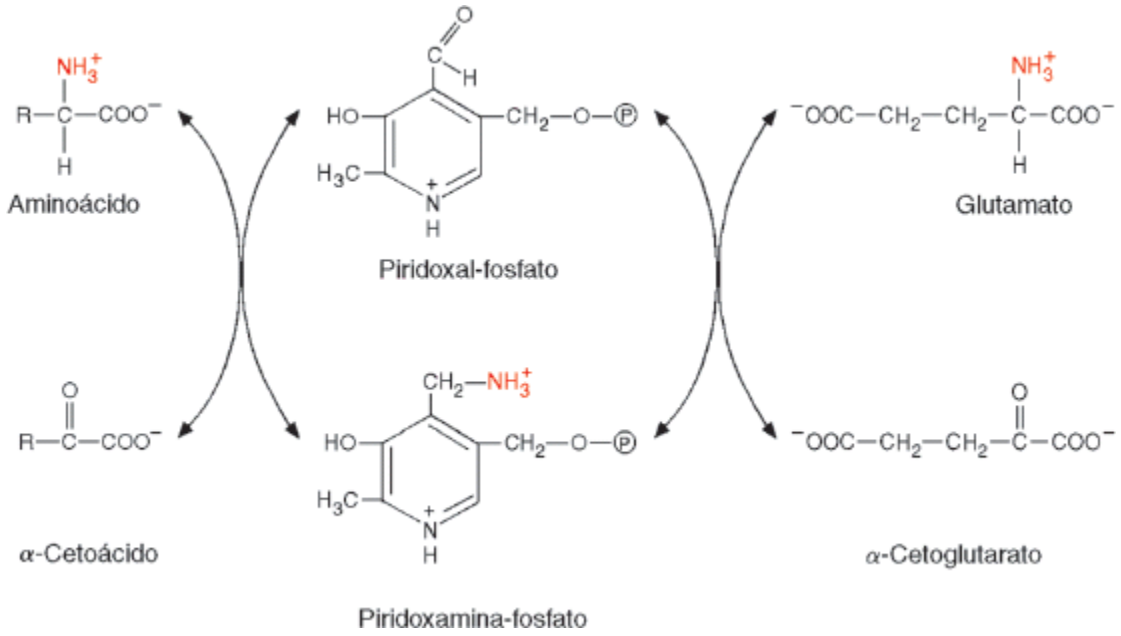
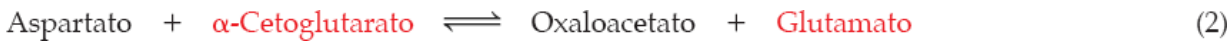


Figura 17.2 Reação geral de transaminação. Inicialmente, o grupo amino de um aminoácido é transferido ao piridoxal-fosfato, que é convertido a piridoxamina-fosfato; a seguir é doado ao a-cetoglutarato, produzindo glutamato.

As aminotransferases dos tecidos de mamíferos aceitam diferentes aminoácidos como substratos doadores de grupo amino — o nome da aminotransferase deriva do aminoácido pelo qual a enzima tem maior afinidade. Dois exemplos importantes são (1) *alanina aminotransferase*, também conhecida por *alanina transaminase* (*ALT*) ou *transaminase glutâmico-pirúvica* (*TGP*):

Alanina + α-Cetoglutarato ⇌ Piruvato + Glutamato (1)

e (2) *aspartato aminotransferase*, também chamada de *aspartato transaminase* (*AST*) ou *transaminase glutâmico-oxalacética* (*TGO*):



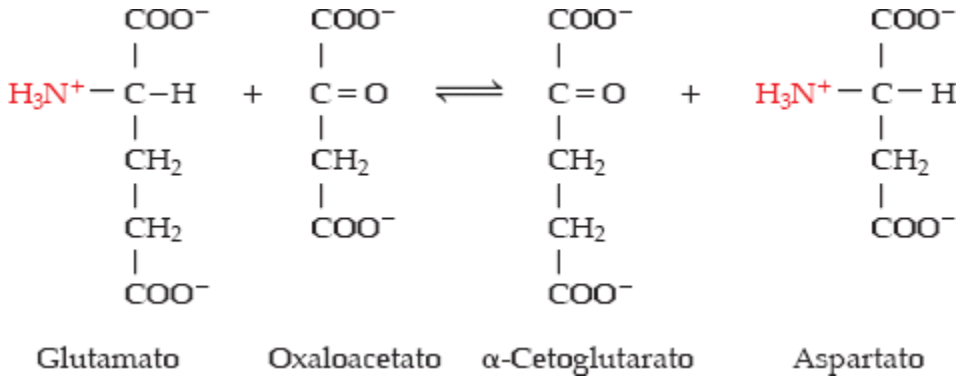
O glutamato é, portanto, um produto comum às reações de transaminação, constituindo um reservatório temporário de grupos amino, provenientes de muitos aminoácidos.

A dosagem de aminotransferases no sangue é uma importante ferramenta para diagnóstico médico. Na vigência de dano a algum órgão ou tecido (infarto do miocárdio, hepatite etc.), as enzimas extravasam das células e sua concentração no plasma aumenta (Seção 5.5 — Tabelas 5.6 e 5.7).

Em uma segunda etapa, os grupos amino originam aspartato e/ou amônia

O glutamato formado segue dois caminhos importantes: uma nova transaminação ou uma desaminação.

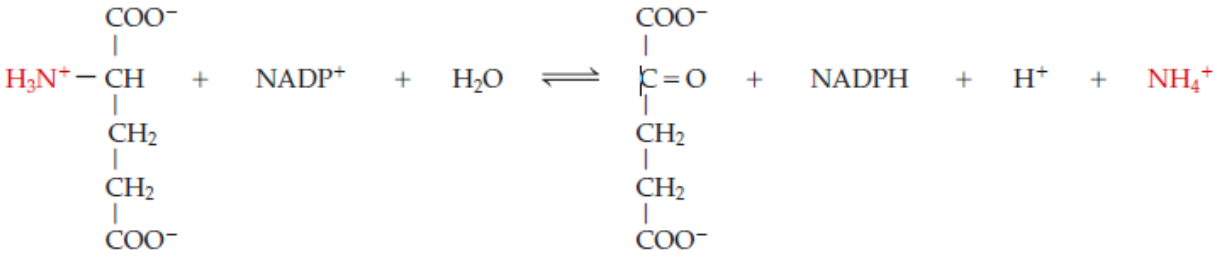
A remoção do grupo amino do próprio glutamato por transaminação é possível porque as reações catalisadas pelas aminotransferases são facilmente reversíveis, pois têm constante de equilíbrio próxima de 1. Por ação da aspartato aminotransferase, o grupo amino do glutamato é transferido para o oxaloacetato, formando aspartato, o segundo depositário do grupo amino dos aminoácidos:



A aspartato aminotransferase é a aminotransferase mais ativa na maioria dos tecidos de mamíferos, evidenciando a importância da transaminação

entre glutamato e aspartato.

A desaminação do glutamato libera seu grupo amino como NH_3 (amônia), que se converte em NH_4^+ (íon amônio) no 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. Portanto, para que o grupo amino dos aminoácidos seja liberado como NH_4^+ deve antes estar presente no glutamato.

A ação combinada das aminotransferases e da glutamato desidrogenase (Figura 17.3) resulta na convergência do grupo amino da maioria dos aminoácidos para dois compostos únicos: NH_4^+e aspartato.

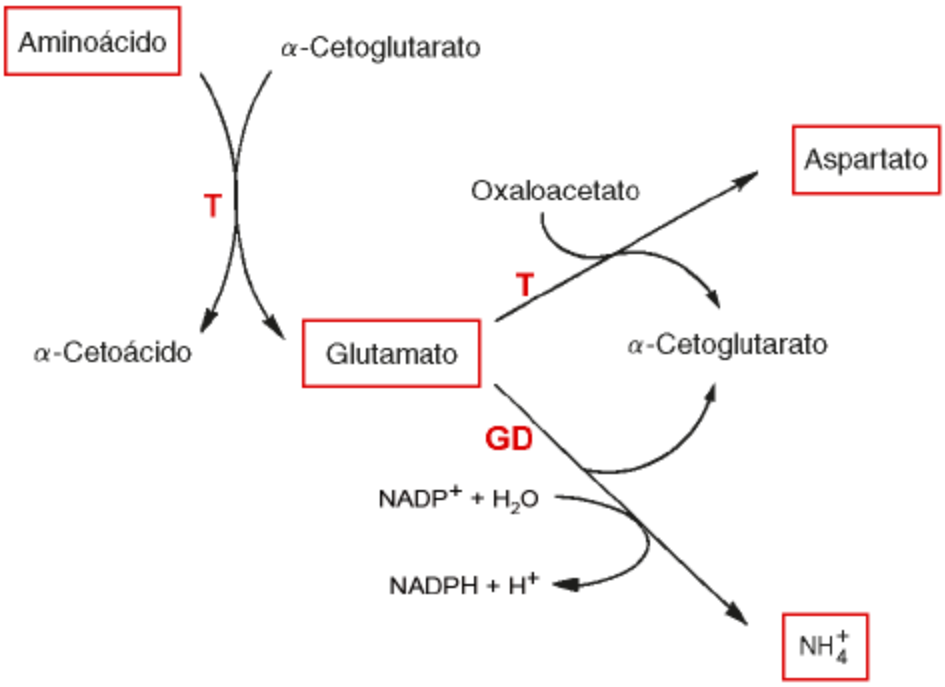


Figura 17.3 A ação conjunta das transaminases (**T**) e da glutamato desidrogenase (**GD**) permite canalizar o nitrogênio da maioria dos aminoácidos para aspartato e NH_4^+.

Alguns aminoácidos são desaminados por reações especiais

As vias de degradação de nove aminoácidos — asparagina, glicina, glutamina, histidina, lisina, metionina, prolina, serina e treonina —, ao contrário dos outros onze, não se iniciam com transaminação com α-cetoglutarato, e seu grupo amino é removido por reações particulares a cada um deles. Entretanto, um aspecto comum do metabolismo destes aminoácidos é a forma de remoção do grupo amino: ao longo das vias de degradação, o grupo amino (ou grupo amida, no caso de asparagina e glutamina) ou é liberado como NH_4^+, ou forma glutamato, que pode originar aspartato.

Desta forma, na degradação dos 20 aminoácidos, o grupo amino é convertido finalmente em NH^{4+} *e aspartato, os precursores da ureia* (Figura 17.4).

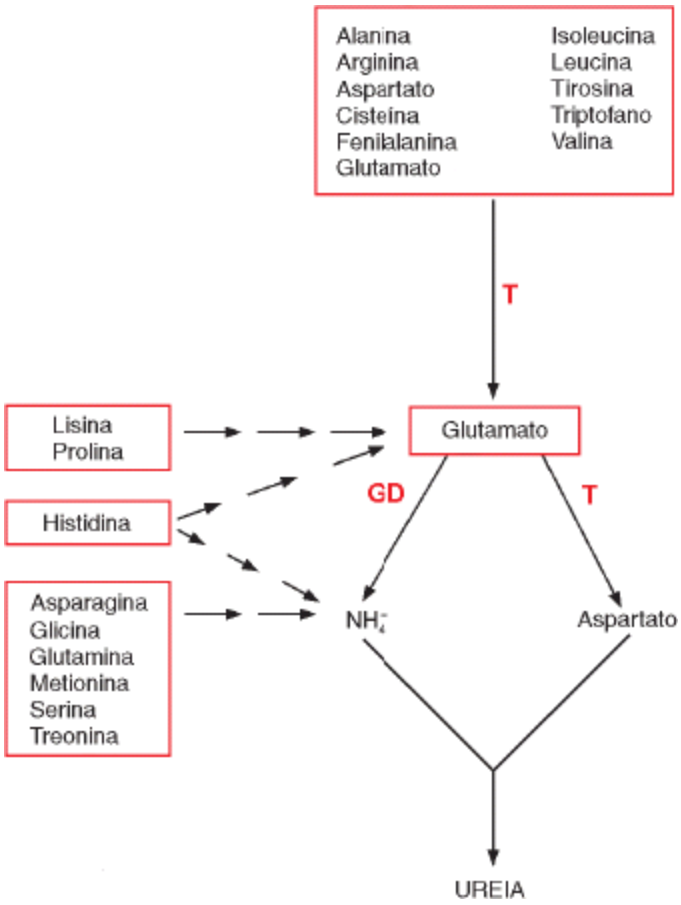


Figura 17.4 Conversão do grupo amino dos aminoácidos em ureia: o grupo amino de 11 aminoácidos é coletado, por meio de transaminases (**T**), como glutamato. Do glutamato é convertido a NH_4^+ pela glutamato desidrogenase (**GD**) ou a aspartato; outros 9 aminoácidos originam glutamato, NH_4^+ e aspartato por vias especiais. O esquema mostra o papel central do glutamato no caminho do nitrogênio dos aminoácidos até a ureia.

A ureia é sintetizada a partir de NH_4^+, aspartato e CO_2

Os dois átomos de nitrogênio presentes na ureia são provenientes de NH_4^+ e aspartato, e o átomo de carbono, de CO_2. Em mamíferos, a ureia é produzida no fígado, sendo transportada para o rim e excretada na urina.

A síntese (Figura 17.5) inicia-se na matriz mitocondrial, com a formação de carbamoil-fosfato a partir de bicarbonato e amônio, que consome duas moléculas de ATP. As reações subsequentes compõem o *ciclo da ureia* ou *ciclo de Krebs-Henseleit*. O carbamoil-fosfato, ainda na

mitocôndria, condensa-se com ornitina, originando citrulina; a citrulina é transportada para o citosol, onde reage com aspartato, formando arginino-succinato; este se decompõe em arginina e fumarato; a arginina é hidrolisada, produzindo ureia e regenerando ornitina, que retorna à mitocôndria. A analogia do ciclo da ureia com o ciclo de Krebs é evidente: a ornitina tem papel semelhante ao do oxaloacetato e o carbamoil-fosfato equivale à acetil-CoA.

A soma da reação de produção de carbamoil-fosfato com as reações do ciclo da ureia mostra a equação geral da síntese de ureia a partir de NH_4^+, aspartato e HCO_3^-:

$$\text{Aspartato} + NH_4^+ + HCO_3^- + 3\ \text{ATP} + H_2O \longrightarrow \text{Ureia} + \text{Fumarato} + 2\ \text{ADP} + 2P_i + \text{AMP} + PP_i + 4H^+$$

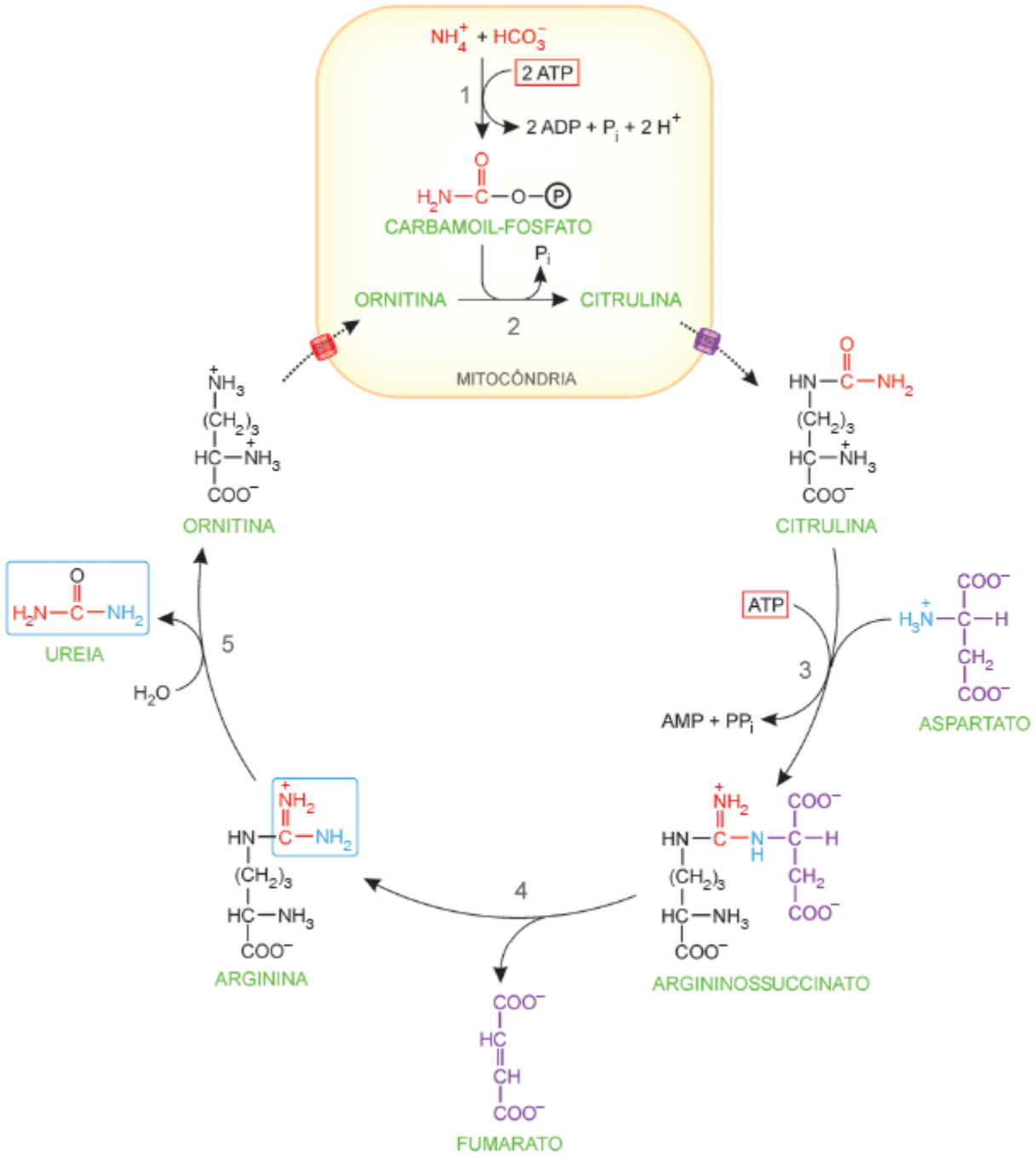


Figura 17.5 Ciclo da ureia. As enzimas envolvidas são: (1) carbamoil-fosfato sintetase I, (2) ornitina transcarbamoilase, (3) argininossuccinato sintetase, (4) argininossuccinato liase e (5) arginase. As duas primeiras enzimas são mitocondriais, e as restantes, citoplasmáticas. A migração de ornitina e citrulina entre estes compartimentos é mediada por translocases específicas (indicadas nas setas tracejadas). A enzima 1, a rigor, não faz parte do ciclo da ureia.

A síntese de uma molécula de ureia consome, portanto, quatro ligações fosfato ricas em energia, uma vez que o pirofosfato é prontamente hidrolisado. Todavia, o aspartato consumido no ciclo da ureia pode ser regenerado pelo fumarato formado nesta via. O fumarato pode ser convertido a oxaloacetato, por reações idênticas às do ciclo de Krebs, catalisadas, entretanto, por isoenzimas citosólicas. O oxaloacetato, por transamination, forma aspartato (Figura 17.6). Este acoplamento inclui a produção de 1 NADH, na reação da malato desidrogenase, a partir do qual são sintetizados 3 ATP na fosforilação oxidativa. Assim, no cômputo geral há gasto de apenas uma ligação rica em energia para a síntese de ureia.

A regulação do ciclo da ureia está descrita no Capítulo 20.

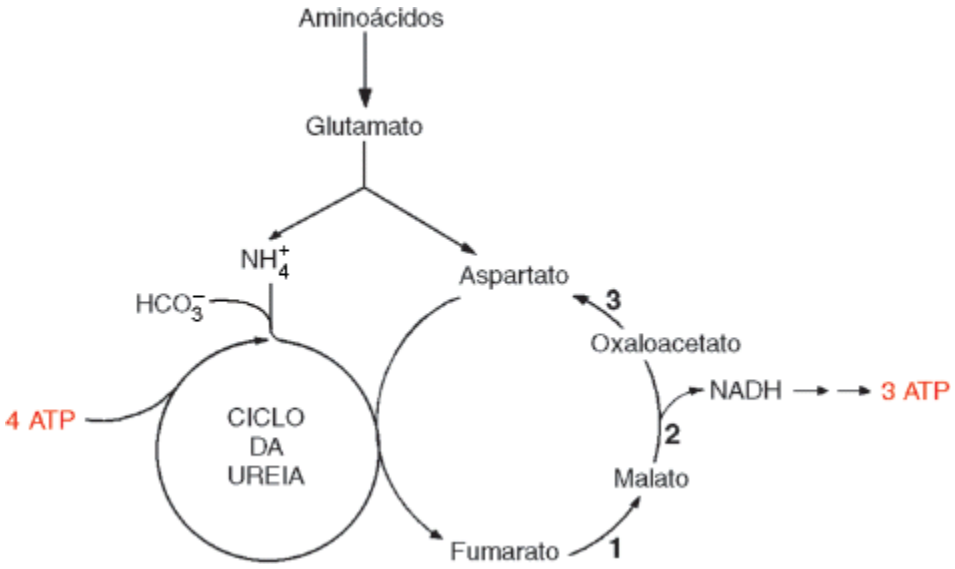


Figura 17.6 Esquema geral da síntese de ureia, mostrando o balanço energético do processo. A regeneração do aspartato a partir de fumarato formado no ciclo da ureia envolve a participação das seguintes enzimas citosólicas: (1) fumarase, (2) malato desidrogenase e (3) transaminase; forma-se um NADH que produz 3 ATP pela fosforilação oxidativa, reduzindo a energia consumida na síntese da ureia.

A ureia é o principal produto de excreção do metabolismo nitrogenado de mamíferos terrestres; aves e répteis excretam ácido úrico, e peixes, amônia. A quantidade de ureia excretada por um ser humano adulto com dieta equilibrada é cerca de 30 g por dia. Este valor aumenta

proporcionalmente ao aumento da quantidade de proteína ingerida, já que não há reserva de proteínas e todo o nitrogênio excedente será transformado em ureia.

Nos seres humanos, 90% do nitrogênio urinário estão sob a forma de ureia. O restante (Tabela 17.2) aparece sob a forma de creatinina (resultante da degradação de creatina), urato (proveniente da degradação de purinas) e íon amônio. Apesar de NH_4^+ representar uma pequena porcentagem do nitrogênio urinário, sua excreção equivale à eliminação de H^+, contribuindo de maneira decisiva para a manutenção do pH plasmático. A produção de amônia e sua excreção como NH_4^+ na urina possibilita a eliminação de ácidos fortes, como o ácido sulfúrico gerado no catabolismo de cisteína e metionina ou de cetoácidos, cuja concentração aumenta muito na acidose metabólica; na alcalose, o teor de NH_4^+ da urina diminui.

Tabela 17.2 Compostos nitrogenados excretados por um homem adulto.

Composto	Quantidade excretada (g/dia)
Ureia	30
NH_4[1]	0,7
Creatinina	1,4
Urato	0,8

A amônia é tóxica para os tecidos animais

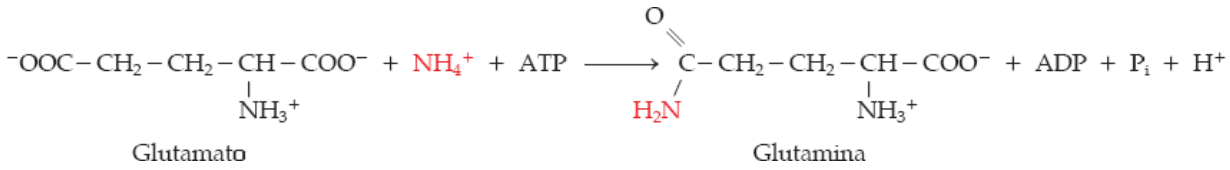
A conversão da maior parte do NH_4^+ em ureia é fundamental para manter baixas as concentrações deste íon no organismo animal. Quando há restrição na formação de ureia, a concentração plasmática de NH_4^+ se eleva no sangue e nos tecidos (*hiperamonemia*). É o que acontece nos defeitos hereditários do ciclo da ureia (Seção 17.3) e na insuficiência hepática grave, que pode ser causada por hepatite ou cirrose — a hiperamonemia ocasiona uma encefalopatia que pode resultar em coma, e morte. O mecanismo preciso da notável toxicidade da amônia é obscuro. Postula-se que o NH_4^+em excesso reagiria com α-cetoglutarato formando glutamato, na

reação catalisada pela glutamato desidrogenase (Seção 17.2.1); o glutamato reagiria com NH_4^+, formando glutamina, por ação da glutamina sintetase (descrita a seguir). As duas enzimas são abundantes no cérebro e o acúmulo de glutamina resultaria em edema por efeito osmótico, aumento da pressão intracraniana e hipóxia cerebral. Ainda mais, o grande consumo de α-cetoglutarato resultaria em depleção desse intermediário do ciclo de Krebs, com redução da velocidade de oxidação da glicose, a principal fonte de ATP para o cérebro. A hiperamonemia comprometeria também a transmissão do impulso nervoso, por interferir no funcionamento de neurotransmissores e seus receptores.

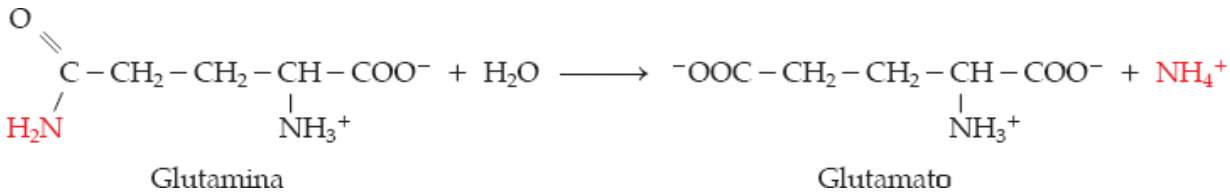
Glutamina e alanina são os transportadores de amônia para o fígado

Devido à sua toxicidade e por ser convertido em ureia no fígado, o NH_4^+ produzido nos outros tecidos deve ser incorporado em compostos não tóxicos e que atravessem membranas com facilidade, e assim ser levado àquele órgão — estes compostos são os próprios aminoácidos. De fato, as principais formas de transporte são glutamina e alanina.

A glutamina é sintetizada a partir de NH_4^+, glutamato e ATP, em uma reação catalisada pela *glutamina sintetase*:



Uma vez no fígado, o grupo amida da glutamina é hidrolisado pela *glutaminase*, liberando NH_4^+, que pode ser consumido pelo ciclo da ureia.



O rim também expressa glutaminase — a presença desta enzima permite a produção da amônia urinária, desempenhando um papel fundamental no equilíbrio ácido-base.

No caso do transporte como alanina, o grupo amino dos aminoácidos é doado para piruvato por transaminação. A alanina, no fígado, é convertida em glutamato. O glutamato pode originar os dois átomos de nitrogênio da ureia (Figura 17.4).

17.2.2 Degradação da cadeia carbônica dos aminoácidos

A cadeia carbônica dos aminoácidos é degradada a piruvato, acetil-CoA ou intermediários do ciclo de Krebs

Removido o grupo amino do aminoácido, resta sua cadeia carbônica, na forma de α-cetoácido. As vinte cadeias carbônicas diferentes são oxidadas por vias próprias que, todavia, convergem para a produção de apenas alguns compostos: *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.

Todos os aminoácidos, com exceção de leucina e lisina, produzem piruvato ou intermediários do ciclo de Krebs, precursores da gliconeogênese, e são, por isto, chamados *glicogênicos*. Leucina e lisina originam acetoacetato e acetil-CoA, sendo aminoácidos *cetogênicos*. Outros aminoácidos — isoleucina, fenilalanina, tirosina, treonina e triptofano — têm parte de sua cadeia carbônica convertida em acetoacetato ou acetil-coA e parte convertida a intermediários do ciclo de Krebs. São tanto glicogênicos quanto cetogênicos, isto é, são *glicocetogênicos*.

Para sistematizar o estudo de sua degradação, os aminoácidos serão reunidos em seis grupos (Figura 17.7), segundo o principal produto formado:

1. piruvato
2. oxaloacetato
3. fumarato

4. succinil-CoA
5. α-cetoglutarato
6. acetil-CoA

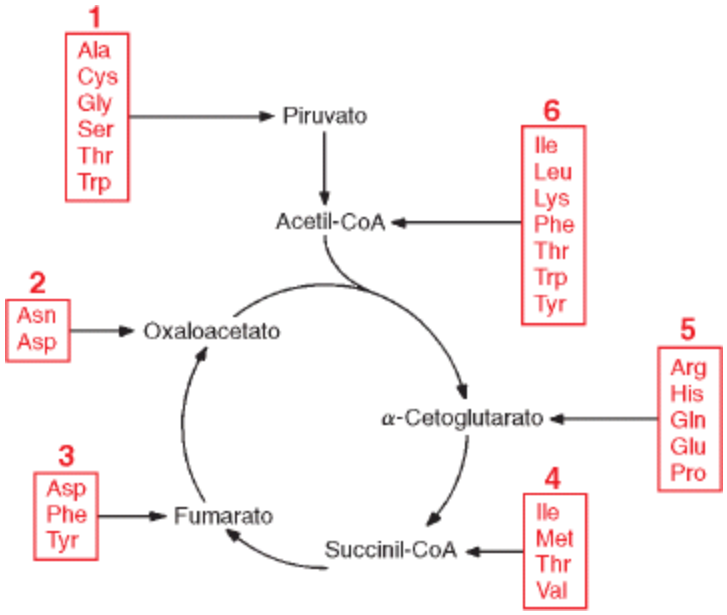


Figura 17.7 Destino da cadeia carbônica dos aminoácidos, que foram reunidos em seis grupos (1 a 6), de acordo com o composto formado.

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 Figura 17.8, referente ao Grupo 1.

Grupo 1. Aminoácidos que são convertidos a piruvato (Figura 17.8): Alanina, Cisteína, Glicina, Serina, Treonina e Triptofano

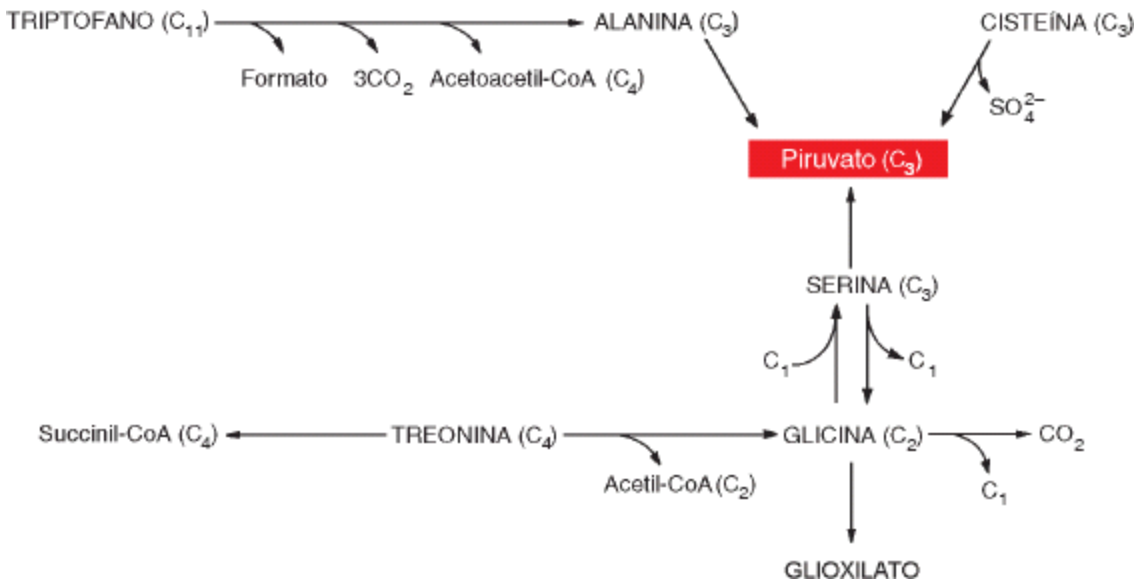


Figura 17.8 Esquema da degradação do Grupo 1 de aminoácidos, convergindo para a produção de piruvato. C_1 representa a unidade de um carbono (grupo metileno) incorporado ao tetraidrofolato (Figura 17.10 b).

Alanina. Forma diretamente piruvato por transaminação com α-cetoglutarato, catalisada pela alanina transaminase.

Cisteína. Nos seres humanos, há duas vias principais que a convertem a piruvato (Figura 17.9) e o átomo de enxofre, a sulfato. O sulfato resulta da oxidação de sulfito, a etapa final da degradação dos aminoácidos que contêm enxofre, cisteína e metionina. A reação é catalisada pela *sulfito oxidase*, uma enzima presente no espaço intermembranas da mitocôndria, que contém molibdênio e um grupo heme b_5. Os elétrons derivados da oxidação do sulfito são transferidos para o citocromo *c* no espaço intermembranas da mitocôndria. A deficiência genética de sulfito oxidase acarreta distúrbios neurológicos graves e, geralmente, ocasiona morte nos dois primeiros anos de vida.

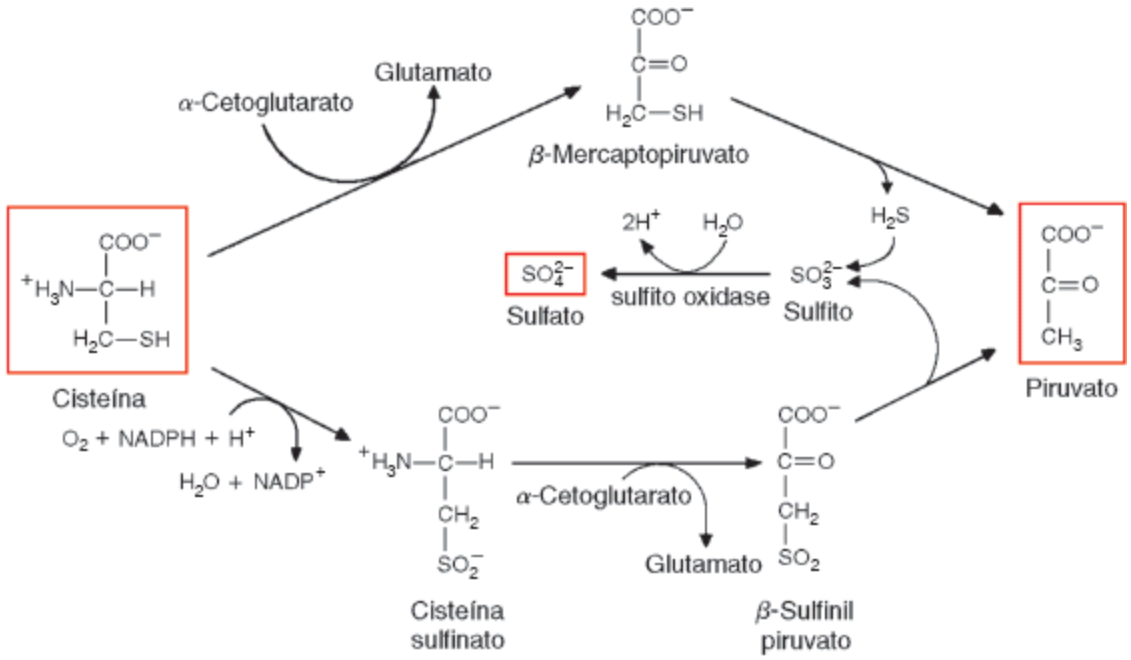


Figura 17.9 A cisteína é convertida a piruvato por duas vias, com produção de sulfato.

Serina. Origina piruvato por desaminação, precedida por desidratação, catalisada pela *serina desidratase* (Figura 17.10 a). Também pode formar glicina, graças à transferência de um grupo metileno (C_1) ao *tetraidrofolato* (FH_4). O tetraidrofolato é uma coenzima transportadora de unidades monocarbônicas (grupo metileno, formil etc.), característica do metabolismo de aminoácidos e de nucleotídios. FH_4 é a forma reduzida da vitamina B_9, o ácido fólico, que apresenta, em sua estrutura, três componentes: 6-metilpterina, *p*-aminobenzoato (PABA) e glutamato (Figura 17.10 b). A reação de conversão a glicina é promovida pela *serina hidroximetil transferase*. Nas duas reações, há participação de piridoxal-fosfato.

Glicina. Apresenta três vias de degradação (Figura 17.10 a). Forma piruvato por prévia conversão a serina; pode ser oxidada a CO_2, NH_4^+ e um grupo metileno, que é transferido ao FH_4 e, ainda, ser desaminada oxidativamente, a glioxilato. Esta última conversão tem importância clínica: o glioxilato pode ser oxidado a oxalato, que forma precipitados de cálcio nos túbulos renais, originando os cálculos (“pedras”) renais — a maior

parte (70%) dos cálculos renais são compostos por oxalato de cálcio Adicionalmente, o glioxilato pode reagir com alanina e formar glicina e piruvato, por ação da *alanina:glioxilato aminotransferase*, que ocorre em peroxissomos de hepatócitos. A falta desta enzima ocasiona a *hiperoxalúria primária tipo I*, doença hereditária rara, caracterizada por produção exacerbada de oxalato de cálcio, que se deposita nos rins e trato urinário, causando insuficiência renal e consequente acúmulo de oxalato em todos os tecidos.

A ingestão de grandes quantidades de *ascorbato (vitamina C)* pode também ocasionar a formação de cálculos de oxalato de cálcio.

Treonina. Em uma das vias de degradação possíveis, o carbono β é oxidado e a cadeia carbônica é cindida, produzindo glicina e acetaldeído; o acetaldeído gera acetil-CoA (Figura 17.11). A outra via de degradação, a principal no organismo humano, origina succinil-CoA e, por isto, a treonina também está incluída no Grupo 4 (Figura 17.16).

Triptofano. Na degradação, transforma-se em piruvato (via alanina), formato, CO_2 e acetoacetil-CoA (Grupo 6, Figura 17.22).

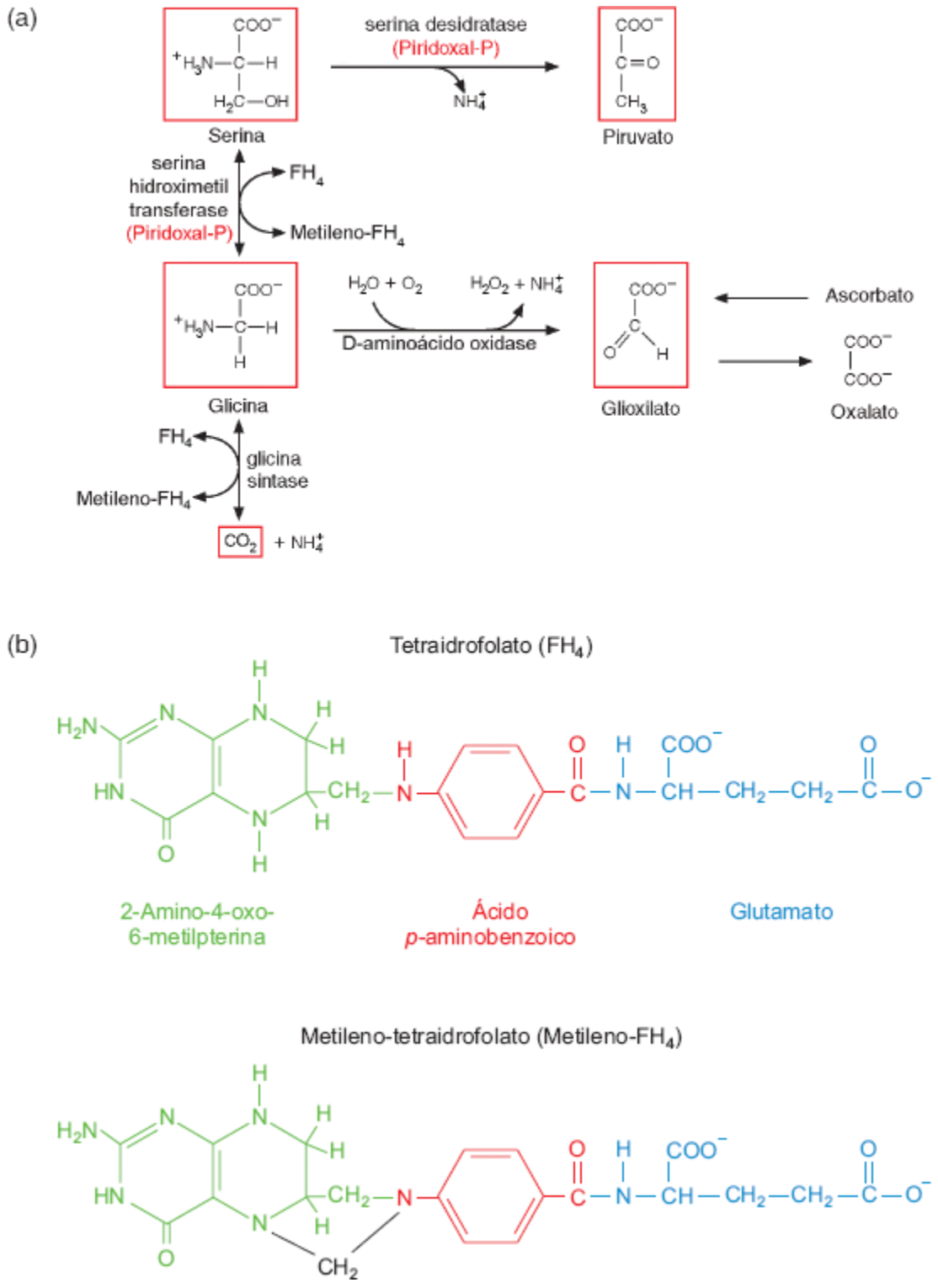


Figura 17.10 a) Vias de degradação de serina e glicina. FH_4: tetraidrofolato; Metileno-FH_4: metileno-tetraidrofolato. b) Estruturas do tetraidrofolato (FH_4) e do metileno-tetraidrofolato (Metileno-FH_4).

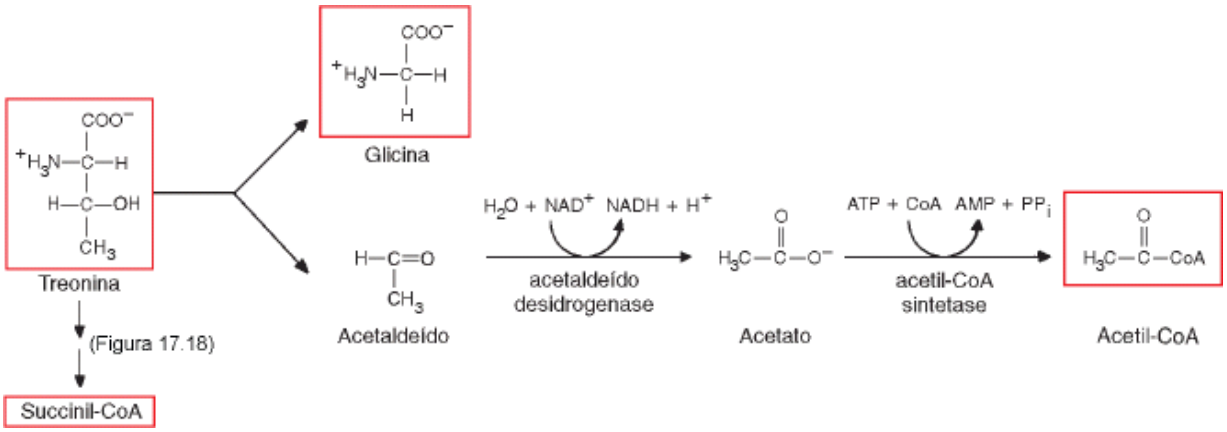


Figura 17.11 Uma das vias de degradação de treonina, que produz glicina e acetil-CoA; a outra, que produz succinil-CoA, está mostrada na Figura 17.18.

Grupo 2. Aminoácidos que são convertidos a oxaloacetato (Figura 17.12): Asparagina e Aspartato

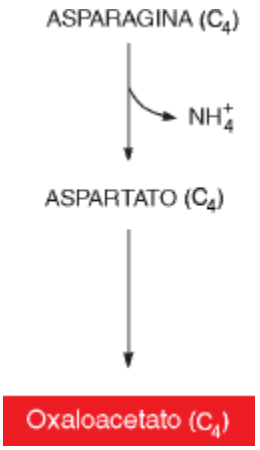


Figura 17.12 Esquema da conversão do Grupo 2 de aminoácidos a oxaloacetato.

Asparagina. Por hidrólise, forma aspartato e NH_4^+ (Figura 17.13).

Aspartato. Convertido a oxaloacetato por ação da aspartato transaminase (Figura 17.13); forma também fumarato (Grupo 3).

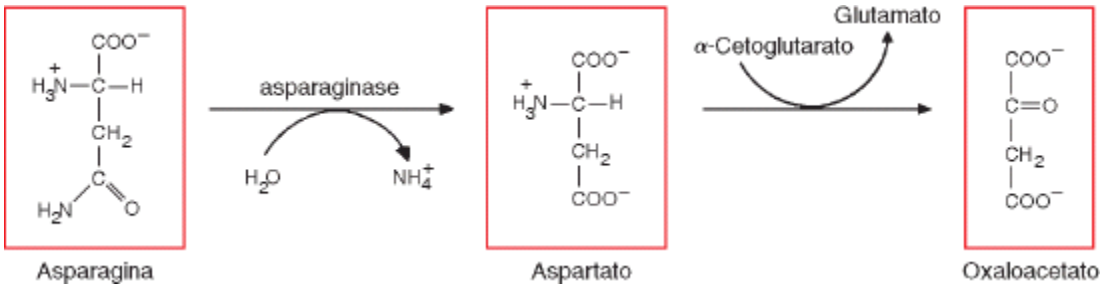


Figura 17.13 Conversão de asparagina a aspartato, que produz oxaloacetato por transaminação.

Grupo 3. Aminoácidos que são convertidos a fumarato (Figura 17.14):Aspartato, Fenilalanina e Tirosina

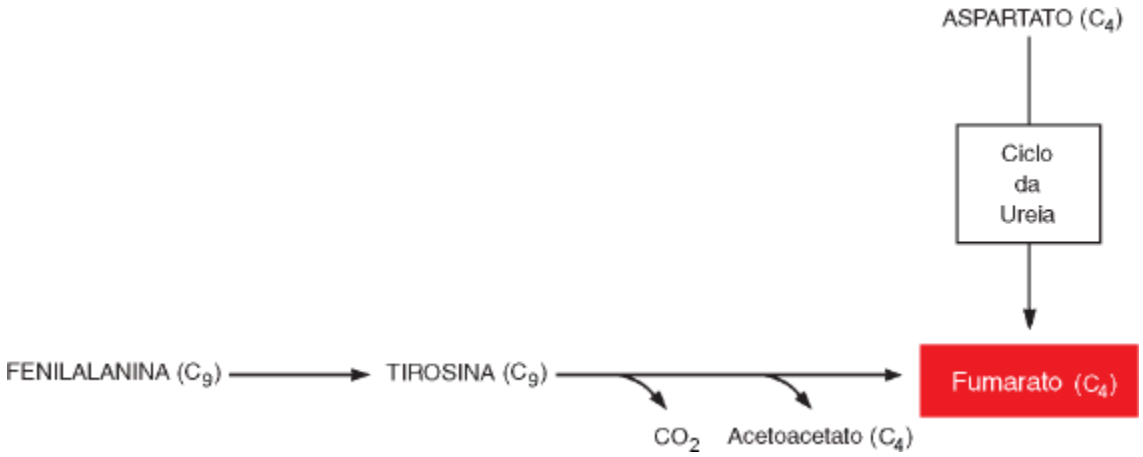


Figura 17.14 Esquema da conversão do Grupo 3 de aminoácidos a fumarato.

Aspartato. É um dos substratos do ciclo da ureia, onde é convertido a fumarato (Figura 17.5).

Fenilalanina. Produz tirosina por uma oxidação irreversível, detalhada à Seção 17.3 (Figura 17.23), catalisada por *fenilalanina hidroxilase*.

Tirosina. Os nove carbonos da tirosina aparecem como fumarato, acetoacetato e CO_2 (Figura 17.15). Como o acetoacetato origina acetil-CoA, tirosina e fenilalanina também fazem parte do Grupo 6 (Figura 17.21). Os

dois aminoácidos são precursores das catecolaminas (Seção 19.6.1), dos hormônios tireoidianos (tiroxina, tri-iodotironina) e da melanina.

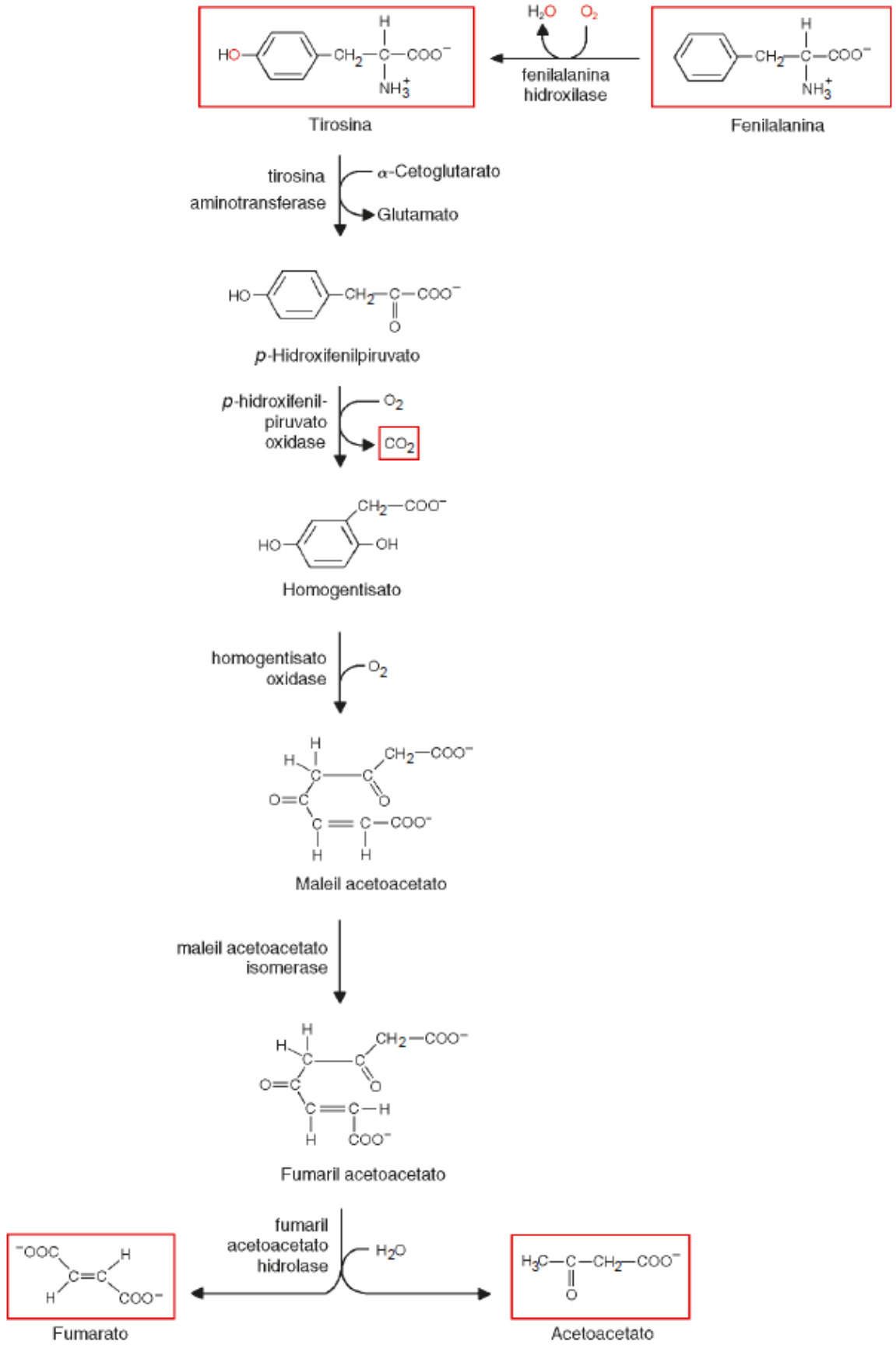

Tirosina
H_2O O_2
fenilalanina hidroxilase
Fenilalanina
tirosina aminotransferase
α-Cetoglutarato
Glutamato
p-Hidroxifenilpiruvato
p-hidroxifenil-piruvato oxidase
O_2
CO_2
Homogentisato
homogentisato oxidase
O_2
Maleil acetoacetato
maleil acetoacetato isomerase
Fumaril acetoacetato
fumaril acetoacetato hidrolase
H_2O
Fumarato
Acetoacetato

Figura 17.15 Via de degradação de fenilalanina e tirosina. A reação da fenilalanina hidroxilase está detalhada na Figura 17.23.

Grupo 4. Aminoácidos que são convertidos a succinil-CoA (Figura 17.16):Isoleucina, Valina, Metionina e Treonina

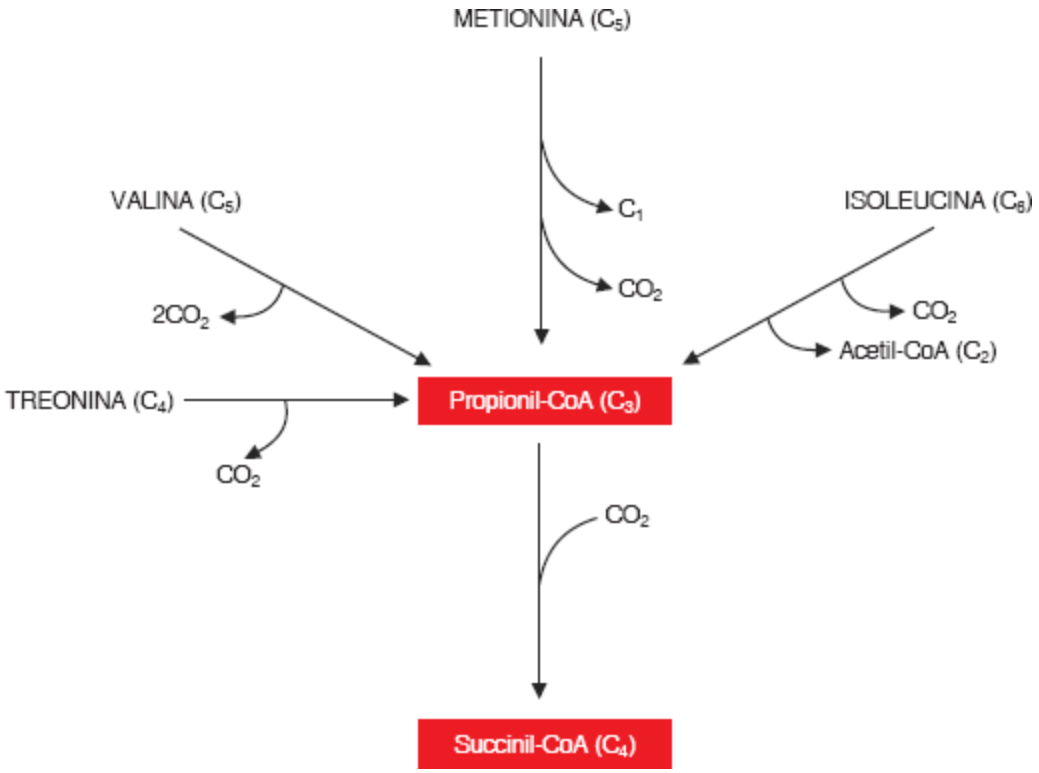


Figura 17.16 Esquema da conversão do Grupo 4 de aminoácidos a succinil-CoA.

Os aminoácidos deste grupo formam succinil-CoA por prévia conversão a propionil-CoA, como acontece na oxidação de ácidos graxos com número ímpar de carbonos (Seção 16.2.2). Esta transformação inclui uma carboxilação que utiliza biotina e uma isomerização que requer a coenzima B_{12} (Figura 16.5).

Isoleucina e valina. Estes dois aminoácidos, conjuntamente com a *leucina*, são chamados de *aminoácidos ramificados*, devido à estrutura de suas cadeias laterais. Por esta razão e porque os três aminoácidos são

degradados por vias semelhantes, leucina está incluída na Figura 17.17. *Isoleucina* forma succinil-CoA e acetil-CoA, e *valina* produz succinil-CoA; *leucina*, por produzir acetil-CoA e acetoacetato, faz parte do Grupo 6.

O catabolismo dos três aminoácidos inicia-se com uma transaminação catalisada por uma enzima única, a *transaminase de α-cetoácidos ramificados*, formando os respectivos α-cetoácidos ramificados (Figura 17.17). Estes são descarboxilados oxidativamente pela *desidrogenase de α-cetoácidos ramificados*, um complexo enzimático semelhante à piruvato desidrogenase, que também utiliza tiamina pirofosfato, ácido lipoico, coenzima A, NAD^+ e FAD; resultam as respectivas acil-CoA ramificadas com um carbono a menos. 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; nos dois casos, propionil-CoA origina succinil-CoA (Figura 17.17).

O catabolismo de aminoácidos ramificados, diferentemente da maioria dos aminoácidos, não ocorre no fígado, que não dispõe da transaminase de α-cetoácidos ramificados; acontece em músculos esqueléticos, onde a concentração da enzima é elevada, e tem grande importância no jejum (Seção 21.3).

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. O átomo de enxofre é doado para a serina, formando cisteína, o outro único aminoácido que contém enxofre (Figura 17.18).

Treonina. A principal via de degradação no organismo humano inicia-se, como no caso da serina, com a remoção do grupo amino pela treonina desidratase, que utiliza piridoxal-fosfato, e produz α-cetobutirato como a metionina (Figura 17.18). Treonina pode formar glicina e acetil-CoA, pertencendo também aos Grupos 1 e 4.

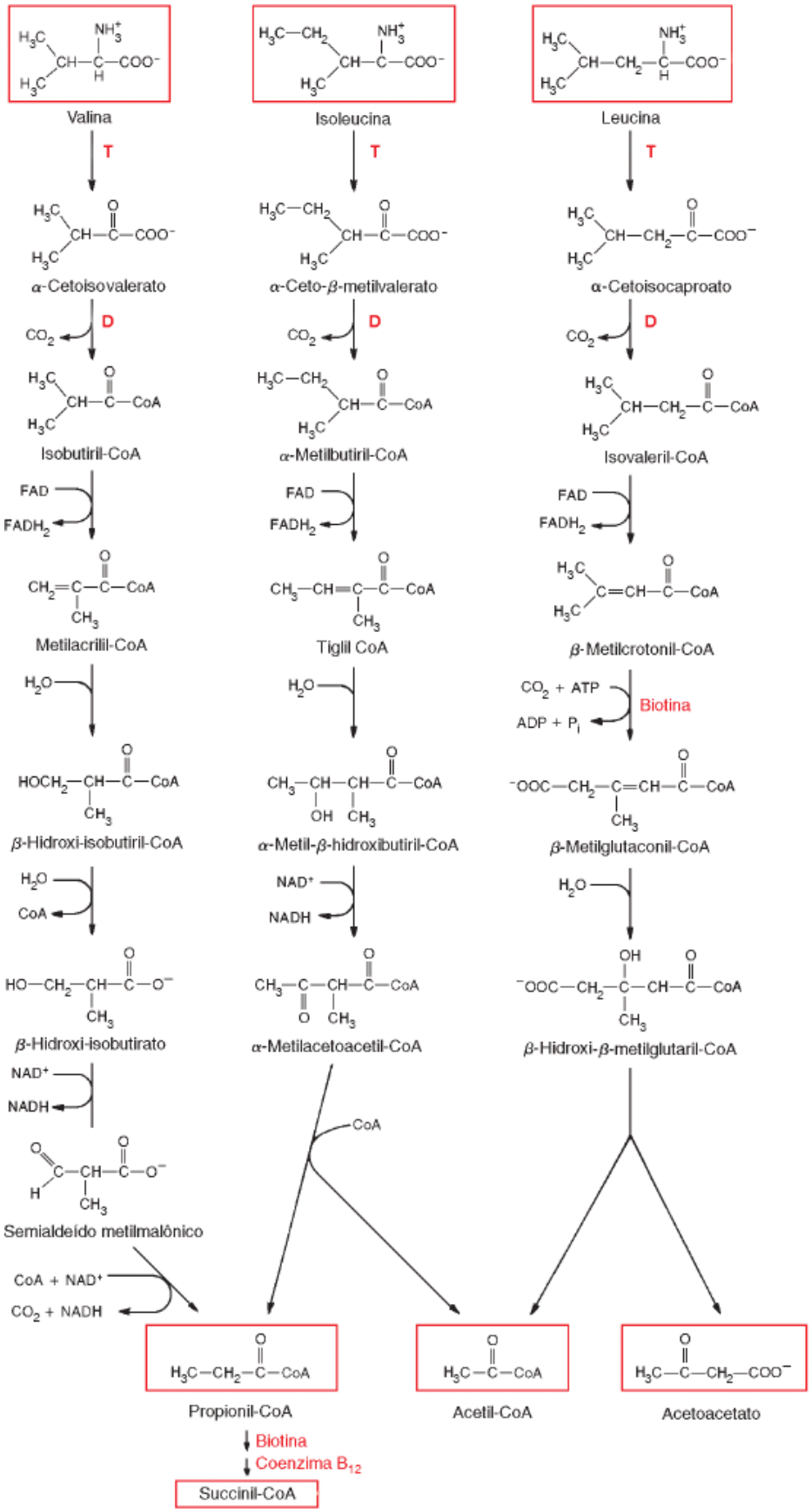

Valina
Isoleucina
Leucina
T
α-Cetoisovalerato
α-Ceto-β-metilvalerato
α-Cetoisocaproato
D
Isobutiril-CoA
α-Metilbutiril-CoA
Isovaleril-CoA
FAD
FADH2
Metilacrilil-CoA
Tiglil CoA
β-Metilcrotonil-CoA
H2O
CO2 + ATP
ADP + Pi
Biotina
β-Hidroxi-isobutiril-CoA
α-Metil-β-hidroxibutiril-CoA
β-Metilglutaconil-CoA
CoA
NAD+
NADH
β-Hidroxi-isobutirato
α-Metilacetoacetil-CoA
β-Hidroxi-β-metilglutaril-CoA
Semialdeído metilmalônico
CoA + NAD+
CO2 + NADH
Propionil-CoA
Acetil-CoA
Acetoacetato
Biotina
Coenzima B12
Succinil-CoA

Figura 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- etoácidos ramificados (**D**).

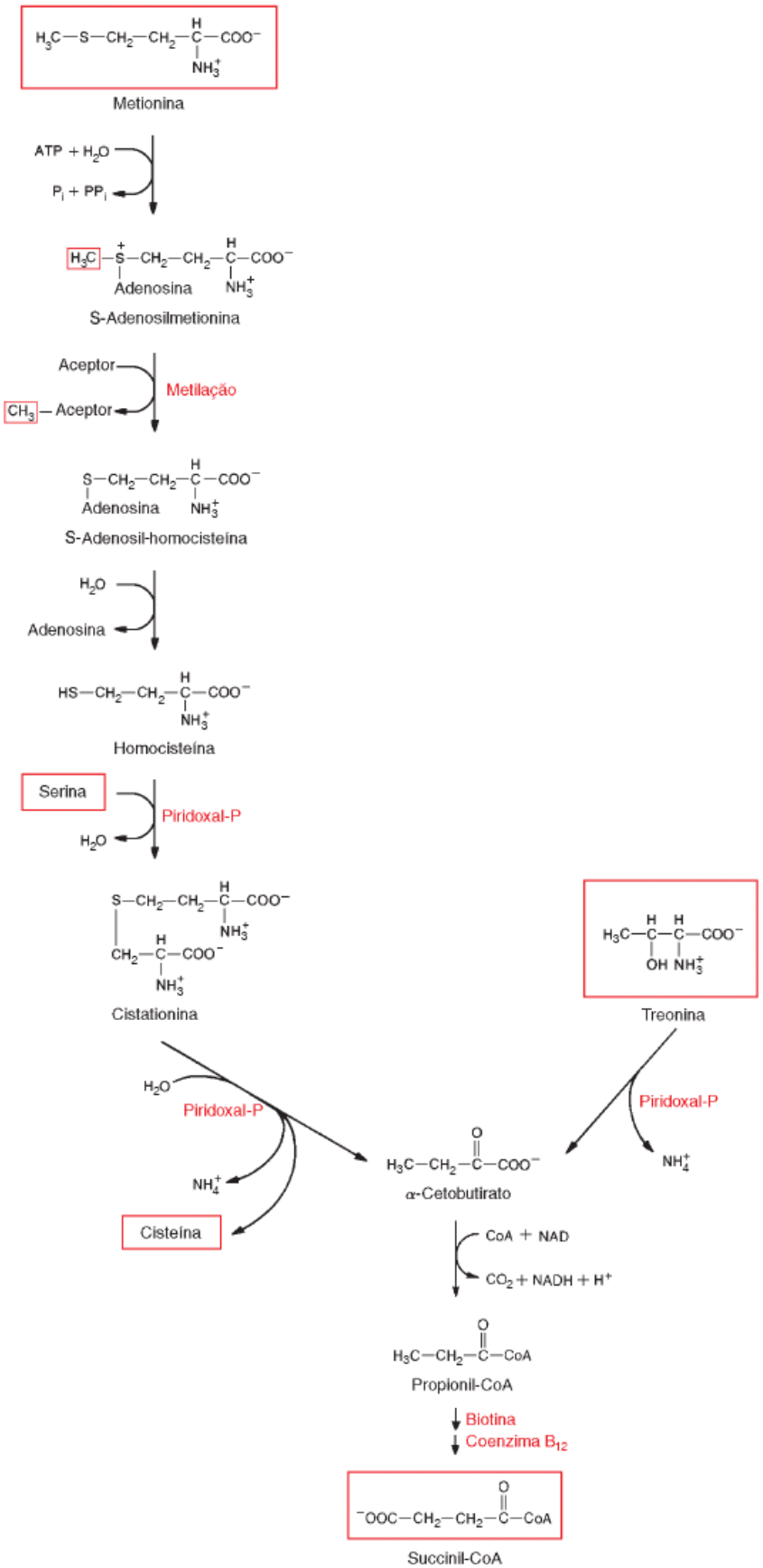

Metionina
ATP + H2O
Pi + PPi
Adenosina
S-Adenosilmetionina
Aceptor
CH3 — Aceptor
Metilação
Adenosina
S-Adenosil-homocisteína
H2O
Adenosina
Homocisteína
Serina
H2O
Piridoxal-P
Cistationina
Treonina
H2O
Piridoxal-P
NH4+
Cisteína
Piridoxal-P
NH4+
α-Cetobutirato
CoA + NAD
CO2 + NADH + H+
Propionil-CoA
Biotina
Coenzima B12
Succinil-CoA

Figura 17.18 Vias de degradação da metionina e treonina, produzindo succinil-CoA. A outra via de degradação de treonina está mostrada na Figura 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 a-cetoglutarato (Figura 17.19):Glutamato, Glutamina, Prolina, Arginina e Histidina

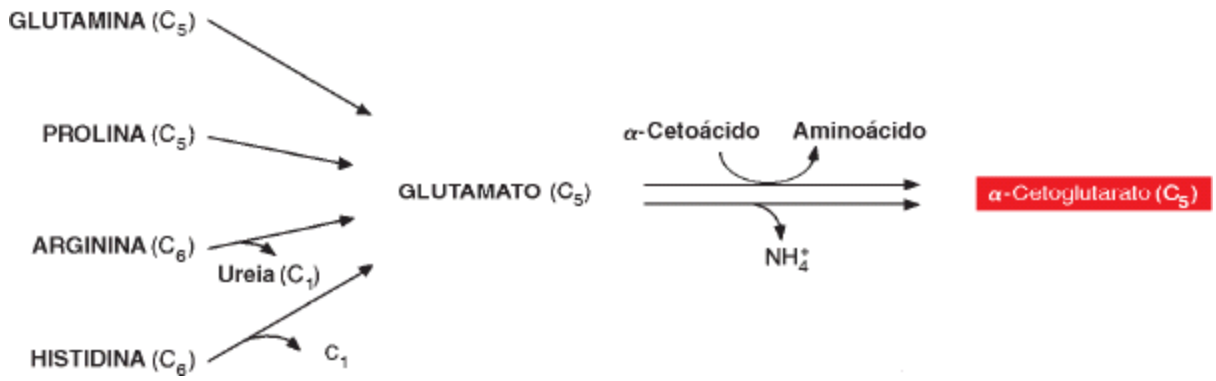


Figura 17.19 Esquema da conversão do Grupo 5 de aminoácidos a α-cetoglutarato, via glutamato. C_1 = unidade monocarbônica transferida a FH_4.

Os aminoácidos deste grupo originam α-cetoglutarato por prévia conversão a glutamato (Figura 17.20).

Glutamato. Converte-se em α-cetoglutarato por transaminação ou por desaminação oxidativa catalisada pela glutamato desidrogenase.

Glutamina. O grupo amino é liberado por ação da glutaminase, formando glutamato.

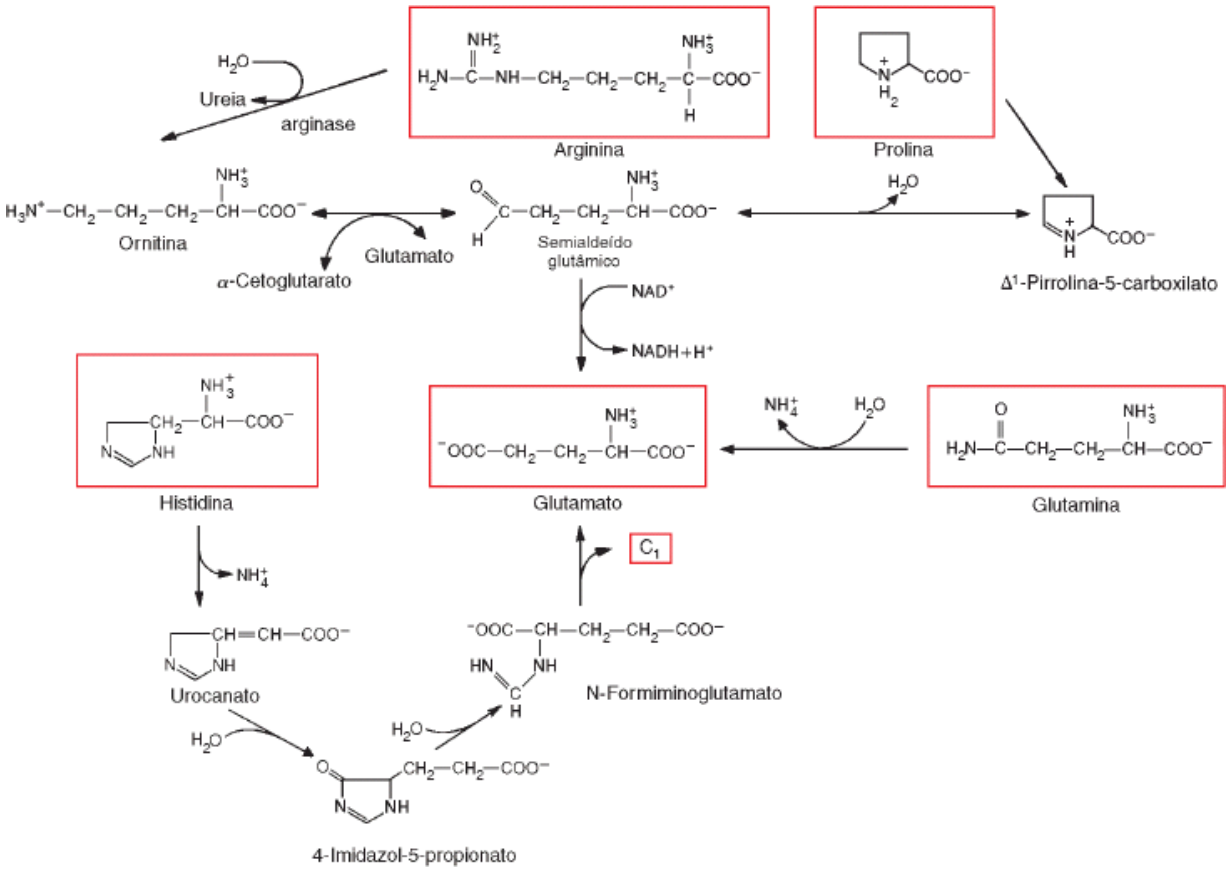


Figura 17.20 Reações que convertem arginina, prolina, histidina e glutamina a glutamato. C_1 representa a unidade de um carbono incorporado ao tetraidrofolato (FH_4).

Prolina. Todos os átomos de carbono da prolina aparecem como glutamato.

Arginina. Ao ser hidrolisada pela arginase no ciclo da ureia, um dos carbonos aparece na ureia e os outros passam a constituir ornitina, que origina glutamato.

As vias de degradação de prolina e arginina convergem para um intermediário comum, o semialdeído glutâmico, que é oxidado a glutamato.

Histidina. Cinco carbonos produzem glutamato e um carbono é transferido ao tetraidrofolato.

Grupo 6. Aminoácidos que são convertidos a acetil-CoA (Figura 17.21):Fenilalanina, Tirosina, Triptofano, Lisina, Isoleucina, Treonina e Leucina

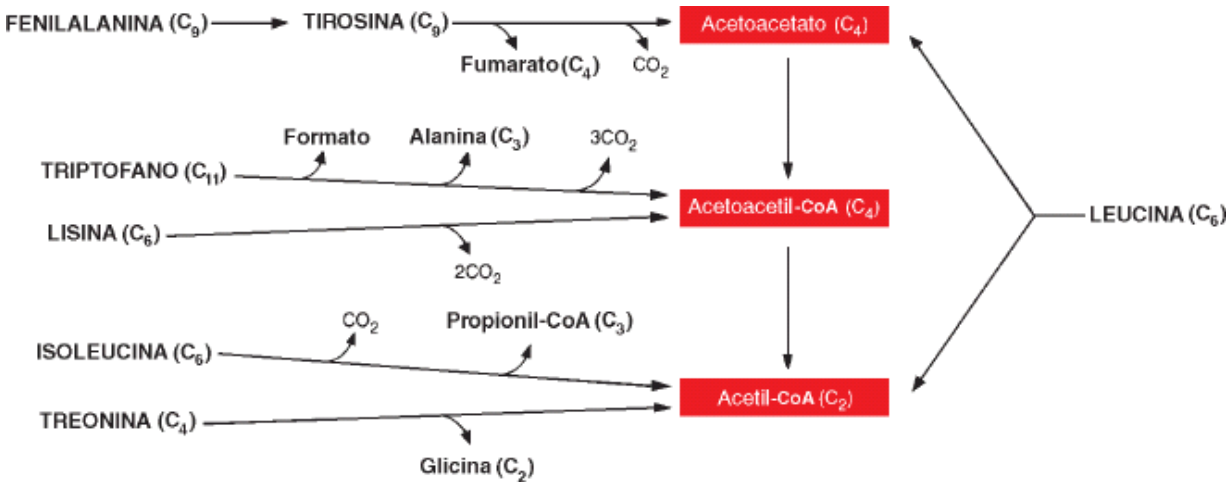


Figura 17.21 Esquema geral da degradação do Grupo 6 de aminoácidos a acetil-CoA.

A formação de acetil-CoA pode ser direta ou indireta (via acetoacetato ou acetoacetil-CoA). Os aminoácidos que produzem acetil-CoA, com exceção de leucina, produzem também compostos precursores de glicose: são os aminoácidos *glicocetogênicos*. Assim, quatro dos carbonos de fenilalanina e tirosina são convertidos a fumarato (Grupo 3), três do triptofano a alanina (Grupo 1) e três da isoleucina e da treonina a succinil-CoA (Grupo 4). Segue-se a descrição da conversão de triptofano, lisina e leucina a acetil-CoA.

Triptofano. Produz acetoacetil-CoA por uma via (Figura 17.22) que inclui três reações com oxigênio: duas são catalisadas por *dioxigenases* e uma por *mono-oxigenase*. As *mono-oxigenases*, também chamadas de *hidroxilases*, catalisam a incorporação de um átomo de oxigênio ao substrato, como hidroxila, e a redução do outro a H_2O, como detalhado para a fenilalanina hidroxilase na Figura 17.23. As *dioxigenases*, por sua vez, incorporam os dois átomos de oxigênio no substrato, promovendo a cisão de anéis aromáticos em geral.

Um dos intermediários da via de catabolismo do triptofano é precursor de *ácido nicotínico* (vitamina B_3); esta síntese supre parte da necessidade desta vitamina. O triptofano origina, ainda, o neurotransmissor *serotonina* e hormônios vegetais de crescimento, as *auxinas*.

Lisina. Forma acetoacetil-CoA via 2-cetodipato, como o triptofano. A lisina tem um grupo ε-amino que não pode ser removido por transaminação. A via catabólica predominante em mamíferos inicia-se com ligação do grupo ε-mino a α-cetoglutarato, formando um composto de adição, a sacaropina (Figura 17.22). Esta é clivada, liberando glutamato e 2-aminoadipato que, após transaminação, origina 2-cetoadipato. Como os átomos de carbono da lisina originam acetoacetil-CoA (e CO_2), ela é um aminoácido *cetogênico*.

Leucina. Sua via de degradação tem passos iniciais comuns à dos outros aminoácidos ramificados, valina e isoleucina (ver Grupo 4 e Figura 17.17), mas os produtos finais são exclusivamente acetoacetato e acetil-CoA. A acil-CoA (isovaleril-CoA) formada a partir de leucina é transformada, por reações que incluem carboxilação por *biotina*, em *3-hidroxi 3-metilglutaril-CoA*. Este composto, que participa das vias de síntese de corpos cetônicos e de colesterol, é clivado a acetil-CoA e acetoacetato. Deste modo, leucina e lisina são os únicos aminoácidos exclusivamente cetogênicos.

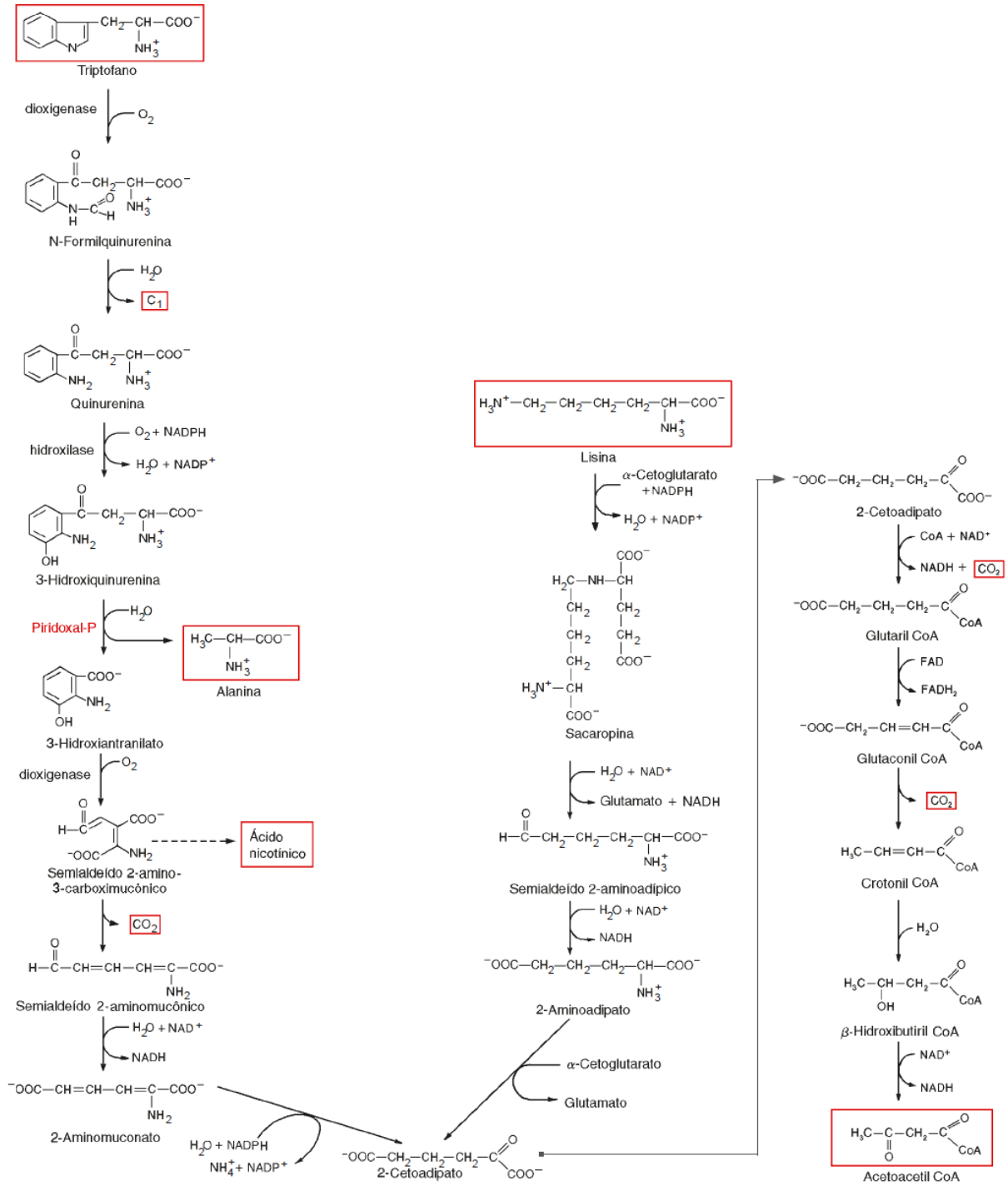


Figura 17.22 Conversão de triptofano e lisina a acetoacetil-CoA, envolvendo um intermediário comum: o 2-cetoadipato.

17.3 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 homozigotos, a atividade enzimática pode apresentar-se diminuída ou estar ausente; os heterozigotos 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 doenças genéticas metabólicas, resultado do grande número de enzimas que participam das muitas vias que compõem esta 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. 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 graves que inviabilizam o feto; mais frequentemente, 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.

O defeito hereditário mais frequente do metabolismo de aminoácidos, com incidência de 1 para cada 12.000 nascimentos, é a *fenilcetonúria*, causada por deficiência de *fenilalanina hidroxilase*, ou, mais raramente, de

di-hidropteridina redutase (Figura 17.23). A fenilalanina hidroxilase converte fenilalanina em tirosina e o cofator utilizado é a *tetra-hidrobiopterina*[2], regenerada por NADPH na reação da di-hidropteridina redutase.

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* (Figura 17.24). Um dos efeitos do fenilpiruvato é competir com o piruvato pela piruvato translocase, que promove a entrada 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 é feito 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 confiável. O diagnóstico pré-natal também pode ser feito com sondas de DNA, disponíveis após a clonagem do gene de fenilalanina hidroxilase.

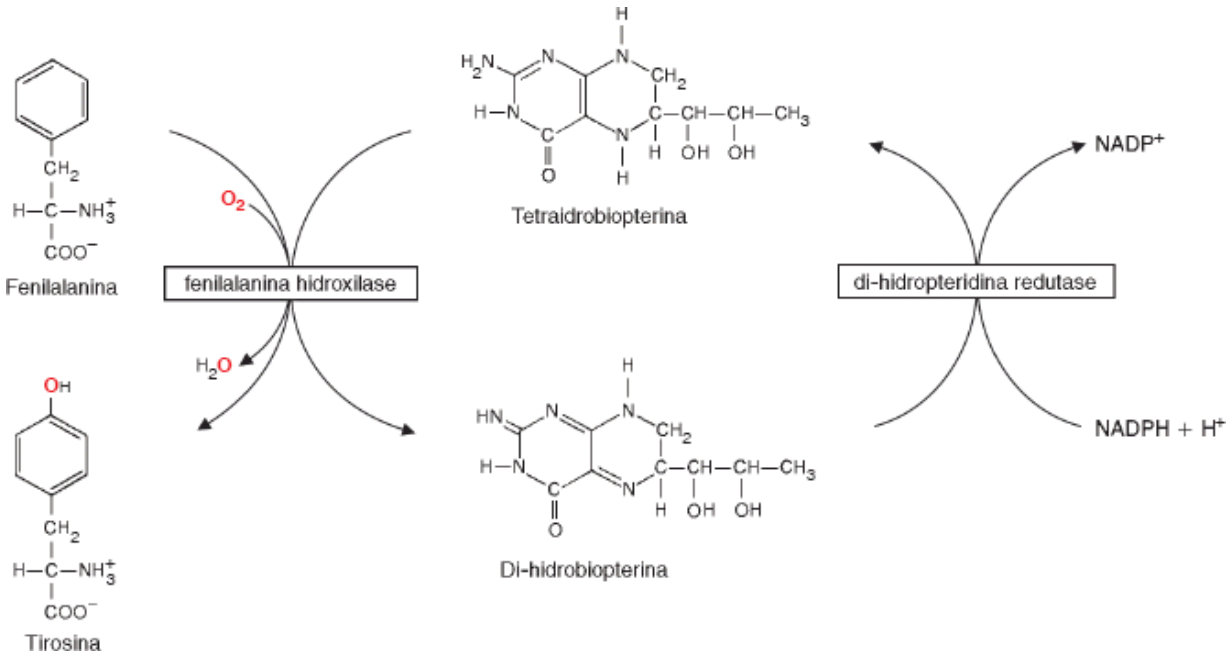


Figura 17.23 Reação da fenilalanina hidroxilase, que converte fenilalanina em tirosina, com oxidação de tetraidrobiopterina.A tetraidrobiopterina é

regenerada à custa de NADPH, por ação da di-hidropteridina redutase.

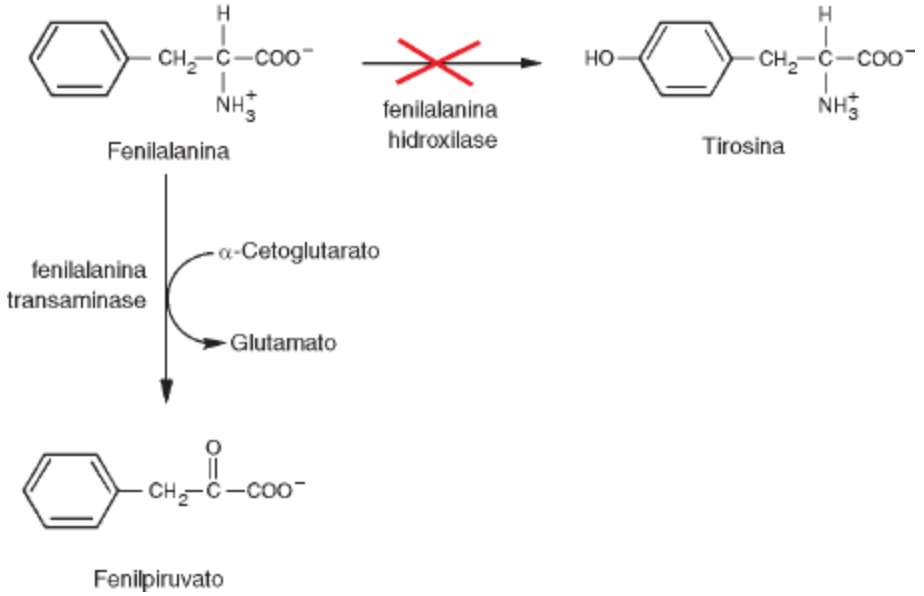


Figura 17.24 Na fenilcetonúria, a fenilalanina não pode ser convertida em tirosina e origina fenilpiruvato.

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 fenilcetonúria consiste em administrar, precocemente, uma dieta contendo um mínimo de fenilalanina; por isso, produtos industrializados contendo fenilalanina — o adoçante aspartame, por exemplo —, não devem ser consumidos por fenilcetonúricos. A restrição dietética de fenilalanina evita as disfunções neurológicas mais graves, mas diversos distúrbios neuropsiquiátricos (déficit de atenção, depressão, fobias etc.) são descritos em adolescentes e adultos submetidos a esse tratamento desde o nascimento. Os indivíduos afetados apresentam, além do comprometimento neurológico, pigmentação deficiente de pele e cabelo, devido à síntese diminuída de melanina. A fenilcetonúria foi a primeira doença genética metabólica a ser associada com um defeito enzimático específico, o que ocorreu em 1934. Depois de 80 anos de pesquisa, os mecanismos que determinam o retardamento mental não são ainda conhecidos.

O *albinismo* é devido à incapacidade de sintetizar *melanina* e caracteriza-se por pigmentação deficiente da pele, cabelo e olhos. A síntese de melanina (Figura 17.25) inicia-se com a oxidação de tirosina a *3,4-di-hidroxifenilalanina* (*DOPA*), catalisada pela *tirosinase*, que contém cobre. Esta é a enzima ausente no tipo clássico de albinismo; nos fenilcetonúricos, ela sofre inibição competitiva por fenilalanina. DOPA é também precursora de neurotransmissores e hormônios, como dopamina, noradrenalina e adrenalina (Seção 19.6.1); neste caso, porém, outra enzima promove a conversão de tirosina a DOPA, a *tirosina hidroxilase*, que utiliza tetra-hidrobiopterina, como a fenilalanina hidroxilase.

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 (Figura 17.17) — resulta em acúmulo desses aminoácidos e de seus cetoácidos, que conferem à urina um odor semelhante ao do xarope de bordo. Pode causar dano cerebral e, em casos mais graves, morte nos primeiros meses de vida.

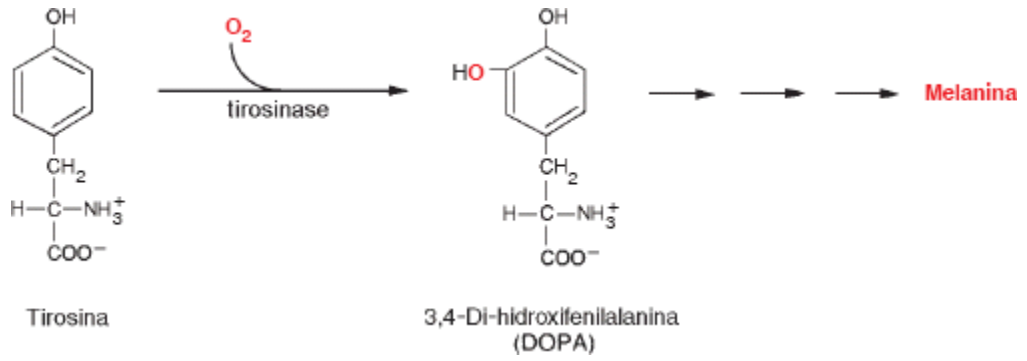


Figura 17.25 Conversão de tirosina a 3,4-di-hidroxifenilalanina (DOPA), catalisada por tirosinase. DOPA é transformada em melanina por uma série de reações complexas.

Com relação ao ciclo da ureia, já foram descritos defeitos hereditários causados por bloqueio parcial de cada uma das reações do ciclo (Figura 17.26). A consequência é a hiperamonemia, que pode levar a coma e morte (Seção 17.2.1). Nestes casos, o tratamento consiste na administração de uma dieta pobre em proteínas ou na substituição dos aminoácidos essenciais (Seção 17.4.1) da dieta pelos seus α-cetoácidos.

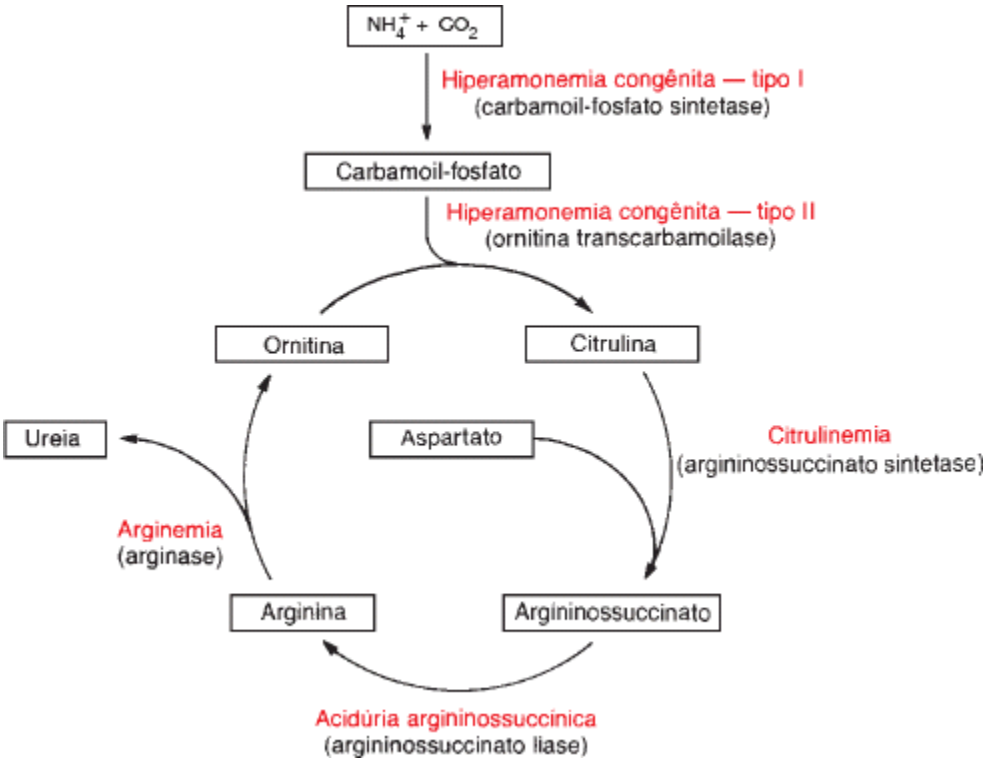


Figura 17.26 Doenças hereditárias relacionadas com o ciclo da ureia. A enzima deficiente em cada moléstia está indicada entre parênteses.

17.4 Origem do nitrogênio dos aminoácidos

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 de fornecimento externo de aminoácidos.

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 assimilável, a amônia (Figura 17.27 a). A conversão de N_2 a NH_3 é chamada *fixação de nitrogênio*.

Somente bactérias contêm a informação genética necessária para fixar nitrogênio. As bactérias fixadoras compreendem um grande número de espécies e habitam diversos nichos ecológicos, como solo, oceano, rios etc.; as de solo podem ser de vida livre (como os gêneros *Azotobacter* e

Beijerinckia) ou estabelecerem simbiose. Associam-se a plantas pertencentes a todas as divisões taxonômicas, podendo localizar-se em diferentes partes da planta, como folhas, caules e raízes. O modo de interação das bactérias que fixam nitrogênio com as plantas hospedeiras é bastante variável. *Azospirillum* e diversos gêneros de cianobactérias, como *Anabaena* e *Nostoc*, colonizam estruturas vegetais preexistentes, que sofrem pequenas modificações para abrigar a bactéria simbionte. As *bactérias endofíticas* (*Herbaspirillum*, *Burkholderia*) ganham acesso ao sistema vascular e invadem diversos tecidos de plantas não leguminosas, em geral da família das gramíneas, como milho, arroz e gramas forrageiras. As bactérias da família Rhizobiaceae (*Rhizobium* e outros gêneros) invadem as raízes de plantas leguminosas (feijão, soja, ervilha) e induzem a diferenciação de nódulos complexos, equivalentes a um novo órgão do vegetal; atualmente são conhecidas cerca de 50 espécies bacterianas que estabelecem este tipo de simbiose.

A redução de N_2 a NH_3 é realizada por um complexo enzimático, denominado *nitrogenase*, que utiliza ferredoxina reduzida (Seção 15.3) como doador de elétrons e processa-se com grande consumo de ATP. A equação geral do processo é

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16\ ATP + 16\ H_2O \longrightarrow 2\ NH_3 + 16\ (ADP + P_i) + H_2$$

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, por meio da oxidação de carboidratos produzidos por fotossíntese. A quantidade de amônia produzida pelas bactérias simbiontes excede as necessidades das leguminosas e é liberada no solo, contribuindo decisivamente para o seu enriquecimento em nitrogênio. A simbiose Rhizobiaceae/leguminosas é o processo de fixação de nitrogênio mais eficiente. Esta é a razão da *técnica de rotação de culturas*, empregada na agricultura: o cultivo de plantas não leguminosas é alternado com o de leguminosas.

Uma abordagem alternativa à rotação de culturas, que reduz os altos custos da produção industrial de fertilizantes e os danos que causam ao meio ambiente, é o desenvolvimento 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 geneticamente modificada. Por exemplo, a nitrogenase é inativada por oxigênio. Nas leguminosas, este problema é resolvido pela presença, nos nódulos das raízes, de uma proteína com alta afinidade por O_2, a *leg-hemoglobina*, que contém um grupo heme, como a hemoglobina. A simbiose é indispensável para a sua síntese: a globina é sintetizada pela leguminosa e o grupo heme pela bactéria.

A síntese industrial de fertilizantes para a agricultura vem produzindo uma proporção crescente de NH_3, correspondendo atualmente a cerca de 25% do total fixado por ano. Uma fração menor de nitrogênio, de 10 a 15%, é fixada por processos não biológicos, como descargas elétricas e radiação ultravioleta.

A amônia presente no solo é, em grande parte, convertida a nitritos e em seguida a nitratos, por bactérias dos gêneros *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, respectivamente. 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 (Figura 17.27 a). Os animais, enfatizando mais uma vez, obtêm todo o nitrogênio necessário para a síntese de seus compostos nitrogenados na forma de aminoácidos, sintetizados por outros organismos.

A reposição de N_2 na atmosfera é feita por bactérias e outros microrganismos que decompõem os organismos mortos e seu nitrogênio gera amônia; esta é convertida a nitritos e nitratos, que podem ser reconvertidos a N_2 (Figura 17.27 b). Na década de 1980, foi descoberto um importante processo biológico de geração do gás N_2, a oxidação anaeróbia de amônia, denominada *anammox* (***an***aerobic ***amm***onium ***ox***idation) — NH_3 é oxidada a N_2, utilizando nitrito como aceptor de elétrons, via intermediários que incluem hidrazina (N_2H_4), um composto extremamente tóxico, usado na fabricação de propelentes de foguetes. O processo é realizado por algumas espécies de bactérias exóticas, as *planctomicetes*, que apresentam organelas, ao contrário dos demais procariotos, e que são destinadas a isolar a via do restante da célula. São amplamente distribuídas, inclusive nos ambientes mais inóspitos. As planctomicetes anammox,

graças à capacidade de eliminar amônia, têm sido empregadas no tratamento de esgotos sanitários.

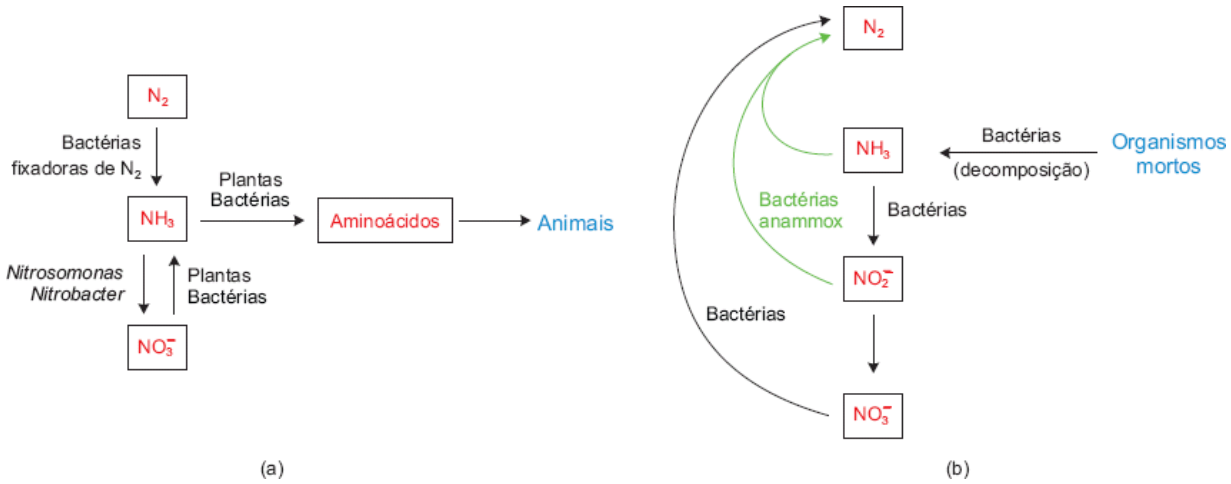


Figura 17.27 Esquema simplificado do caminho percorrido pelo nitrogênio desde a atmosfera até os animais e vice-versa.a) O N_2 atmosférico é reduzido a NH_3 por um grande número de espécies bacterianas; outras bactérias, muito abundantes no solo, transformam a maior parte da amônia em nitritos, e, finalmente, em nitratos. A maioria das plantas e bactérias é capaz de converter estes compostos a NH_3, o precursor do grupo amino dos aminoácidos, que se tornam, então, disponíveis para os animais. 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; nas planctomicetes, a oxidação anaeróbia de NH_3 (anammox), com utilização de nitrito, produz N_2.

A manutenção do equilíbrio entre os diferentes reservatórios de nitrogênio do planeta, que constituem o chamado *ciclo do nitrogênio*, deve-se à atuação das bactérias.

17.4.1 Síntese de aminoácidos

A amônia é incorporada primeiramente em glutamato e glutamina

Nos seres vivos capazes de sintetizar todos os vinte aminoácidos — plantas e microrganismos — a amônia resultante da fixação de nitrogênio é utilizada, inicialmente, para formar glutamato e glutamina. Este é o processo fundamental de incorporação direta de nitrogênio, originado de NH_4^+, como grupamentos de aminoácidos. Para a produção dos demais aminoácidos, o nitrogênio é obtido de glutamato e glutamina.

O organismo humano só sintetiza 11 dos 20 aminoácidos

O processo de síntese proteica requer que estejam presentes na célula, simultaneamente, os *vinte* aminoácidos. No organismo humano, esta condição é crítica porque nenhuma célula dispõe de reservas de aminoácidos e não são todos os aminoácidos que podem ser sintetizados. De fato, dos vinte aminoácidos encontrados nas proteínas, *nove* não podem ser sintetizados pelo ser humano (Tabela 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 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. Estes nove aminoácidos e os dois que são sintetizados a partir de aminoácidos essenciais são chamados *aminoácidos não essenciais.*

Tabela 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]

[1]Sintetizados a partir de aminoácidos essenciais.

Nos mamíferos, à semelhança dos organismos que produzem todos os aminoácidos, o nitrogênio dos aminoácidos não essenciais, exceto a tirosina, provém de glutamato e glutamina. Para a descrição de sua síntese, os aminoácidos não essenciais foram agrupados segundo o composto precursor de seu esqueleto de carbono (Figura 17.28).

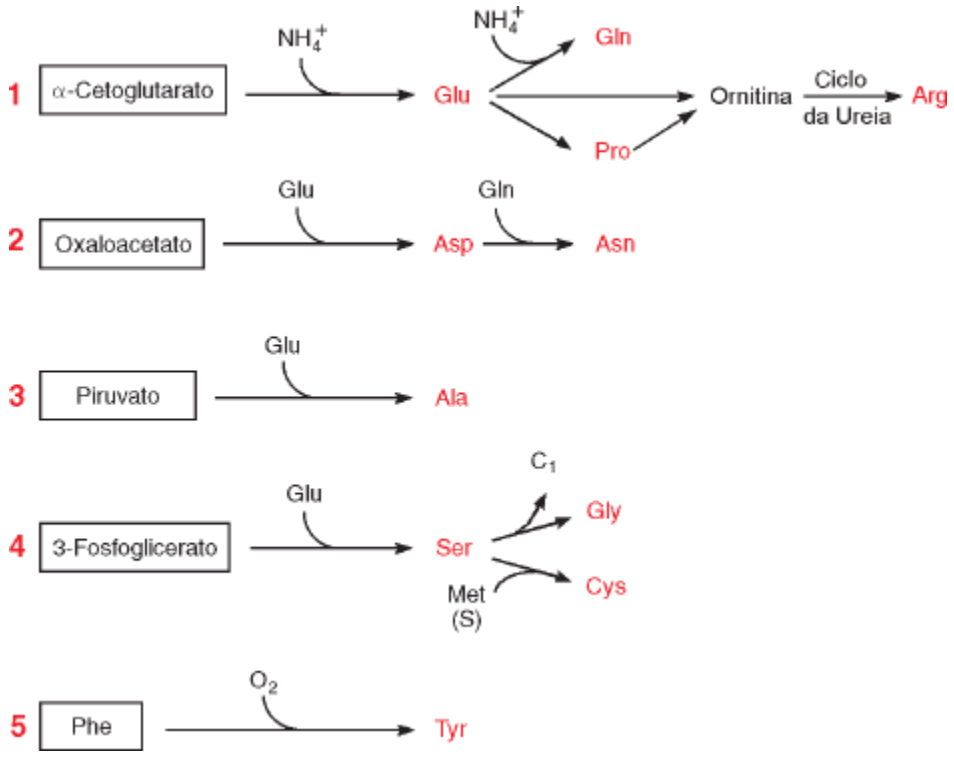


Figura 17.28 Esquema da síntese dos onze aminoácidos não essenciais para o organismo humano. Os aminoácidos foram reunidos em grupos (1 a 5), segundo o precursor dos seus átomos de carbono.

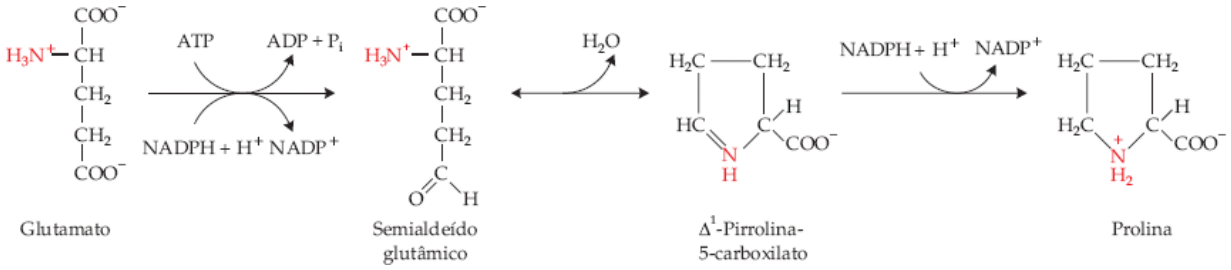
Grupo 1. Glutamato, Glutamina, Prolina e Arginina

O α-cetoácido deste grupo de aminoácidos provém de α-cetoglutarato.

Glutamato. Formado por incorporação de NH_4^+ em α-cetoglutarato catalisada pela glutamato desidrogenase, utilizando NADPH.

Glutamina. Sintetizada a partir de glutamato e NH_4^+, pela glutamina sintetase. 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, por outros tipos de reações, o nitrogênio amídico pode ser utilizado nas sínteses de asparagina (ver Grupo 2) e de purinas e pirimidinas.

Prolina. Todos os seus átomos de carbono e o de nitrogênio são provenientes de glutamato. Este aminoácido é convertido a um semialdeído, por uma redução complexa, dependente de ATP. A eliminação de H_2O produz um composto cíclico que, novamente por redução, origina prolina:

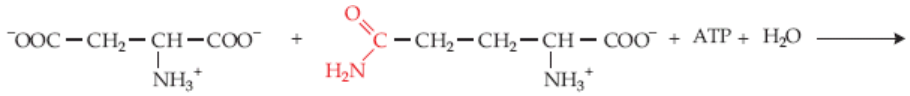


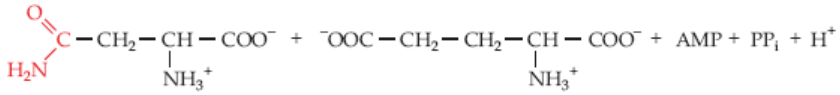
Arginina. Sintetizada a partir de citrulina, pela ação consecutiva da argininossuccinato sintetase e da argininossuccinato liase, enzimas do ciclo da ureia (Figura 17.5). No fígado, o principal local do metabolismo de arginina em animais ureotélicos, a arginina gerada por essas reações pode ser hidrolisada pela arginase. Todavia, a produção líquida de arginina é possível a partir de glutamato e prolina, que podem ser convertidos a ornitina e, esta, a arginina pelas reações do ciclo da ureia. O conhecimento a respeito do metabolismo da arginina, dada a sua complexidade, permanece incompleto.

Grupo 2. Aspartato e Asparagina

Aspartato. O esqueleto de carbono provém de oxaloacetato e o grupo amino de glutamato, por transaminação catalisada pela aspartato transaminase.

Asparagina. Originada de aspartato e glutamina, que fornece o grupo amida, por ação da asparagina sintetase:



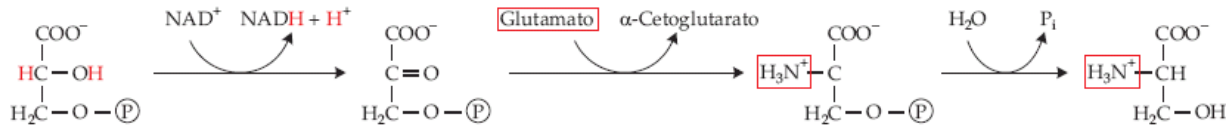


Grupo 3. Alanina

Formada por transaminação entre piruvato e glutamato, promovida pela alanina transaminase.

Grupo 4. Serina, Glicina e Cisteína

Serina. Origina-se de 3-fosfoglicerato, um intermediário da via glicolítica, por meio de: redução, transaminação e hidrólise do grupo fosfato:



Glicina. Sua síntese ocorre, fundamentalmente, por ação da *serina hidroximetil transferase*. Esta reação, por ser reversível, também é acionada na degradação de serina (Figura 17.10).

Cisteína. Derivada de serina, por substituição do oxigênio da hidroxila da serina por enxofre, originado de metionina, um aminoácido essencial. Esta reação faz parte da via de degradação de metionina (Figura 17.18).

Grupo 5. Tirosina

Origina-se de hidroxilação de fenilalanina, catalisada pela fenilalanina hidroxilase (Figura 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 a metionina e cisteína, cujas necessidades são também somadas.

Bibliografia

Appelqvist H *et al*.: The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* **5** (4): 214-226, 2013.

Baldani JI, Baldani VL: History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *An Acad Bras Cienc* **77** (3): 549-579, 2005.

Brader G *et al*.: Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **27**: 30-37, 2014.

Camp KM *et al*.: Phenylketonuria Scientific Review Conference: state of the science and future research needs. *Mol Genet Metab* **112** (2): 87-122, 2014.

Cochat P, Groothoff J: Primary hyperoxaluria type 1: practical and ethical issues. *Pediatr Nephrol* **28**: 2273-2281, 2013.

Fuerst JA, Sagulenko E: Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nat Rev Microbiol* 9 (6): 403-413, 2011.

Holmes FL: Hans Krebs and the discovery of the ornithine cycle. *Fed Proc* **39**: 216-225, 1980.

Kornberg H: Krebs and his trinity of cycles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3):225-228, 2000.

Oldroyd GE *et al*.: The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**: 119-144, 2011.

Pucket RL *et al*.: Maple syrup urine disease: further evidence that newborn screening may fail to identify variant forms. *Mol Genet Metab* **100** (2): 136-142, 2010.

Serrano M *et al*.: Assessment of plasma ammonia and glutamine concentrations in urea cycle disorders. *Clin Biochem* **44** (8-9): 742-744, 2011.

Sriram SM *et al*.: The N-end rule pathway: emerging functions and molecular principles of substrate recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 735-747, 2011.

Workun GJ *et al*.: Evolutionary persistence of the molybdopyranopterin-containing sulfite oxidase protein fold. *Microbiol Mol Biol Rev* **72** (2): 228-248, 2008.

[1]A exceção são os cereais (trigo, cevada, centeio etc.), que contêm famílias de proteínas de reserva, denominadas conjuntamente de *glúten*. A ingestão das proteínas do glúten por indivíduos geneticamente suscetíveis induz a doença celíaca, uma doença autoimune do intestino delgado (atinge 1% da população de adultos).

[2]A tetra-hidrobiopterina não é derivada de vitamina, sendo sintetizada *de novo* a partir de guanosina trifosfato (GTP). Além de ser o cofator de diversas enzimas do metabolismo de aminoácidos e seus derivados (catecolaminas, serotonina etc.), atua como coenzima das sintases de óxido nítrico (Seção 22.6).

OceanofPDF.com

18 Nutrição — Os Substratos das Vias Metabólicas

Os alimentos ingeridos pelos seres humanos, após digestão e absorção, originam uma grande diversidade de substâncias que são distribuídas às células, fornecendo os substratos das vias metabólicas oxidativas e biossintéticas, além de vitaminas e sais minerais. O funcionamento global do organismo depende da quantidade e 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 sempre sendo degradadas e sintetizadas. A reciclagem de proteínas alimenta e utiliza um conjunto de aminoácidos, que deve ser entendido como moléculas "em trânsito" entre os processos de degradação e síntese. Este conjunto precisa ser continuamente suprido por aminoácidos exógenos, por várias razões:

1. O organismo humano não dispõe de reservas de proteína ou aminoácidos e é incapaz de sintetizar nove dos vinte aminoácidos (Seção 17.4.1, Tabela 17.3).
2. O conjunto de aminoácidos resultante das degradações proteicas nunca é integralmente aproveitado para sínteses, 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.

3. A gliconeogênese utiliza seletivamente os esqueletos de carbono dos aminoácidos glicogênicos, retirando-os do conjunto em proporções significativas.
4. Os aminoácidos são utilizados, em quantidades consideráveis, na síntese de compostos nitrogenados não proteicos (Capítulo 17 — Introdução); quando estes compostos são degradados, seu nitrogênio é eliminado na urina ou nas fezes. Entre os compostos excretados estão a creatinina (resultante da degradação de creatina fosfato, uma reserva energética do músculo — Seção 22.4), o urato (produto de degradação das purinas) e a bilirrubina e outros pigmentos (derivados do catabolismo do grupo heme).
5. Existe uma reconstituição contínua de proteínas cujos aminoácidos não retornam ao conjunto: são as proteínas constituintes de mucosas, epiderme, cabelos, pelos, unhas etc.

No organismo humano, a perda de nitrogênio nunca deixa de existir, mesmo quando um indivíduo recebe uma dieta isenta de proteínas. Em experimentos deste tipo, verifica-se uma excreção inicial de nitrogênio, que diminui nos dias subsequentes, até atingir um valor constante. Em um homem adulto de 70 kg, este valor é igual a 3,7 g de nitrogênio por dia, equivalente a 23 g de proteína[1]. Esta é a excreção mínima obrigatória, que reflete a renovação basal de proteínas corpóreas.

Com uma dieta balanceada, um indivíduo adulto excreta, em média, 16 g de nitrogênio por dia, correspondendo a 100 g de proteína. A *única* forma de repor esta perda e manter estável o conjunto 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 as células. A digestão consiste na hidrólise das ligações peptídicas, catalisada por enzimas proteolíticas presentes no trato digestório, iniciando-se no estômago e completando-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 da 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 pelo balanço de nitrogênio. 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, por meio da ureia eliminada na urina (em média, 90% do total excretado) e de proteínas presentes nas fezes, derivadas de proteínas não digeridas, da descamação da mucosa intestinal e também da flora intestinal.

Em um indivíduo adulto com dieta adequada, a eliminação equivale à ingestão e o balanço de nitrogênio é igual a zero: 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 ser aumentado com a dieta, tendo em vista que não há reserva de proteína. O excesso de proteína ingerida é armazenado como gordura.

As situações em que se estabelece um *balanço de nitrogênio positivo*, ou seja, excreção de nitrogênio menor do que ingestão, são bastante particulares. Balanços positivos são verificados apenas quando há aumento real do conteúdo proteico por formação efetiva de tecido, como durante o crescimento, a gravidez, lactação e convalescença.

O *balanço de nitrogênio negativo* ocorre quando a eliminação é maior do que a ingestão. As condições que acarretam balanço negativo são: jejum, dietas pobres em proteínas ou contendo proteínas de baixo valor biológico, e dietas pobres em carboidratos. Diversas doenças, como diabetes, câncer e infecções, e situações de perda significativa de tecidos, como queimaduras graves, cirurgias etc., também provocam balanço negativo.

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 proteína é o seu *conteúdo proteico*, geralmente expresso em gramas de proteína por 100 g de alimento (%). A Tabela 18.1 mostra que os alimentos mais ricos em proteína são as carnes e os produtos derivados de animais, como laticínios e ovos, que chegam a conter de 10 a 100 vezes mais proteína que os alimentos vegetais. A grande maioria dos alimentos vegetais — cereais, verduras, legumes, frutas, tubérculos etc. — são pobres em proteína, com exceção das leguminosas (soja, feijão, ervilha, amendoim etc.), e, do ponto de vista das necessidades proteicas, são inadequados. Os alimentos básicos dos países em desenvolvimento, assim como os constituintes de dietas vegetarianas, têm baixo teor proteico. Uma dieta comum entre a população brasileira de baixa renda é constituída, fundamentalmente, por uma mistura de três partes de arroz e uma de feijão, e tem baixa concentração de proteína, em torno de 8%.

Tabela 18.1 Conteúdo proteico de alimentos.

Alimento[1]	Teor de proteína (g/100 g de alimento)
Carne bovina	27
Queijo prato	26
Fígado bovino	26
Carne de frango	24
Carne de porco	24
Peixe	23
Soja	17
Ovo	13
Feijão	6,0
Ervilha	6,0

Aveia	3,7
Leite de vaca[2]	3,5
Milho	2,4
Arroz	2,0
Batata	1,9
Banana	1,3
Gelatina[3]	1,2
Cenoura	1,0
Laranja	0,84
Mandioca	0,65
Maçã	0,21

[1] Alimentos cozidos, exceto frutas e cenoura.

[2] Leite contém caseína, uma proteína de excelente valor nutricional, mas tem alto teor de água.

[3] Alguns produtos comercializados como *gelatina*contêm, predominantemente, carboidratos.

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 proteico do indivíduo quando apenas a proteína em questão é oferecida na dieta como fonte de nitrogênio; a ocorrência ou não de espoliação proteica pode ser monitorada por medidas do balanço de nitrogênio, demasiado dispendiosas para utilização de rotina. Diversos métodos alternativos são adotados para avaliar a qualidade das proteínas presentes em um alimento.

A qualidade nutricional das proteínas depende da sua digestibilidade e composição

O organismo humano, por ser incapaz de estocar proteína e de sintetizar os aminoácidos essenciais, depende de um aporte dietético constante de proteínas de boa qualidade para sustentar o crescimento e todas as atividades fisiológicas.

As propriedades que definem a qualidade alimentar de uma proteína são a sua digestibilidade e a adequação do seu conteúdo em aminoácidos para compor as proteínas endógenas.

A *digestibilidade* é o porcentual da proteína ingerida que é digerida e efetivamente absorvida no trato gastrointestinal e oferecida aos tecidos, sob a forma de aminoácidos; a parte não digerida é eliminada nas fezes. Calcula-se a digestibilidade a partir 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 ($N_{absorvido}$) (Figura 18.1), e a digestibilidade (D) é expressa como:

$$D = \frac{N_{ingerido} - N_{fezes}}{N_{ingerido}} \times 100 \quad \text{ou} \quad D = \frac{N_{absorvido}}{N_{ingerido}} \times 100$$

A digestibilidade das proteínas sofre interferência de diferentes fatores, alguns deles resultantes do processamento dos alimentos. O aquecimento geralmente aumenta a digestibilidade das proteínas, por causar desnaturação, facilitando, assim, a hidrólise pelas enzimas digestivas. Por outro lado, a utilização de altas temperaturas na presença de açúcares redutores decresce a digestibilidade das proteínas: estes açúcares formam ligações covalentes com o grupo ε-amino da lisina, que não podem ser rompidas pelas enzimas digestivas.

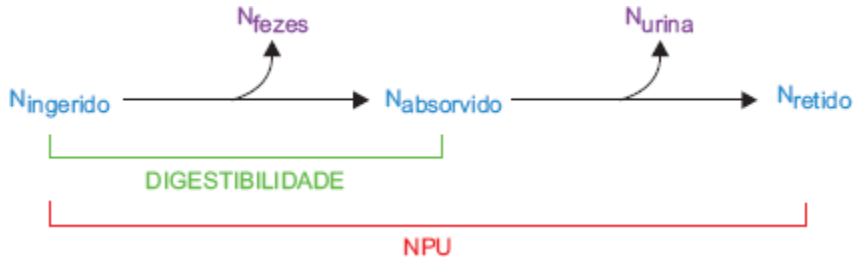


Figura 18.1 Parâmetros para avaliar a qualidade nutricional das proteínas. A digestibilidade relaciona a quantidade de nitrogênio (N) absorvido com a quantidade de nitrogênio ingerido; o NPU compara o nitrogênio ingerido e o retido.

O grau de digestibilidade de uma proteína é, ainda, determinado por sua natureza intrínseca: a grande maioria das proteínas de origem animal exibem valores altos de digestibilidade quando comparadas a proteínas de origem vegetal (Tabela 18.2). As proteínas vegetais são, frequentemente, envolvidas por paredes celulares que têm alto teor de compostos não digeríveis, o que dificulta o acesso das enzimas digestivas às proteínas. Algumas plantas, como a soja, contêm inibidores de enzimas digestivas, que devem ser inativados antes de seu consumo.

Tabela 18.2 Valores de digestibilidade de proteínas.

Alimento	Digestibilidade (%)
Ovo	97
Leite, queijo	95
Carne, peixe	94
Arroz polido	88
Milho	85
Feijão	78

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, representando a exceção entre as proteínas animais. Para que uma proteína seja nutricionalmente satisfatória, deve conter aminoácidos essenciais em proporções adequadas à síntese das proteínas humanas. Uma proteína hipotética, a polimetionina, 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 ureia. Proteínas deficientes em apenas um aminoácido essencial são incapazes de manter o equilíbrio nitrogenado quando

constituem a única proteína da dieta, independentemente da quantidade ingerida.

Um índice que revela a real qualidade nutricional de uma proteína é o *NPU* (***N**et **P**rotein **U**tilization*). O NPU (Figura 18.1) mede a fração de nitrogênio ingerido efetivamente retida e que origina os compostos nitrogenados do organismo. A quantidade de nitrogênio retido corresponde à diferença entre o nitrogênio ingerido e o nitrogênio excretado nas fezes e na urina:

$$\text{NPU} = \frac{\text{N}_{\text{retido}}}{\text{N}_{\text{ingerido}}} \times 100 \quad \text{ou} \quad \text{NPU} = \frac{\text{N}_{\text{ingerido}} - \text{N}_{\text{excretado}}}{\text{N}_{\text{ingerido}}} \times 100$$

As proteínas de origem animal exibem altos valores de digestibilidade e conteúdo adequado de aminoácidos e têm, consequentemente, valores elevados de NPU (Tabela 18.3): são as proteínas de carnes, peixes, ovos e leite; a gelatina é uma exceção. As proteínas vegetais têm digestibilidade menor e deficiência de um ou mais aminoácidos essenciais, o que está refletido nos seus índices de NPU, também menores.

Tabela 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

Outro método bastante utilizado para avaliar o valor nutricional de uma proteína compara a sua composição em aminoácidos com a de proteínas consideradas como padrão de referência, como a ovalbumina ou caseína, e corrige este resultado para a digestibilidade da proteína analisada. O parâmetro obtido é o *PDCAAS* (***P**rotein **D**igestibility **C**orrected **A**mino **A**cid **S**core*), calculado a partir do escore de aminoácidos (quociente entre o conteúdo do aminoácido limitante na proteína testada e o conteúdo do mesmo aminoácido na proteína de referência), multiplicado pela sua digestibilidade avaliada em ratos.

Os métodos disponíveis para medir a qualidade de proteínas apresentam diversas imprecisões, a principal sendo a utilização de índices obtidos em experimentos com ratos, cujo padrão de aminoácidos essenciais não é idêntico ao de seres humanos.

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, principalmente, do 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 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 cerca de 56 g para um homem de 70 kg e 44 g para uma mulher de 55 kg. A necessidade proteica da criança, que apresenta um balanço de nitrogênio positivo, é proporcionalmente maior do que a do adulto, chegando a 2,5 g por quilo de peso. Durante a gravidez e lactação, recomenda-se, em média, uma ingestão diária adicional de 10 e 20 g de proteína, respectivamente, para sustentar a síntese tecidual (da mãe e do feto) e a formação do leite.

Essas doses mínimas recomendadas são satisfatórias para os habitantes de países desenvolvidos, onde as dietas habituais são compostas de proteínas de alta qualidade. Nos Estados Unidos, por exemplo, 70% do total de proteínas consumidas são de origem animal e 30% 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, em torno de 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, de preferência 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 (1) conteúdo proteico muito inferior aos produtos de origem animal, (2) deficiências de aminoácidos essenciais e (3) 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 (arroz, por exemplo) são deficientes em lisina, e às proteínas das leguminosas (feijão, por exemplo) 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 as de ovos e laticínios. Dietas vegetarianas não são recomendadas, em especial, para crianças, gestantes e lactantes. Além dos problemas referentes à necessidade proteica, este tipo de dieta é muito rico em fibras, que diminuem a absorção de nutrientes em geral. Ainda mais, os alimentos vegetais não contêm vitamina B12 (Seção 18.4) e ácidos graxos poli-insaturados ω-3 de cadeia longa (Seção 18.2.4), que são fundamentais para o desenvolvimento adequado do sistema nervoso central. Como este desenvolvimento é mais acelerado do início do terceiro trimestre de gestação até mais ou menos 18 meses após o nascimento, a falta desses ácidos graxos durante este período é crítica.

Os ruminantes constituem uma exceção entre os mamíferos, no que concerne à ingestão proteica, porque podem sobreviver à custa de vegetais (pastagem). Nestes animais, a maior parte da ureia produzida é transferida do sangue para o rúmen. Esta parte do sistema digestivo é habitada por microrganismos que utilizam a ureia como fonte de nitrogênio para sintetizar aminoácidos. A digestão de grande parte destas bactérias em porções distais do trato gastrointestinal satisfaz as necessidades proteicas dos ruminantes.

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 (10 a 15%) 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 serem oxidados e, deste modo, fornecer energia para os processos vitais. A necessidade energética[2] 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: atividade metabólica das células, trabalho osmótico, bombeamento do sangue, respiração, atividade renal, do sistema nervoso etc. O transporte ativo através das membranas celulares e o funcionamento do sistema nervoso central consomem mais de 50% dos gastos energéticos basais. A taxa metabólica basal é medida pela produção de calor ou pelo oxigênio consumido por um sujeito em repouso e acordado, 12 horas após a última refeição. É proporcional à área de superfície corpórea, mais diretamente à massa magra (músculos, ossos e vísceras, ou o peso corpóreo menos o peso da massa adiposa); é também

relacionada com idade e sexo. Corresponde, em média, a 1.800 kcal/dia (7.530 kJ) para homens e 1.400 kcal/dia (5.850 kJ) para mulheres. O consumo de energia por minuto gira em torno de 1 kcal, um pouco menos do que isto para mulheres e um pouco mais, para homens — 1 kcal/min corresponde, aproximadamente, ao calor liberado por uma vela ou por uma lâmpada de 75 watts acesas.

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 energia gasta nas diferentes atividades diárias (Tabela 18.4).

Tabela 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

As doses recomendadas de ingestão calórica, ao contrário das quantidades de proteína, 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, considerando-se o sexo e a faixa etária; para mulheres grávidas ou lactantes, são acrescidas das necessidades energéticas associadas com a formação de tecidos ou secreção do leite (Tabela 18.5). À semelhança do equilíbrio nitrogenado, deve haver um *equilíbrio energético*: 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 de lipídios provoca perda de peso. Por outro lado, dietas

hipercalóricas resultam em ganho de peso, por aumento do depósito de gordura.

Tabela 18.5 Ingestão calórica diária recomendada para indivíduos adultos. [1]

	Energia necessária	
	kcal	kJ
Homens	2.400 - 2.600	10.042 - 10.878
Mulheres	1.800 - 2.000	7.531 - 8.368
Grávidas[2]	+ 300	+ 1.255
Lactantes[2]	+ 500	+ 2.092

[1]O homem utilizado como referência tem entre 19 e 30 anos, 1,78 m de altura e 70 kg; a mulher tem entre 19 e 30 anos, 1,63 m de altura e 57 kg. O estilo de vida considerado é do tipo sedentário, incluindo somente as atividades físicas leves do dia a dia.

[2]Calorias adicionais à dose recomendada.

18.2.2 Obesidade

A *obesidade* constitui um problema de saúde pública de proporções epidêmicas em países industrializados, especialmente nos Estados Unidos, em contraste com a desnutrição a que está submetida uma grande parcela da população mundial. Todavia, a partir da década de 1990, a incidência de obesidade cresceu também nos países em desenvolvimento, tanto em adultos, como em crianças. No Brasil, metade da população adulta e um terço das crianças de 5 a 9 anos têm excesso de peso.

O estado nutricional de um indivíduo adulto pode ser avaliado pela medida do seu Índice de Massa Corporal (IMC), que é igual ao peso corporal (em kg) dividido pela altura (em metros) ao quadrado:

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso}}{\text{altura}^2}$$

Este índice reflete a quantidade de gordura corpórea, permitindo uma avaliação aproximada do grau de obesidade; de modo geral, um indivíduo é considerado obeso se apresentar IMC maior do que 30 (Tabela 18.6). A definição das diferentes categorias de IMC baseia-se em projeções estatísticas do peso corpóreo ideal, aquele associado com os menores índices de morbidade e mortalidade.

Tabela 18.6 Valores de IMC (índice de massa corporal) e estado nutricional de indivíduos adultos.

Abaixo do peso	Peso desejável ("normal")	Sobrepeso	Obesidade	Obesidade mórbida
< 20	20-24,9	25-29,9	30-40	> 40

A utilização do IMC para avaliar o peso adequado tem limitações: não diferencia gordura e massa muscular (músculos pesam mais que gordura), não leva em conta o sexo (mulheres têm mais gordura) e a etnia, além de ser impreciso para menores de 18 anos. Outros índices têm sido propostos: circunferência abdominal, proporção entre cintura e quadril, proporção entre cintura e altura etc.

A obesidade constitui um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, certos tipos de câncer, distúrbios musculoesqueléticos (osteoartrite de joelho e quadril) etc. Como resulta, quase sempre, de superalimentação, o tratamento mais adequado é 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 taxa metabólica basal e da degradação de lipídios, além, naturalmente, de aumentar o gasto energético.

A causa da obesidade é, sem dúvida, a ingestão calórica em excesso com relação às necessidades energéticas; mas, a razão para que este

desajuste ocorra é desconhecida. O controle do consumo de alimentos (da saciedade) e do equilíbrio energético é complexo e mal compreendido. O envolvimento de componentes genéticos na obesidade ainda não foi totalmente esclarecido.

Em 1994, foi identificado o gene OB (de ***OB****ESE*) de camundongos e os seus homólogos em seres humanos. O gene OB codifica um hormônio peptídico, a *leptina* (do grego *leptós*, que significa delgado, magro), sintetizado principalmente nos adipócitos e secretado na corrente sanguínea; no hipotálamo liga-se a receptores específicos, reduzindo o apetite e aumentando o gasto de energia. Este é o resultado da liberação, pelo hipotálamo, de neuropeptídios anorexígenos e da supressão da liberação daqueles que estimulam o apetite. A leptina, além do seu efeito central, atua nos tecidos periféricos, promovendo a degradação de lipídios, a termogênese e a sensibilidade à insulina.

A leptina, em camundongos e ratos, funciona como um sensor molecular do teor de gordura armazenada nos adipócitos: quando o estoque de gordura é adequado, os níveis de leptina são altos, limitando a ingestão de alimentos. Durante o jejum, os níveis de leptina diminuem e a alimentação é promovida. Camundongos homozigotos para os alelos defectivos do gene *ob* (*ob/ob*) sintetizam leptina não funcional e têm peso corpóreo três vezes maior do que os camundongos normais. Os animais da linhagem *ob/ob* comportam-se como se estivessem permanentemente em jejum, superalimentando-se e tornando-se obesos e diabéticos. A administração de leptina a esses mutantes resulta em diminuição da tomada de alimento, do peso corpóreo e dos níveis plasmáticos de glicose e insulina, além de aumentar o gasto de energia. Mutações no gene do receptor de leptina também levam à obesidade em camundongos e ratos.

Inicialmente, acreditou-se que a reposição de leptina poderia constituir uma terapia para a obesidade humana. Porém, esta abordagem não produziu os resultados esperados e foi abandonada já no final da década de 1990. Acontece que a grande maioria dos seres humanos obesos são diferentes dos camundongos obesos, por não serem portadores de genes defectivos para a leptina ou para o seu receptor, isto é, produzem leptina e receptores normais. Os níveis elevados de leptina, proporcionais ao aumento do depósito adiposo, tornariam o sistema nervoso central dos obesos resistente à leptina, em analogia à resistência à insulina dos diabéticos (Seção 21.4).

O quadro do controle da obesidade humana tornou-se ainda mais confuso graças à descrição de casos de indivíduos severamente obesos, portadores de genes defectivos de leptina e/ou do seu receptor, nos quais o tratamento com leptina foi capaz de reverter a hiperfagia e o ganho de peso. Ou seja, existem subtipos de obesidade humana caracterizados por baixas concentrações de leptina, semelhantes aos camundongos obesos.

Embora a leptina seja considerada o principal regulador do apetite, vários outros hormônios têm sido relacionados com a manutenção do equilíbrio energético, agindo no hipotálamo: outras adipocinas sintetizadas pelo tecido adiposo, estômago e intestinos, e a insulina. As proteínas desacopladoras também interferem no controle da obesidade, por levarem à redução da quantidade de ATP sintetizado durante o metabolismo oxidativo — a ativação da expressão de proteínas desacopladoras nos adipócitos resulta da ação da leptina no hipotálamo.

18.2.3 Contribuição dos alimentos para a ingestão calórica

A produção calórica por oxidação de carboidratos, proteínas e lipídios está indicada na Tabela 18.7. Qualquer destes três tipos de compostos pode suprir a demanda energética alimentar. A proporção 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, para a maioria da população, uma ingestão proteica em quantidades maiores do que a dose mínima. Estes fatores determinam que a maior proporção de ingestão calórica seja constituída por alimentos ricos em carboidratos.

A recomendação atual é que o suprimento energético seja fornecido por uma dieta contendo cerca de 60% de carboidratos, 25 a 30% de lipídios e 10 a 15% de proteínas.

Tabela 18.7 Valores aproximados de 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

[1] O álcool, consumido com moderação (2% 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 polissacarídios, como o amido; açúcares, como a sacarose, devem compor uma fração menor. O amido é encontrado principalmente em cereais e seus derivados (pães, massas), raízes e tubérculos (mandioca, batata); a sacarose, em alimentos doces, mel etc.

Uma maior ingestão de açúcares, em relação à de polissacarídios, determina aumento dos níveis plasmáticos de triacilgliceróis e redução de HDL-colesterol, resultando em maior risco de ocorrência de doenças cardiovasculares. Adicionalmente, os alimentos ricos em açúcares são, na maioria das vezes, pobres em nutrientes essenciais.

Em dietas hipocalóricas, a frutose costumava ser recomendada em substituição à glicose, por não estimular a secreção de insulina pelas células β do pâncreas. Esta conduta deixou de ser adotada, porque o consumo elevado de frutose acarreta mudanças desfavoráveis do perfil de lipídios plasmáticos.

É necessário ingerir um mínimo de 5 g de carboidratos por 100 kcal ingeridas: 130 g para uma dieta de 2.600 kcal. A ingestão de quantidades menores tem como consequência a hipoglicemia, compensada pela intensificação da gliconeogênese a partir de aminoácidos, levando à espoliação proteica e a um balanço de nitrogênio negativo. Fica evidente a ação poupadora de proteínas desempenhada pelos carboidratos. Ademais,

quando a demanda energética é suprida pela oxidação de lipídios, sem ser acompanhada pela oxidação de carboidratos, advém a cetose.

As doses recomendadas de proteínas pressupõem a ingestão concomitante de doses adequadas de carboidratos e lipídios, de modo que a maior parte das proteínas exógenas possa ser utilizada na reposição das proteínas endógenas, e não como fonte de energia.

Alguns polissacarídios presentes nos alimentos não são utilizados pelos seres humanos como fonte de energia: são componentes das fibras dietéticas.

Os alimentos vegetais são ricos em fibras dietéticas

O termo *fibra dietética* refere-se a componentes dos alimentos que sejam resistentes à hidrólise pelas enzimas digestivas do estômago e intestino delgado dos seres humanos e que sofram fermentação de grau variado pelos microrganismos presentes no intestino grosso (cólon). Incluem-se nesta definição os compostos estruturais presentes nas partes comestíveis de vegetais — em geral polissacarídios, dos quais o principal é a celulose — e oligossacarídios obtidos industrialmente, como a inulina, composta por unidades de frutose e glicose.

As fibras dietéticas são classificadas, de acordo com a sua solubilidade em água, em dois tipos — solúveis e insolúveis —, aos quais se atribuem efeitos fisiológicos diferentes.

As *fibras solúveis* são constituídas por heteropolissacarídios (formados por monossacarídios diferentes) ramificados, como as pectinas, gomas e mucilagens; são extensamente fermentadas por bactérias durante o trânsito pelo cólon. Fontes importantes de fibras solúveis são: polpa de frutas, legumes, aveia, cevada, milho, lentilha, feijões e outras leguminosas.

As *fibras insolúveis*, das quais a mais abundante é a celulose, são mais resistentes à fermentação no cólon. São encontradas em cereais integrais (principalmente trigo) e alimentos deles derivados, e em leguminosas, legumes, verduras, frutas e sementes em geral.

Uma dieta mista contendo alimentos ricos em fibras oferece maior proteção contra doenças crônicas do que fibras purificadas adicionadas aos alimentos. Legumes, verduras e frutas, devido ao seu alto teor de água, têm

baixas concentrações de fibras; nos cereais integrais, as concentrações são maiores.

As fibras dietéticas produzem efeitos benéficos

O consumo de fibras, sobretudo fibras solúveis, diminui os níveis de colesterol plasmático. Elas aumentam a viscosidade do conteúdo do intestino delgado e ligam-se a sais biliares, reduzindo a sua reabsorção; os sais biliares excretados são repostos a partir do colesterol (Seção 16.8), o que diminui o teor de colesterol circulante. Além disto, a fermentação das fibras pelas bactérias intestinais produz ácidos graxos de cadeia curta que parecem inibir a síntese de colesterol no fígado.

Adicionalmente, as fibras solúveis retardam o esvaziamento gástrico e a absorção intestinal de glicose, reduzindo a glicemia pós-prandial. São, por isto, recomendadas para indivíduos diabéticos, que passam a necessitar de doses menores de insulina para o controle da glicemia.

Fibras que são incompleta ou lentamente fermentadas pela microflora no intestino grosso — principalmente fibras insolúveis, como a celulose — promovem aumento da massa fecal, o que estimula o peristaltismo e acelera o trânsito intestinal. Este tipo de fibra deve compor dietas para prevenir ou tratar a constipação intestinal e o desenvolvimento de hemorroidas, diverticulose e diverticulite.

Uma refeição rica em fibras é processada mais lentamente e tem volume maior que uma refeição com baixo teor de fibra, acarretando uma sensação de saciedade maior, além de ser, em geral, menos calórica. Por estas características, as fibras são indicadas para combater e prevenir a obesidade.

Doses exageradas de fibras dietéticas podem causar resultados adversos

Os efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico promovidos por alta ingestão de fibras são considerados benéficos para indivíduos diabéticos e/ou com doenças cardiovasculares. Por outro lado, discute-se a possibilidade de que as fibras causem diminuição da absorção de macro e micronutrientes, por terem efeito laxativo e por interagirem com nutrientes, formando complexos insolúveis no lúmen do intestino. Esta ação

complexante, todavia, seria exercida por outros compostos presentes nos alimentos ricos em fibras e não pelas próprias fibras. Este seria o caso do *fitato* (inositol hexafosfato), que atua como reserva de fosfato para o metabolismo energético de vegetais. A redução da biodisponibilidade de nutrientes causada pelo aumento da tomada de fibras permanece em discussão.

18.2.4 Lipídios da dieta — Ácidos graxos essenciais

Os lipídios da dieta fornecem os ácidos graxos essenciais

Os lipídios mais abundantes nos alimentos são os triacilgliceróis, constituintes de 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*. Dois ácidos graxos são considerados essenciais para o organismo humano (Seção 16.6): *linoleico* (ω-6) e α-*linolênico* (ω-3). Os ácidos graxos essenciais têm papel fundamental no crescimento normal e no funcionamento adequado do organismo, em especial do sistema nervoso; além de serem precursores dos eicosanoides (Seção 16.6.1), eles mesmos atuam como mensageiros intracelulares. Quando os lipídios não perfazem uma fração significativa da dieta, deficiências de ácidos graxos essenciais podem ocorrer, tornando-se mais frequentes quando a alimentação é parenteral.

Para satisfazer as necessidades de ácidos graxos essenciais, são recomendados os óleos vegetais, que têm alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados. As gorduras de origem animal são, em geral, muito mais ricas em ácidos graxos saturados do que aquelas de fontes vegetais. Os óleos de coco, de algumas palmeiras tropicais e de cacau são exemplos raros de óleos vegetais ricos em ácidos graxos saturados (Tabela 18.8).

Tabela 18.8 Composição[1] em ácidos graxos de gorduras de origem animal e vegetal.

	Ácidos graxos

	Saturados	Monoinsaturados	Poli-insaturados
Gorduras animais			
Peixes marinhos[2]	18-34	30-52	21-33
Frango	35	44	21
Porco	40	47	13
Boi	52	45	3
Toucinho	41	47	12
Manteiga[3]	64	33	3
Margarinas[3]			
Cremosas	17	38	45
Duras	18	51	31
Óleos/gorduras vegetais			
Girassol	11	18	71
Milho	14	26	60
Soja	15	25	60
Algodão	27	20	53
Amendoim	20	48	32
Oliva	16	74	10
Palma (Dendê)	51	39	10
Cacau	62	35	3
Coco	90	8	2

[1] Porcentagem dos ácidos graxos totais.

[2] Valores mínimos e máximos em peixes das famílias do salmão e do arenque.

[3] A porcentagem de ácidos graxos trans em manteiga, margarinas de consistência cremosa e dura é de 3, 15 e 25%, respectivamente.

O ácido graxo poli-insaturado presente em maior concentração nos óleos vegetais comumente consumidos pelos seres humanos é o ácido linoleico (ω-6). Quanto à família de ácidos graxos ω-3, somente alguns óleos, como os de soja e canola, contêm apenas o ácido α-linolênico, e em quantidades reduzidas (Tabela 18.9). O óleo de linhaça é particularmente rico em α-linolênico (55%), mas não é um óleo habitualmente utilizado. Ácidos graxos ω-3 de cadeia mais longa e com maior número de insaturações, como os ácidos eicosapentaenoico (EPA 20:5) e docosaexaenoico (DHA 22:6), são praticamente inexistentes nos óleos vegetais. A fonte mais importante de EPA e DHA são os peixes marinhos, por exemplo, salmão, arenque, atum, sardinha, tainha, cavala etc. Os ácidos graxos ω-3 de cadeia longa são sintetizados pelo fitoplâncton, que constitui a base da cadeia alimentar marinha: os peixes que se alimentam direta ou indiretamente desses organismos contêm um alto teor de EPA e DHA. Ovos, carne de boi, porco e frango podem fazer contribuições significativas, mas bem menores do que certos peixes, à ingestão de ω-3 de cadeia longa.

Os mamíferos dispõem de todas as enzimas necessárias para sintetizar ácidos graxos ω-3 de cadeia longa a partir do ácido graxo essencial ω-3 da dieta, o ácido α-linolênico. A despeito disso, várias evidências indicam que as necessidades de EPA e DHA na infância não podem ser supridas por síntese endógena. Considerando-se, ainda, que estes compostos conferem proteção contra certas moléstias, tem-se recomendado uma maior ingestão dos próprios ácidos graxos de cadeia longa. Mesmo o teor de ácido α-linolênico da dieta é menor do que o desejável. Nas sociedades industrializadas, houve queda da utilização de gorduras animais, de peixes inclusive, ricas em ω-3, e aumento do emprego de óleos vegetais com alta concentração de ácido linoleico (ω-6). A ingestão de α-linolênico deve ser aumentada, embora ainda não haja consenso sobre a proporção adequada de ácidos graxos ω-6/ω-3 da dieta.

A composição de lipídios plasmáticos é influenciada pelos lipídios da dieta

A gordura dietética, sua quantidade e qualidade, é o fator de risco modificável mais importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Os lipídios presentes na dieta, em especial os ácidos graxos dos triacilgliceróis, exercem forte interferência sobre o teor de colesterol plasmático, o qual se correlaciona diretamente com a incidência de aterosclerose.

Os ácidos graxos saturados promovem o aumento do nível plasmático do LDL-colesterol e de triacilgliceróis. Os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ω-6 (de óleos vegetais, em geral) têm efeito oposto: reduzem o LDL-colesterol e, discretamente, o HDL-colesterol. Os ácidos graxos monoinsaturados determinam uma composição mais adequada das lipoproteínas plasmáticas, diminuindo a fração LDL sem alterar a fração HDL, que é a fração protetora.

O azeite de oliva é especialmente rico em triacilgliceróis contendo ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico (18:1 Δ9 ω-9). A recomendação para o consumo de azeite de oliva originou-se da constatação de que ele constitui a maior fonte de gordura utilizada pelas populações da região do Mar Mediterrâneo, que apresentam baixa incidência de aterosclerose. Diversos estudos demonstram que indivíduos com hipercolesterolemia, quando submetidos a dieta com baixo teor de lipídios, mas constituídos principalmente por ácidos graxos monoinsaturados, apresentam queda dos níveis de colesterol plasmático total, assim como de triacilgliceróis, com um aumento relativo de HDL-colesterol. Os óleos de soja e canola também são ricos em ácidos graxos monoinsaturados (Tabela 18.9).

Tabela 18.9 Teor[1] de ácidos graxos de óleos vegetais e de peixe.

	Óleos					
	Girassol	Oliva	Milho	Soja	Canola	Peixe marinho[2]
Ácidos graxos						
Saturados	12,1	17,1	14,5	15,5	6,8	34,1
Monoinsaturados						
Oleico	18,6	71,1	27,5	23,4	64,1	14,4
Palmitoleico	0,1	1,2	0,1	0,1	0,2	13,2

Outros[3]	—	—	—	—	1,0	2,1
Total de monoinsaturados	18,7	72,3	27,6	23,5	65,3	29,7
Poli-insaturados						
ω-6						
Linoleico	68,2	10,0	57,0	53,2	18,7	1,2
Araquidônico	—	—	—	—	—	—
Outros[3]	—	—	—	—	—	0,5
Total de ω-6	68,2	10,0	57,0	53,2	18,7	2,8
ω-3						
α- linolênico	0,5	0,6	0,9	7,8	9,2	1,0
Eicosapentaenoico (EPA)	—	—	—	—	—	18,1
Docosaexaenoico (DHA)	—	—	—	—	—	8,7
Outros[3]	—	—	—	—	—	2,5
Total de v-3	0,5	0,6	0,9	7,8	9,2	30,3
Total de poli-insaturados	68,7	10,6	57,9	61,6	27,9	33,1

[1] Porcentagem dos ácidos graxos totais.

[2] Variedade de peixe da família do arenque.

[3] Ácidos graxos minoritários.

Numerosos estudos indicam que os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa do tipo ω-3, principalmente EPA e DHA, atuam favoravelmente na prevenção e no tratamento de doenças cardiovasculares. Estes ácidos graxos têm forte ação antitrombótica (a trombose é a maior complicação da aterosclerose — Seção 20.8) e exercem o efeito mais apropriado sobre os lipídios plasmáticos: reduzem os níveis de triacilgliceróis e de LDL-colesterol e aumentam o HDL-colesterol. Outro efeito fisiológico desses ácidos graxos é reduzir a resposta inflamatória sistêmica, o que acarretaria proteção contra várias doenças, além da aterosclerose. Por outro lado, novos dados sugerem que existe uma

associação entre o aumento de sua ingestão e o risco de câncer de próstata. Em resumo, os mecanismos moleculares da atuação dos ω-3 de cadeia longa são muito diversificados e parcialmente compreendidos.

O desenvolvimento de gorduras industrializadas ocasionou não apenas um maior consumo de ácidos graxos do tipo ω-6, como também de ácidos graxos *trans*. Estes ácidos graxos contêm uma ou mais duplas ligações com configuração *trans*, enquanto as dos ácidos graxos naturais têm configuração *cis*. As duplas ligações com configuração *trans*, ao contrário das duplas ligações *cis*, não produzem dobras nas moléculas, que se associam de modo tão compacto quanto os ácidos graxos saturados (Seção 6.2.1). Os ácidos graxos *trans* podem, assim, modificar a viscosidade de membranas, uma característica decisiva para diversas funções a elas associadas. Estudos clínicos e epidemiológicos indicam que o consumo de ácidos graxos *trans* correlaciona-se com o risco aumentado de doenças coronarianas — eles provocam aumento do LDL-colesterol na mesma proporção que os saturados e redução do HDL-colesterol, um efeito ainda mais adverso do que aquele determinado pelos ácidos graxos saturados, que não alteram o HDL-colesterol. Os ácidos graxos *trans*, obviamente, não apresentam atividade de ácidos graxos essenciais.

A maior fonte de ácidos graxos *trans* é a *gordura hidrogenada*, também chamada de *gordura vegetal* — 90 a 95% dos *trans* da dieta são dela derivados. A gordura hidrogenada é obtida por hidrogenação parcial de óleos vegetais contendo ácidos graxos insaturados, que eleva o seu ponto de fusão, propiciando uma consistência sólida à temperatura ambiente e uma maior estabilidade; neste processo, há saturação da maioria das duplas ligações *cis* e transformação de parte delas em ligações *trans*. A hidrogenação parcial de óleos é utilizada na fabricação de *margarinas* e *gorduras para fritura* — os ácidos graxos *trans* são encontrados em alimentos industrializados tais como bolachas, bolos, tortas, sorvetes e frituras em geral. Pequenas quantidades de ácidos graxos *trans* são encontradas na natureza, em algumas plantas e em carnes e laticínios derivados de animais ruminantes; nestes animais resultam de fermentação pela microflora do rúmen.

A quantidade de ácidos graxos *trans* presentes na dieta deve ser a menor possível, já que não há recomendação de sua ingestão.

Os efeitos do teor de colesterol da dieta sobre a sua concentração no plasma têm sido questionados. O colesterol é encontrado em tecidos animais, sendo muito abundante em miolo (cérebro) e gema de ovo (Tabela 18.10); é praticamente ausente dos vegetais. Em geral, os alimentos que contêm colesterol são ricos em ácidos graxos saturados, os verdadeiros responsáveis pela alteração do perfil de lipídios plasmáticos. O ovo é o único produto animal rico em colesterol e pobre em gordura saturada: o seu consumo não afeta as lipoproteínas e os triacilgliceróis plasmáticos; além disto, trata-se de um alimento de alto valor nutritivo (Seção 18.2.1).

Tabela 18.10 Teor de colesterol nos alimentos.

Alimento	Teor de colesterol (mg/100 g)
Miolo	2.000
Ovos[1]	400
Fígado e outras vísceras de boi	350
Manteiga	300
Salmão	80
Carne bovina magra	80
Queijo branco	60

[1] 100 g equivalem a dois ovos de tamanho médio cozidos.

As recomendações gerais para a composição de lipídios de uma dieta saudável são: manutenção de baixos teores de lipídios totais (25 a 30% do conteúdo calórico da dieta) e de gorduras saturadas (no máximo 10% das calorias totais), a menor quantidade possível de ácidos graxos *trans* e diminuição do teor de ácidos graxos ω-6 (ácido linoleico), acompanhada por aumento daquele de ω-3 (ácido α-linolênico, encontrado nos óleos vegetais como de soja e canola) e de ω-3 de cadeia longa (EPA e DHA, por meio do consumo de peixes). Dietas vegetarianas são menos apropriadas que dietas onívoras, por apresentarem razões linoleico/α-linolênico mais elevadas e teores muito baixos de ω-3 de cadeia longa.

18.3 Desnutrição

A desnutrição torna o indivíduo vulnerável a doenças

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 — o fator determinante desta situação é, primordialmente, econômico.

Uma pesquisa sobre desnutrição crônica infantil realizada com crianças brasileiras[3] utilizou como indicador do estado nutricional a prevalência de déficit de altura em relação à idade. A proporção de crianças desnutridas no país teve redução expressiva em 35 anos, mas ainda é quase três vezes maior que a porcentagem de desnutridos considerada aceitável pelas organizações internacionais de saúde. Nas crianças menores de 5 anos de idade, a taxa de desnutrição é de 6%, atingindo quase um bilhão de crianças. A prevalência de desnutrição variou segundo os indicadores socioeconômicos, sendo inversamente proporcional à renda, ao contrário do excesso de peso.

Duas síndromes de desnutrição são muito frequentes: kwashiorkor e marasmo.

O *kwashiorkor* é a doença do desmame, que afeta o primeiro filho, depois do nascimento do segundo — a palavra *kwashiorkor* significa “segundo filho” em um dialeto africano. A moléstia se manifesta em crianças após a interrupção do aleitamento, quando elas passam a ingerir alimentos contendo principalmente carboidratos e com teor reduzido 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), ulcerações na pele, cabelos brancos ou avermelhados, lesões hepáticas e do tubo digestório, queda da resistência a infecções etc. O balanço de nitrogênio é, naturalmente, negativo.

O *marasmo* é causado por deficiência proteica associada à deficiência calórica; é ainda mais comum que o kwashiorkor e distingue-se dele por uma diminuição ainda mais acentuada de peso, acompanhada por redução extrema da musculatura e ausência de edema. A deficiência generalizada de nutrientes, inclusive carboidratos, resulta em hipoglicemia crônica, que determina uma razão 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 séricos de albumina compatíveis com a ausência de edema.

Marasmo e kwashiorkor nem sempre são síndromes inteiramente distinguíveis, pois encontra-se toda a 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 (Tabela 5.13, Seção 5.9) e a vitamina C; são componentes de coenzimas, cuja atuação nas reações do metabolismo tem sido 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, incluindo óleos, ou alimentos animais ricos em gordura; são absorvidas no intestino delgado juntamente com os lipídios e, como estes, incorporadas em quilomícrons. Estão implicadas em processos fisiológicos bastante variados.

A vitamina A, obtida principalmente a partir de carotenoides vegetais, está envolvida nas reações da visão e no crescimento e diferenciação celular; devido a esta última ação, o ácido retinoico, uma das formas da vitamina A, tem sido utilizado para estimular a renovação da epiderme. Compostos precursores da vitamina D, presentes nos alimentos ou na pele de animais (como o 7-deidro-colesterol, um derivado do colesterol), são convertidos por radiação ultravioleta em formas inativas da vitamina, que, após sofrerem modificações enzimáticas no fígado e rim, passam a exibir atividade de hormônios reguladores do metabolismo de cálcio e fosfato; diversas outras funções da vitamina D têm sido descritas e sua deficiência, relacionada com o desenvolvimento de síndrome metabólica.

A vitamina E localiza-se, predominantemente, na bicamada lipídica de membranas celulares e na monocamada lipídica de lipoproteínas plasmáticas. Sua função principal é evitar que os ácidos graxos insaturados constituintes dessas estruturas sejam oxidados por radicais livres. Além da vitamina E, os carotenoides e as vitaminas A e C também agem como antioxidantes, bloqueando a ação lesiva de radicais livres sobre as estruturas celulares. Estudos populacionais têm mostrado uma correlação significativa entre a incidência de câncer e doenças cardiovasculares, e o baixo consumo de vitaminas antioxidantes e 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.

A vitamina K participa como cofator de reações de carboxilação de resíduos de glutamato de várias proteínas, dentre as quais os fatores responsáveis pela coagulação sanguínea.

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 de diversas enzimas, por exemplo, a glutationa peroxidase, responsável pela dissipação de peróxidos; assim, o selênio, além das vitaminas citadas, participa do sistema antioxidante do organismo.

Bibliografia

Aranceta J, Pérez-Rodrigo C: Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *Br J Nutr* **107**: S8-S22, 2012.

Brouns F *et al*.: Cholesterol-lowering properties of different pectin types in mildly hypercholesterolemic men and women. *Eur J Clin Nutr* **66**: 591-599, 2012.

Dietary Guidelines for Americans 2010. U.S. Department of Health and Human Services — U.S. Department of Agriculture (USDA). www.dietaryguidelines.gov.

Dinsa GD *et al*.: Obesity and socioeconomic status in developing countries: a systematic review. *Obes Rev* **13** (11): 1067-1079, 2012.

Elango R *et al*.: Recent advances in determining protein and amino acid requirements in humans. *Br J Nutr* **108**: S22-S30, 2012.

Finucane MM *et al.* National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* **377** (9765): 557-567, 2011.

Flegal KM *et al*.: Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. *JAMA* **307** (5): 491-497, 2012.

Gibson RA *et al*.: Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr* **7** (Suppl s2): 17-26, 2011.

Khandekar MJ *et al*.: Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer* **11** (12): 886-895, 2011.

Konkel A, Schunck WH: Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta* **1814**: 210-222, 2011.

Marino JS *et al*.: Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* **22** (7): 275-285, 2011.

McDonald E: Vitamins and cofactors: highlights of ESBOC. *Nat Chem Biol* **5** (8): 530-533, 2009.

Oken E *et al*.: Which fish should I eat? Perspectives influencing fish consumption choices. *Environ Health Perspect* **120** (6): 790-798, 2012.

Pawlak R *et al*.: How prevalent is vitamin B(12) deficiency among vegetarians? *Nutr Rev* **71** (2): 110-117, 2013.

Protein and amino acid requirements in human nutrition, 2007. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations — Report of a joint WHO/FAO/UNU expert consultation. WHO Technical Report Series, No. 935.

Schaafsma G *et al*.: Advantages and limitations of the protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS) as a method for evaluating protein quality in human diets. *Br J Nutr* **108**: S333-S336, 2012.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, 2011 — Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA) — Universidade Estadual de Campinas — UNICAMP. http://www.unicamp.br/nepa/taco/.

Thompson AK *et al.*: *Trans* fatty acids, insulin resistance and diabetes. *Eur J Clin Nutr* **65**: 553-564, 2011.

Wacker M, Holick MF: Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* **5** (1): 51-108, 2013.

[1]O homem utilizado como referência tem entre 19 e 30 anos, 1,78 m de altura e 70 kg; a mulher tem entre 19 e 30 anos, 1,63 m de altura e 57 kg. O estilo de vida considerado é do tipo sedentário, incluindo somente as atividades físicas leves do dia a dia.

[2]Calorias adicionais à dose recomendada.

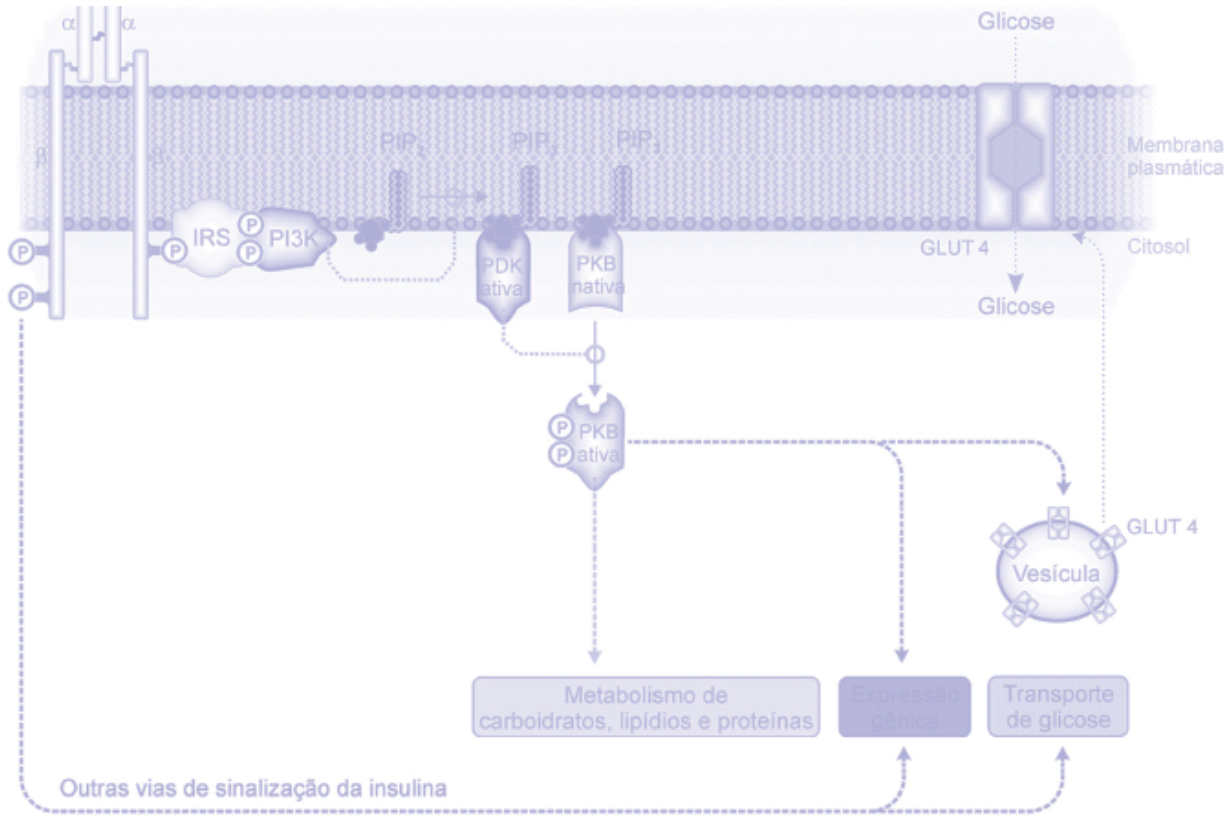
[3]*Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil — Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) — www.ibge.gov.br.

OceanofPDF.com

Parte 4

Regulação do Metabolismo

19 Estratégias de Regulação do Metabolismo
20 Regulação das Vias Metabólicas Principais
21 Regulação Integrada do Metabolismo
22 Contração Muscular



OceanofPDF.com

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, a ingestão periódica de alimentos submete o organismo humano a situações opostas que se alternam: abundância e escassez de nutrientes. A adaptação a esta variação deriva de sistemas reguladores capazes, não só de reconhecer a situação nutricional vigente, como de responder apropriadamente a ela. Após uma refeição, as moléculas absorvidas são convertidas em compostos de reserva, utilizados nos períodos de jejum, além de seguirem outros destinos metabólicos. A glicose, por exemplo, poderá ser oxidada a CO_2 e H_2O, mas poderá também gerar o esqueleto de carbono de aminoácidos não essenciais, ser polimerizada a glicogênio ou ser convertida a gordura.

As vias metabólicas não funcionam sempre com a mesma velocidade. Ao contrário, cada via será acionada com intensidade variada, segundo a situação fisiológica considerada, que depende não apenas de estados nutricionais diferentes, mas, também, de demandas energéticas diferentes, como no repouso ou sob exercício vigoroso. A adequação do metabolismo às diferentes condições fisiológicas é obtida 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, à distância, em outros órgãos. A complexidade do processo é enorme, mas justifica-se por permitir um ajuste sensibilíssimo do metabolismo a diferentes situações, propiciando uma resposta pronta e logicamente organizada.

Diante desta complexidade, ***a regulação metabólica é descrita nas seguintes etapas***:

1ª) ***Estratégias*** de que o organismo dispõe para regular o metabolismo — este capítulo (Capítulo 19)
2ª) ***Regulação das vias metabólicas*** apresentadas na *Parte 3 | Metabolismo: Vias Principais*, Capítulo 20
3ª) ***Regulação metabólica integrada*** — Capítulo 21. Os dados recolhidos em cada uma das vias são combinados para descrever a regulação metabólica integrada, frente a situações escolhidas como exemplos: abundância e escassez de nutrientes, e diabetes. Esta descrição compreende o metabolismo de alguns órgãos e a influência dos hormônios considerados mais relevantes
4ª) ***Contração muscular*** — Capítulo 22. São analisadas as fontes de energia utilizadas pelo organismo para o exercício e as adaptações do metabolismo a esta situação.

Invariavelmente a regulação metabólica é feita por interferência 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 reações relacionadas. Assim, o efeito é propagado para todas as vias metabólicas.

As formas mais decisivas de interferir na velocidade de uma reação catalisada são, 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 produzido 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 transcrição do gene que codifica a enzima: pode ser ativada ou inibida, levando à indução ou à repressão da síntese da

enzima, respectivamente. A regulação da transcrição gênica é complexa, podendo ser exercida por fatores que vão desde a concentração do substrato sobre o qual a enzima atua, até hormônios específicos. Por exemplo, uma dieta rica em carboidratos provoca aumento da expressão de genes que codificam enzimas da glicólise. Estas alterações, em alguns casos, resultam de interação da própria glicose com sequências reguladoras dos promotores dos genes e, em outros, são devidas à atuação de efetores ativados nas vias de sinalização da insulina (Seção 19.4), cuja secreção é estimulada por glicose.

A velocidade de degradação de uma enzima também sofre controle rigoroso, embora pouco conhecido. O tempo de permanência das enzimas nas células varia, ou seja, têm meias-vidas diferentes (Tabela 17.1, Seção 17.1). Em geral, as enzimas que catalisam reações-chave do metabolismo têm meias-vidas curtas.

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 prevalecentes. Tais desvios seriam dificultados se a concentração das enzimas permanecesse constante em qualquer condição.

Ao longo dos capítulos subsequentes, são apresentados muitos exemplos de mudanças do conteúdo celular de enzimas, que constituem respostas do organismo a situações fisiológicas diversas. A Tabela 21.1 (Seção 21.1) contém um resumo de enzimas importantes cuja síntese é passível de indução.

19.2 Alteração da atividade das enzimas

Além da alteração na concentração da enzima, outro nível de regulação manifesta-se a curto prazo, em tempos da ordem de segundos ou minutos. Mesmo quando a concentração de uma enzima é mantida constante, a velocidade da reação que ela catalisa 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 compostos que são claros indicadores das condições metabólicas da célula. A regulação por modificação covalente está sob influência indireta da ação hormonal, que coordena a resposta do organismo como um todo. O alvo destas regulações são enzimas-chave presentes nas vias metabólicas, as *enzimas reguladoras*, cuja atividade é decisiva para o funcionamento de toda a via.

As regulações alostérica e por modificação covalente têm 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, com um sítio ativo em cada cadeia polipeptídica. A ligação do substrato ao sítio ativo de uma subunidade afeta a conformação das demais, facilitando a ligação das moléculas de substrato aos outros sítios ativos. A cooperatividade estabelecida entre os sítios catalíticos é evidenciada pela cinética da catálise: o gráfico de velocidade da reação em função da concentração de substrato é uma *curva sigmoide*, em vez da *curva hiperbólica* de Michaelis-Menten (Figura 19.1 a). Trata-se do mesmo tipo de cooperatividade, exibida por uma curva sigmoide, 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, uma proteína monomérica, com um único grupo heme, segue uma cinética hiperbólica, como a das enzimas michaelianas, que apresentam, geralmente, uma única cadeia polipeptídica, com um só sítio ativo. 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, o que provoca grandes alterações de sua atividade. Estes metabólitos, os *efetuadores* ou *moduladores alostéricos*, são chamados *positivos* (*ativadores alostéricos*)

ou *negativos* (*inibidores alostéricos*), segundo provoquem aumento ou redução da velocidade da reação catalisada (Figura 19.1 b). O efetuador alostérico liga-se a um nicho específico da estrutura tridimensional da enzima, chamado *centro* ou *sítio alostérico*, que é tão específico para o efetuador 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 efetuadores 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 efetuadores alostéricos atuam como ativadores ou inibidores da reação enzimática.

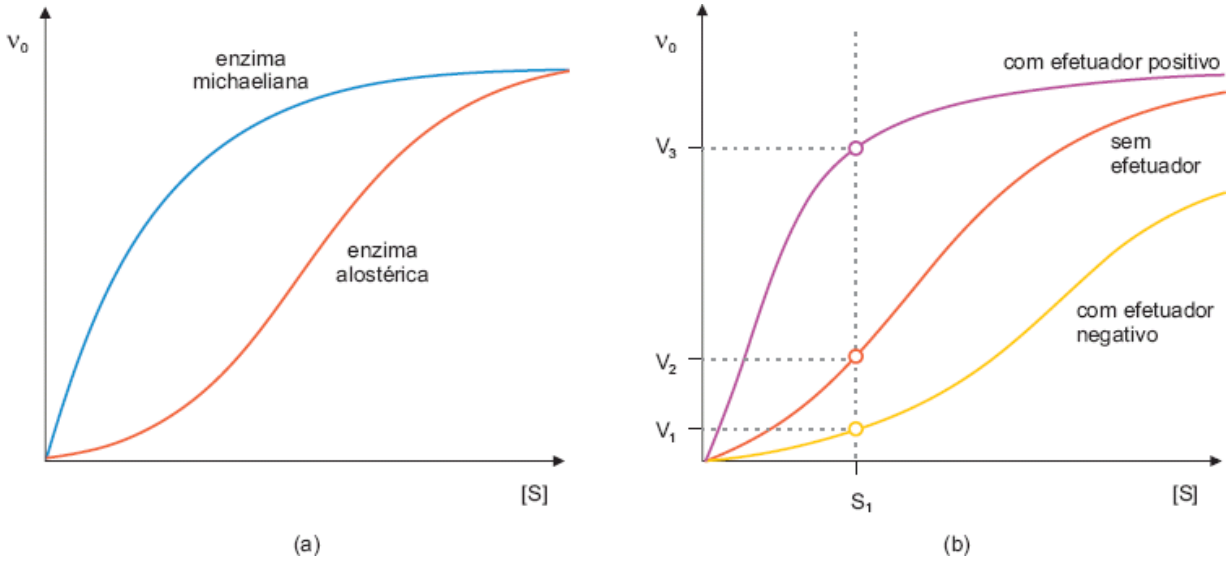


Figura 19.1 a) Gráfico da velocidade de reação em função da concentração de substrato para uma enzima alostérica e para uma enzima michaeliana. A curva sigmoidal exibida pela enzima alostérica é o reflexo da cooperatividade apresentada pelas suas subunidades; as enzimas monoméricas, michaelianas, têm cinética hiperbólica. b) Cinética da reação catalisada por uma enzima alostérica na presença e na ausência de efetuadores alostéricos. Com igual concentração de substrato (S_1), a velocidade da reação varia dependendo da presença de efetuadores.

Como a ligação dos efetuadores à enzima é não covalente e reversível, o percentual de enzima que se encontra na forma ativa ou inativa depende da concentração do efetuador alostérico. Considere-se o esquema simplificado de ligação de uma enzima alostérica a seu efetuador:

Em uma situação fisiológica em que a concentração do efetuador alostérico negativo é baixa, praticamente todas as moléculas de enzima estarão ativas; à medida que a concentração do efetuador aumenta, percentuais crescentes de enzima estarão a ele ligados e, então, inativos. Quando o inibidor alostérico, que é um produto do metabolismo, for consumido por 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 efetuadores alostéricos positivos e negativos, que poderão estar presentes em diferentes concentrações. A velocidade da reação que ela catalisa poderá variar em uma larga faixa: a menor velocidade será obtida na presença de concentrações altas do efetuador negativo, e a maior velocidade, na presença de grandes concentrações do efetuador 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. Notem-se, na Figura 19.1 b, os valores diferentes de velocidade (v_1, v_2, v_3), obtidos com a concentração S_1 de substrato.

Nas vias metabólicas é frequente que um produto final atue como efetuador alostérico negativo de uma enzima alostérica que catalisa uma das primeiras reações da via (Figura 19.2). Quando a concentração celular deste produto aumenta, 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 sequências metabólicas e sua concentração diminui, percentuais crescentes de enzima voltam à forma ativa, aumentando a velocidade da via. A participação da enzima reguladora em uma etapa inicial da via é estratégica, constituindo um fator de economia celular, por impedir o acúmulo indevido de compostos

intermediários que poderiam interferir de modo negativo sobre outras vias. Muitas vezes, o produto final de uma via atua também como efetuador alostérico positivo em outra via metabólica que utiliza o mesmo substrato inicial. Naturalmente, a regulação desta segunda via 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.

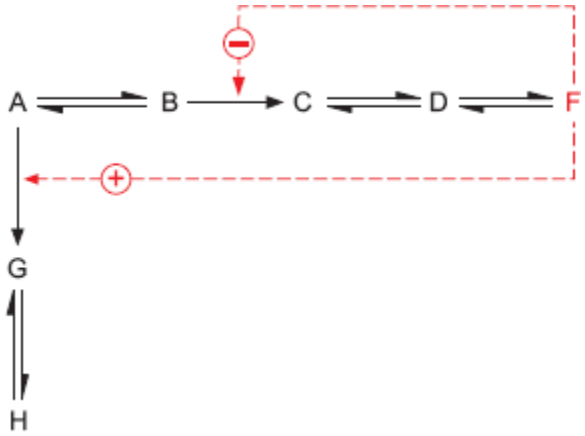


Figura 19.2 Regulação alostérica de duas vias metabólicas hipotéticas. O composto F é efetuador alostérico negativo da enzima que catalisa a conversão de B em C e efetuador alostérico positivo da enzima que converte A em G — a oferta de A resulta em síntese aumentada de H.

Algumas coenzimas são efetuadores alostéricos importantes

A função de modulador alostérico não é exercida apenas por compostos intermediários do metabolismo, sendo muito frequente que coenzimas também desempenhem este papel. Uma coenzima pode participar de uma reação exercendo o seu papel precípuo de coenzima, ligando-se ao sítio ativo da enzima ou atuar como efetuador alostérico de outra enzima, ligando-se ao sítio alostérico e alterando a velocidade da reação — o NADH, além de ser uma coenzima transportadora de hidrogênio, atua como efetuador alostérico de enzimas do ciclo de Krebs regulando a velocidade do ciclo. Casos mais complexos ocorrem quando a coenzima de uma reação atua como inibidor alostérico da enzima que catalisa a reação, sendo

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.

A Tabela 19.1 alista as enzimas alostéricas mais relevantes e seus principais efetuadores positivos e negativos.

Tabela 19.1 Enzimas alostéricas e seus efetuadores.

	Efetuadores alostéricos	
Enzima	**Negativos**	**Positivos**
Fosfofrutoquinase 1	ATP, Citrato	AMP, Frutose 2,6-bisfosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 2,6-bisfosfato	
6-Fosfofruto-2-quinase	Fosfoenolpiruvato	
Frutose 2,6-bisfosfatase	Frutose 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato
Piruvato quinase	Alanina	Frutose 1,6-bisfosfato
Piruvato carboxilase		Acetil-CoA
Piruvato desidrogenase	Acetil-CoA, NADH	Piruvato
Isocitrato desidrogenase	NADH	ADP
α-Cetoglutarato desidrogenase	Succinil-CoA, NADH, ATP	
Carnitina acil transferase I	Malonil-CoA	
Citrato liase	Acil-CoA	
Acetil-CoA carboxilase	Acil-CoA	Citrato

As coenzimas, mesmo quando não agem como efetuadores 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 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 vias metabólicas diferentes, algumas das quais consomem a forma oxidada da coenzima, e outras, a forma reduzida. É o caso do 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 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 citosol, inibe as desidrogenases da via das pentoses-fosfato; somente quando processos de sínteses redutoras, como a síntese de ácidos graxos, fazem diminuir a concentração citosólica de NADPH e aumentar a de $NADP^+$, as desidrogenases e, por consequência, a via das pentoses podem funcionar.

Tendo em vista que a soma das concentrações celulares das duas formas de uma coenzima — (NAD^+ + NADH), (ATP + ADP) etc. — é constante, o aumento da concentração de uma das formas é sempre acompanhado pela diminuição da outra forma. Adicionalmente, a proporção entre as duas formas varia com o compartimento celular.

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 citosol, desviando a reação catalisada pela lactato desidrogenase no sentido da formação de lactato, regenerando NAD^+ (Seção 9.1.1).

A localização intracelular aprimora o controle da atividade de enzimas

Nas células eucarióticas, a existência de organelas propicia uma forma adicional de controle enzimático. Uma enzima pode ser expressa em dois compartimentos celulares diferentes e ser deslocada de um para o outro, segundo o estado fisiológico vigente, como acontece com a glicoquinase (Seção 20.2). As organelas proveem microambientes diferenciados nos quais as concentrações de substratos ou efetuadores alostéricos podem ser mais estritamente reguladas, por meio do controle de suas transferências através de membranas.

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. A modificação resultante em sua conformação provoca desde mudanças na afinidade pelo substrato ou na sensibilidade a efetuadores alostéricos, até sua completa inativação.

A modificação covalente constitui uma reação química catalisada por enzimas, ao contrário da ligação não covalente de efetuadores alostéricos. A mudança de atividade não é definitiva, pois este sistema de controle 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 frequente consiste na fosforilação da cadeia polipeptídica.

A fosforilação é catalisada por *proteína* quinases (*PK*, de *Protein Kinase*)[1] e a transferência do grupo fosfato terminal do ATP é feita para resíduos específicos de serina, treonina ou tirosina, formando uma ligação éster fosfórico:

$$\text{Proteína} - \text{OH} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Proteína} - \text{O} - \text{Ⓟ} + \text{ADP} + \text{H}^+$$

Em cada tecido há determinadas proteínas que são substratos das proteína quinases. A fosforilação pode transformá-las de inativas em ativas, ou vice-versa (Tabela 19.2). As próprias proteína quinases estão sujeitas a regulação, podendo ser ativadas por mecanismos diversos, mediados por AMP cíclico, fosfolipídios, íons Ca^{2+} etc. (Seção 19.4).

A retirada do grupo fosfato, introduzido pela ação das proteína quinases, é catalisada pelas *fosfoproteína fosfatases* (*PP*, de ***P****hosphoprotein* ***P****hosphatases*), por hidrólise:

$$\text{Proteína} - \text{O} - \text{Ⓟ} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Proteína} - \text{OH} + \text{P}_i$$

Tabela 19.2 Modificação da atividade enzimática por fosforilação.

Via metabólica	Enzima fosforilada	Forma
Glicogenólise	Glicogênio fosforilase quinase	Ativa
	Glicogênio fosforilase	Ativa
Glicogênese	Glicogênio sintase	Inativa
Glicólise e gliconeogênese	6-Fosfofruto-2-quinase	Inativa
	Frutose 2,6-bisfosfatase	Ativa
	Piruvato quinase	Inativa
Piruvato → Acetil-CoA	Piruvato desidrogenase	Inativa
Lipólise	Lipase	Ativa
Lipogênese	Citrato liase	Inativa
	Acetil-CoA carboxilase	Inativa
	3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase	Inativa

O controle da atuação das fosfoproteína fosfatases (designadas 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 da enzima que estiver ativada: proteína quinase ou fosfoproteína fosfatase. Exemplos destas possibilidades são mostrados neste e no próximo capítulo.

Nos animais superiores, a modificação covalente de enzimas constitui o resultado de vias de regulação metabólica, que efetuam o que se costuma chamar de “transdução” de sinal.

19.3 Transdução de sinal

Transdução (*transformação, tradução*) *de sinal* é o processo que confere às células a capacidade de receber e processar estímulos originados do meio ambiente (luz, odorantes) ou do próprio organismo (hormônios, neurotransmissores). Qualquer que seja o estímulo, o circuito que integra este processo é formado por componentes comuns: o sinal inicial, o receptor do sinal, a transdução propriamente dita, que consiste na transformação do estímulo em um composto químico, e a resposta celular. As respostas geradas são variadas e podem incidir sobre a atividade de enzimas, a expressão gênica e a transmissão do impulso nervoso. A maioria das vias de transdução de sinal compreende a interação de estímulos físicos ou químicos com receptores situados na membrana plasmática.

Os *receptores* são proteínas integradas da membrana celular, geralmente contendo três motivos: um imerso na bicamada lipídica e dois expostos nas porções externa e interna da membrana; transmitem a informação recebida do exterior para o meio intracelular, sem que o estímulo inicial penetre na célula. Os receptores são específicos para cada estímulo e, quando o sinal é um composto químico, guarda com ele a mesma relação de especificidade de uma enzima com seu substrato; são ainda característicos de determinados órgãos ou tecidos. Em muitos receptores, a cadeia polipeptídica atravessa várias vezes a membrana, formando sete α-hélices, sendo chamados de *receptores hepta-helicoidais* ou *7TM* (de *seven transmembrane helical regions*) (Figura 2.12). Esta classe de receptores constitui uma família com mais de 1.000 representantes em mamíferos e são a “antena” para o recebimento de sinais externos, como fótons (no caso da visão), substâncias voláteis (estímulo para o olfato), moléculas não voláteis (relacionadas ao paladar) ou sinais de origem endógena, como hormônios e neurotransmissores. Estes sinais são transmitidos para o interior das células, onde provocam mudanças na fisiologia celular, devidas à alteração da conformação de proteínas, por fosforilação ou ligação com íons cálcio, ou modificação do funcionamento (abertura ou fechamento) de canais iônicos.

A transdução de sinais endógenos está descrita na Seção seguinte, que trata da ação hormonal; as vias de transdução de estímulos luminosos e olfatórios estão resumidas na Seção 19.5.

19.4 Ação hormonal

Os mamíferos têm seu metabolismo regulado de forma global e integrada. Nestes organismos, há uma especialização de funções, distribuídas pelos diferentes órgãos ou tecidos, como consequência da diferenciação celular. O conjunto de enzimas sintetizadas em um órgão atribui a ele capacidades metabólicas específicas. Por exemplo, os hepatócitos são capazes de sintetizar e degradar lipídios; as fibras musculares apenas degradam estes compostos e hemácias nem sintetizam nem degradam lipídios. Embora desempenhando papéis específicos, os tecidos não são autônomos, devendo agir de forma concertada. A coordenação das respostas dos diversos órgãos e tecidos ao mesmo sinal depende de sistemas de comunicação, que permitem a reação adequada do organismo como um todo — o sistema endócrino e o sistema nervoso são os responsáveis pela integração das funções vitais nos animais.

Os hormônios são os primeiros mensageiros do sistema endócrino

Os hormônios são sintetizados pelo sistema endócrino e secretados na corrente sanguínea. Atuam sobre tecidos específicos, provocando respostas também específicas, mas o conjunto das respostas é cooperativo, tornando lógico e harmônico o ajuste do organismo a uma determinada condição fisiológica. Ao atingirem células sensíveis, as *células-alvo*, provocam modificações de seu metabolismo por interferência na atividade de enzimas, no controle da expressão gênica ou no transporte através de membranas. São os *primeiros mensageiros* químicos, extracelulares, do sistema endócrino.

Alguns tipos importantes de hormônios são os *esteroides* (cortisol, aldosterona, estradiol, progesterona, testosterona), os *tireoidianos* (tiroxina, tri-iodotironina), os *peptídicos* (insulina, glucagon, hormônio do crescimento) e as *catecolaminas* (adrenalina, noradrenalina).

Os receptores hormonais situam-se na membrana plasmática, no citosol ou no núcleo das células-alvo

A ação hormonal é iniciada pela interação do hormônio com receptores específicos presentes nas células-alvo. Nessas células, de acordo com o tipo de hormônio, podem situar-se na membrana plasmática, no citosol ou no núcleo. 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 serem secretados no plasma, os hormônios são distribuídos por todo o organismo e é a presença do receptor que torna uma célula responsiva ao hormônio.

A quantidade de receptores presentes nas células varia em função da concentração do hormônio circulante. Existem diversos processos reguladores responsáveis por este ajuste, sendo que, mais frequentemente, ocorre uma diminuição do número de receptores em resposta a níveis altos do hormônio. Certos hormônios unem-se a receptores localizados na membrana plasmática, provocando a manifestação celular, e, posteriormente, os complexos hormônio-receptor são internalizados por endocitose adsortiva (Seção 7.4.2). As vesículas contendo os complexos fundem-se com lisossomos, onde o hormônio é dissociado do receptor e degradado; uma parte dos receptores também é degradada e outra parte é reciclada para a membrana. A junção do hormônio ao receptor determina uma diminuição transitória do número de receptores presentes na membrana celular. Cessado o estímulo hormonal, o número de receptores é restabelecido por síntese proteica.

Os receptores de diversos *hormônios esteroides* são proteínas presentes no citosol das células-alvo. O caráter hidrofóbico destes hormônios permite sua difusão pela membrana plasmática, propiciando sua ligação aos receptores. Os complexos hormônio-receptor deslocam-se para o núcleo e fixam-se a sequências específicas do DNA. Os hormônios tireoidianos agem de modo semelhante, mas têm seus receptores no núcleo. Estes dois tipos de hormônios atuam no nível da expressão gênica, alterando a velocidade de transcrição de determinados genes; geralmente, ocorre a ativação da transcrição gênica, com a consequente produção de proteínas. A resposta do tecido ao estímulo hormonal é consequência da ação destas proteínas.

Os receptores dos *hormônios peptídicos* e das *catecolaminas* localizam-se na membrana plasmática. A formação do complexo hormônio-receptor inicia a transdução do sinal hormonal, descrita a seguir.

19.4.1 AMP cíclico e a via da proteína quinase A

A produção do segundo mensageiro da ação hormonal é uma etapa do processo de transdução de sinal

A transdução de sinal, iniciada com a ligação do hormônio a seu receptor na membrana plasmática, leva à produção intracelular de um *segundo mensageiro* da ação hormonal. A atuação deste segundo mensageiro sobre as reações processadas na célula-alvo resulta na resposta característica de um tecido a um determinado hormônio, sem que este tenha sido introduzido na célula. O processo compreende, geralmente, o acoplamento do complexo hormônio-receptor a uma proteína G, seguido pela interação desta proteína com uma enzima, que, então, catalisa a produção do segundo mensageiro. As *proteínas G* compõem uma grande família de proteínas transdutoras, capazes de transformar sinais moleculares externos em sinais intracelulares; são designadas *G* pela propriedade de ligarem-se a nucleotídios de guanina, ***G***DP e ***G***TP.

A alteração da concentração dos segundos mensageiros provoca, como *resposta* ao estímulo inicial, mudanças na fisiologia celular, devidas à alteração da conformação de proteínas, por fosforilação ou ligação com íons cálcio ou modificação do funcionamento (abertura ou fechamento) de canais iônicos.

Os *segundos mensageiros* de hormônios constituem uma classe de compostos muito diversificados estruturalmente. Alguns exemplos importantes são: AMP cíclico, GMP cíclico, íons Ca^{2+} e derivados de fosfolipídios de membrana.

O *AMP cíclico (cAMP),* ou *adenosina 3′ ,5′ -monofosfato,* é formado a partir de ATP, por ação da *adenilato ciclase*, uma enzima integrada na membrana plasmática. A presença de cAMP nas células irá provocar alterações na atividade de determinadas enzimas e, por consequência, no metabolismo. Estas modificações são temporárias, porque o cAMP pode ser hidrolisado a 5′ -AMP pela reação catalisada pela *fosfodiesterase* (Figura 19.3). A concentração de cAMP e a resposta celular ao hormônio estão na dependência das atividades relativas da adenilato ciclase e da fosfodiesterase.

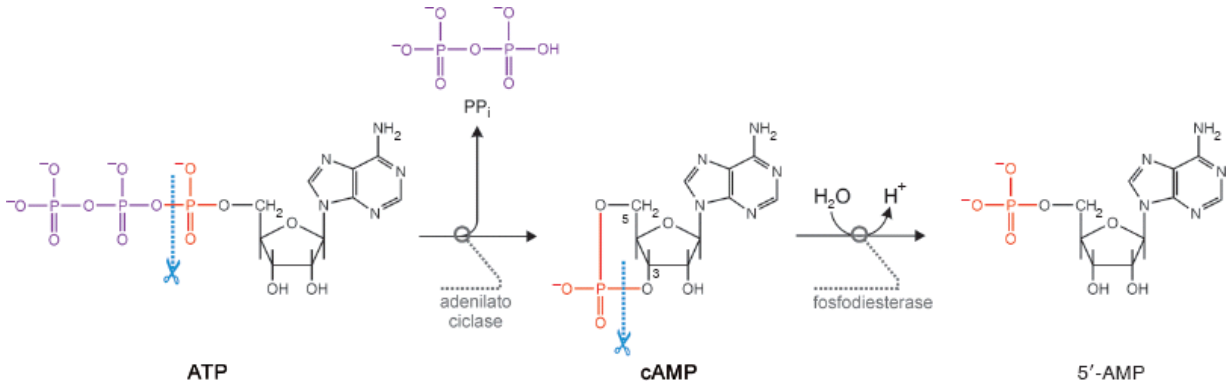


Figura 19.3 Síntese e hidrólise de cAMP. A adenilato ciclase catalisa a conversão de ATP em cAMP, por formação de uma ligação fosfodiéster entre os carbonos 3′ e 5′ da ribose e liberação de pirofosfato (PP_i). A ligação é hidrolisada pela fosfodiesterase, originando 5′-AMP.

A transdução de sinal dos hormônios que utilizam cAMP como segundo mensageiro é, então, efetuada por três proteínas presentes na membrana plasmática: o receptor hormonal, a adenilato ciclase e uma proteína G, que conecta as duas primeiras. 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 (Figura 19.4 a) que levam à produção de cAMP a partir do estímulo hormonal são:

1. Na ausência do hormônio, a proteína G apresenta-se com as subunidades α-β-γ associadas e a subunidade α unida a GDP; a adenilato ciclase está inativa.
2. Quando o hormônio se liga ao receptor, este sofre uma mudança de conformação, que provoca sua ligação à proteína G. Esta união altera a estrutura da proteína G, fazendo diminuir a afinidade da subunidade α por GDP e aumentar a sua afinidade por GTP; em consequência, o GDP é trocado por GTP.
3. A ligação de GTP à subunidade α promove sua dissociação das outras duas subunidades da proteína G, obtendose dois conjuntos: β-γ e α-GTP. Este último associa-se à adenilato ciclase, formando o complexo α-GTP-adenilato ciclase. A ligação de α-GTP estimula a enzima, que catalisa a conversão de ATP em cAMP.

A estimulação da adenilato ciclase tem duração limitada. A própria subunidade α da proteína G tem uma discreta atividade GTPásica, sendo capaz de catalisar a hidrólise lenta de GTP a GDP. Quando isto acontece, há dissociação do complexo α-GDP-adenilato ciclase: a enzima, inativa, é liberada e a subunidade α volta a associar-se às subunidades β-γ, reconstituindo a proteína G, que pode participar de outro ciclo de transdução de sinal. Em virtude da ação GTPásica da subunidade α, a atividade da adenilato ciclase depende estritamente de estimulação hormonal, cessando na ausência do hormônio.

O mecanismo descrito refere-se à ação de hormônios que *ativam* a adenilato ciclase. Outros hormônios determinam *inibição* da adenilato ciclase: são reconhecidos por outro tipo de receptor, que se liga a outro tipo de proteína G, embora o processo que produz a inibição seja análogo ao do estímulo. Ou seja, existem dois tipos de proteínas G: o primeiro deles, designado G_S, com subunidade α chamada α_S (*s* de ***s****timulation*), está associado a receptores de hormônios que provocam o estímulo da adenilato ciclase, denominados R_S (Figura 19.4 b). O segundo tipo é chamado G_i, com subunidade α indicada por α_i (*i* de ***i****nhibition*), 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 à adenilato ciclase. Esta ligação, entretanto, provoca inibição da enzima. Alguns hormônios, como a adrenalina, podem ligar-se, em tecidos diferentes, a receptores R_S ou R_i.

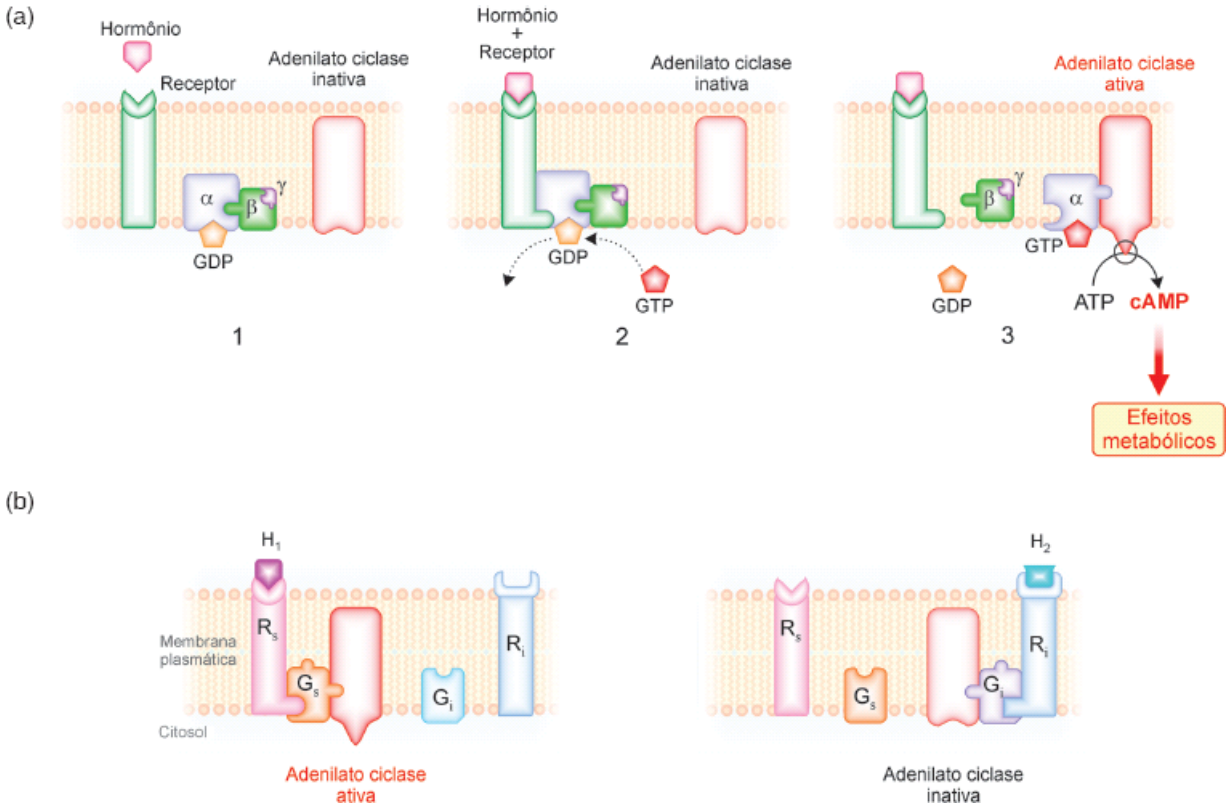


Figura 19.4 a) Transdução de sinal de hormônios que estimulam a adenilato ciclase. 1) Situação prévia à ligação do hormônio ao receptor: proteína G com as três subunidades (a-b-g) associadas e GDP ligado à subunidade a; adenilato ciclase inativa. 2) A formação do complexo hormônio-receptor altera o receptor, causando sua união à proteína G, que, então, troca GDP por GTP. 3) A ligação de GTP à subunidade a da proteína G determina dissociação das subunidades b-g; o complexo a-GTP liga-se à adenilato ciclase, ativando-a. b) Representação esquemática da regulação da adenilato ciclase por hormônios estimuladores (H_1) e inibidores (H_2) da sua atividade. O complexo H_1-R_S une-se a uma proteína G $_S$que ativa a adenilato ciclase, enquanto o complexo H_2-R_i interage com uma proteína G $_i$que inibe a enzima.

O funcionamento de vias de transdução de sinal envolvendo proteínas G pode ser alterado por toxinas bacterianas, ocasionando a instalação de moléstias. A *toxina da cólera*, por exemplo, é uma enzima que catalisa a transferência de uma unidade ADP-ribose do NAD^+ (a remoção da nicotinamida da molécula de NAD^+produz ADP-ribose — Figura 9.2) para

um resíduo de arginina da subunidade α_S de uma proteína G_S. Esta modificação covalente determina a perda da atividade GTPásica de α_S, que permanece ligada a GTP, mantendo a adenilato ciclase estimulada mesmo na ausência do hormônio. A toxina da cólera liga-se à superfície das células da mucosa intestinal e é internalizada; uma vez no citosol, promove a modificação da G_S. O aumento da concentração intracelular de cAMP altera o funcionamento de canais iônicos, acelerando a secreção de íons para a luz intestinal, acompanhada de enorme afluxo de água, ocasionando a diarreia profusa característica da cólera.

A *toxina da coqueluche* (ou *tosse comprida*) catalisa a ADP-ribosilação da subunidade α_i de uma proteína G_i das células epiteliais do trato respiratório. Neste caso, α_i permanece associada a GDP e às subunidades β e γ, ficando impossibilitada de complexar-se com a adenilato ciclase e causar a sua inibição; o resultado é a ativação permanente da enzima. A concentração elevada de cAMP, por mecanismos desconhecidos, provoca dano ao epitélio do trato respiratório, que se reflete em acessos de tosse violenta.

Os níveis de cAMP podem ainda ser aumentados por inibição da fosfodiesterase de cAMP, causada por derivados de purinas, como *cafeína* e *teofilina*. Estas substâncias também atuam como antagonistas dos efeitos fisiológicos da *adenosina*. Este nucleosídio, assim como o ATP (Seção 8.1.2), ocorre também no espaço extracelular e atua como neurotransmissor, ligando-se a receptores purinérgicos presentes na membrana plasmática da maioria das células de mamíferos. Estão descritos quatro receptores de adenosina, do tipo 7TM, que interagem com proteínas G. A adenosina extracelular participa da regulação dos sistemas cardiovascular, nervoso, imunológico e respiratório; neste último caso, provoca broncoconstrição. A teofilina provoca dilatação brônquica e é empregada no tratamento da asma há mais de 70 anos; apesar disto, seu mecanismo de ação ainda é incerto, podendo ser devido à inibição da fosfodiesterase (o aumento da concentração de cAMP causa relaxamento de músculos lisos — Seção 22.6) ou ao bloqueio dos receptores de adenosina, impedindo a broncoconstrição.

O cAMP estimula a proteína quinase A

O aumento intracelular na concentração de cAMP, consequente à ação hormonal, resulta na ativação de um tipo particular de proteína quinase, chamada *proteína quinase dependente de cAMP* ou *proteína quinase A* (*PKA*). 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 se tornam ativas (Figura 19.5), capazes de promover a transferência do grupo fosfato do ATP para resíduos de treonina ou serina de diversas proteínas.

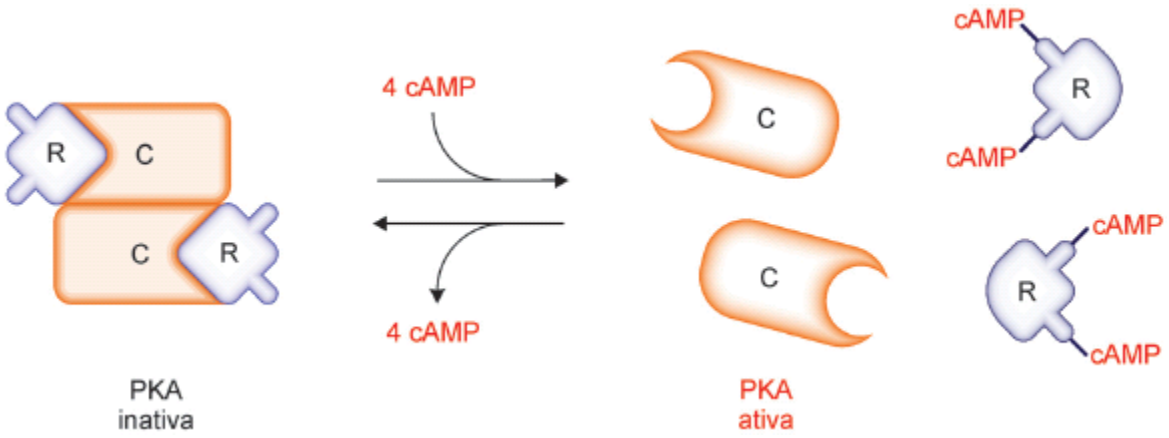


Figura 19.5 Ativação da proteína quinase dependente de cAMP (PKA). A molécula da enzima inativa é formada por quatro subunidades: duas catalíticas (C) e duas reguladoras (R). A ligação de cAMP às subunidades reguladoras libera as subunidades catalíticas, então ativas.

A via de transdução de sinal hormonal descrita até aqui — hormônio complexado ao receptor R_S da membrana plasmática/ligação à proteína G_S/adenilato ciclase estimulada/síntese de cAMP/PKA ativada — é denominada *via da PKA*. Todas as proteínas componentes da via, desde o receptor até a fosfoproteína fosfatase, que finaliza a transdução de sinal (ver a seguir), ficam agrupadas em regiões diferenciadas da membrana, os *rafts* (Seção 7.2), formando uma unidade de transdução de sinal muito eficiente.

A ação catalítica da PKA pode ser exercida sobre inúmeras proteínas; algumas tornam-se ativas em virtude da fosforilação; outras perdem a atividade. Sendo assim, um mesmo hormônio atuando em vários tecidos,

apesar de provocar a mesma sequência inicial de eventos — ativação da via da PKA —, determina alterações diferentes do padrão metabólico em cada tecido, porque as enzimas que serão fosforiladas em cada tecido também serão diferentes. A resposta metabólica obtida dependerá da equipe de proteínas sintetizadas pelo tecido-alvo do hormônio que causou a estimulação da PKA.

A atuação de muitos hormônios peptídicos e de catecolaminas e o desempenho de diversas atividades fisiológicas resultam de ativação da via da PKA. Alguns exemplos:

1. *Hormônios da hipófise*: hormônios adrenocorticotrófico (ACTH), tireoide-estimulante (tirotrofina ou TSH), luteinizante (LH) e foliculoestimulante (FSH), atuando em glândulas endócrinas, onde estimulam a liberação e/ou síntese de hormônios específicos — cortisol, hormônios tireoidianos e hormônios sexuais.
2. *Hormônio antidiurético* (*vasopressina*), atuando no controle da reabsorção de água nos túbulos renais.
3. Atividades sensoriais como a *visão* e o *olfato* (Seção 19.5).
4. *Adrenalina* e *glucagon* (Seção 19.6).

As fosfoproteína fosfatases antagonizam os efeitos da PKA

A fosforilação de proteínas pode ser revertida pelas fosfoproteína fosfatases (PP — Seção 19.2.2), que hidrolisam os grupos fosfato adicionados pelas proteína quinases, PKA inclusive. As próprias fosfoproteína fosfatases são reguladas por modificação covalente: são substratos da PKA e de outras proteína quinases. Um exemplo importante em eucariotos é a *fosfoproteína fosfatase-1* (*PP-1*), que participa da regulação de uma grande variedade de processos celulares. PP-1 é constituída por uma subunidade catalítica, que apresenta baixa atividade e ausência de especificidade para o substrato. Só é capaz de atuar efetivamente, e sobre determinados substratos, quando está associada a uma das 200 subunidades reguladoras diferentes já identificadas. Esta seria a razão da grande versatilidade de atuação de PP-1, porque, dessas associações, resultam formas diferentes da enzima, com especificidade de substrato, localização celular e regulação distintas.

Uma das vias metabólicas reguladas por PP-1 é o metabolismo do glicogênio em mamíferos. O glicogênio e as enzimas que atuam no seu metabolismo e que o regulam organizam-se em grânulos citoplasmáticos. As subunidades reguladoras de PP-1, *GM* em músculos esqueléticos e *GL* no fígado, funcionam como um elo de ligação entre a subunidade catalítica, o glicogênio e as enzimas-substrato de PP-1 (glicogênio sintase, glicogênio fosforilase, glicogênio fosforilase quinase — Seção 20.1), localizadas nos grânulos.

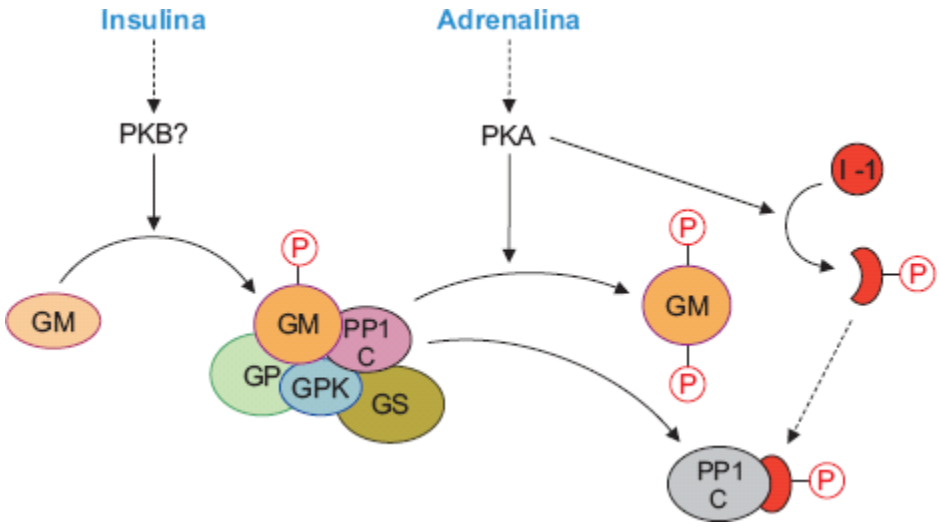


Figura 19.6 Regulação da fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1) em músculos esqueléticos de mamíferos. Na presença de insulina, a adição de grupos fosfato (P) à subunidade GM ativa a subunidade catalítica de PP-1 (PP-1-C), que desfosforila suas três enzimas-substrato: a glicogênio sintase (GS) é ativada; a glicogênio fosforilase (GP) e a glicogênio fosforilase quinase (GPK) são inibidas. Com adrenalina, a fosforilação de GM pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA) causa sua separação da subunidade catalítica, que se dissocia do grânulo de glicogênio. A interação da subunidade catalítica com o Inibidor-1 (I-1), também fosforilado pela PKA, resulta no bloqueio da PP-1. (Adaptada de Nelson DL, Cox MM: *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th ed. W. H. Freeman, 2008.)

A subunidade *GM* de músculos apresenta sítios em sua estrutura que podem ser fosforilados por diferentes proteína quinases (Figura 19.6). Com insulina, a fosforilação de um desses sítios, provavelmente pela PKB, ativa

PP-1, que desfosforila as três enzimas-substrato, levando à ativação da glicogênio sintase e à inativação da glicogênio fosforilase e da glicogênio fosforilase quinase — PP-1 promove o acúmulo de glicogênio, por estimular a síntese e inibir a degradação do polissacarídio. Sob estímulo de adrenalina, a adição de grupos fosfato à subunidade GM pela PKA provoca a dissociação da subunidade catalítica, que se desliga dos grânulos, ficando impossibilitada de atuar sobre os seus substratos. Uma vez livre no citosol, PP-1 pode interagir com uma proteína inibidora, chamada de *Inibidor-1* (*I-1*), e tornar-se totalmente inativa. Para que isto ocorra, o Inibidor-1 deve estar fosforilado, à custa da PKA. Assim, a PKA mantém a PP-1, uma enzima cuja ação é antagônica à sua, na forma inativa.

A regulação do metabolismo do glicogênio continua a ser analisada na Seção 20.1.2.

19.4.2 Íons Ca^{2+} e via da fosfolipase C

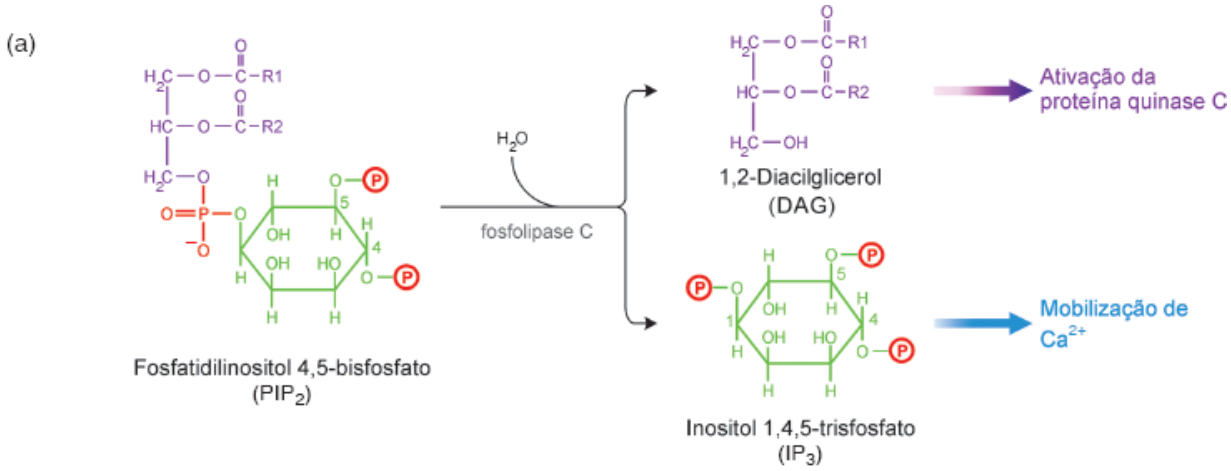
Derivados de fosfolipídios de membrana e íons Ca^{2+} também atuam como segundos mensageiros

Vários hormônios que se ligam a receptores da membrana plasmática utilizam vias de transdução de sinal diferentes da via de ativação da PKA. Um exemplo é a *via do fosfatidilinositol bisfosfato*, também chamada *via da fosfolipase C*.

A formação do complexo hormônio-receptor ativa uma proteína Gq, que estimula uma fosfolipase de membrana, a *fosfolipase C* (*PC*). Esta enzima catalisa a hidrólise de *fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato* (PIP_2), um fosfolipídio minoritário da membrana plasmática, produzindo dois segundos mensageiros, o *inositol 1,4,5-trisfosfato* (IP_3) e o *1,2-diacilglicerol* (*DAG*) (Figura 19.7 a), que têm atuações diferentes.

O papel de IP_3 é aumentar a concentração citosólica de íons Ca^{2+}, promovendo sua liberação do depósito intracelular deste íon, as vesículas do retículo endoplasmático ou do retículo sarcoplasmático em células musculares. Sendo hidrossolúvel, IP_3 difunde-se pelo citosol, e liga-se a canais de Ca^{2+} da membrana dos reservatórios celulares, determinando a abertura dos canais e a liberação de Ca^{2+} (Figura 19.7 b). Os íons Ca^{2+}

exercem diversos efeitos por si sós ou quando ligados à proteína calmodulina (ver a seguir), formando o complexo Ca^{2+} · calmodulina. Nos músculos esqueléticos, os íons Ca^{2+} desencadeiam a contração e promovem a degradação de glicogênio; nos músculos lisos (Seção 22.6), ligam-se à calmodulina e modificam uma série de proteínas, incluindo diversas quinases. Adicionalmente, os íons Ca^{2+} agem como coadjuvantes do outro segundo mensageiro, o 1,2-diacilglicerol.



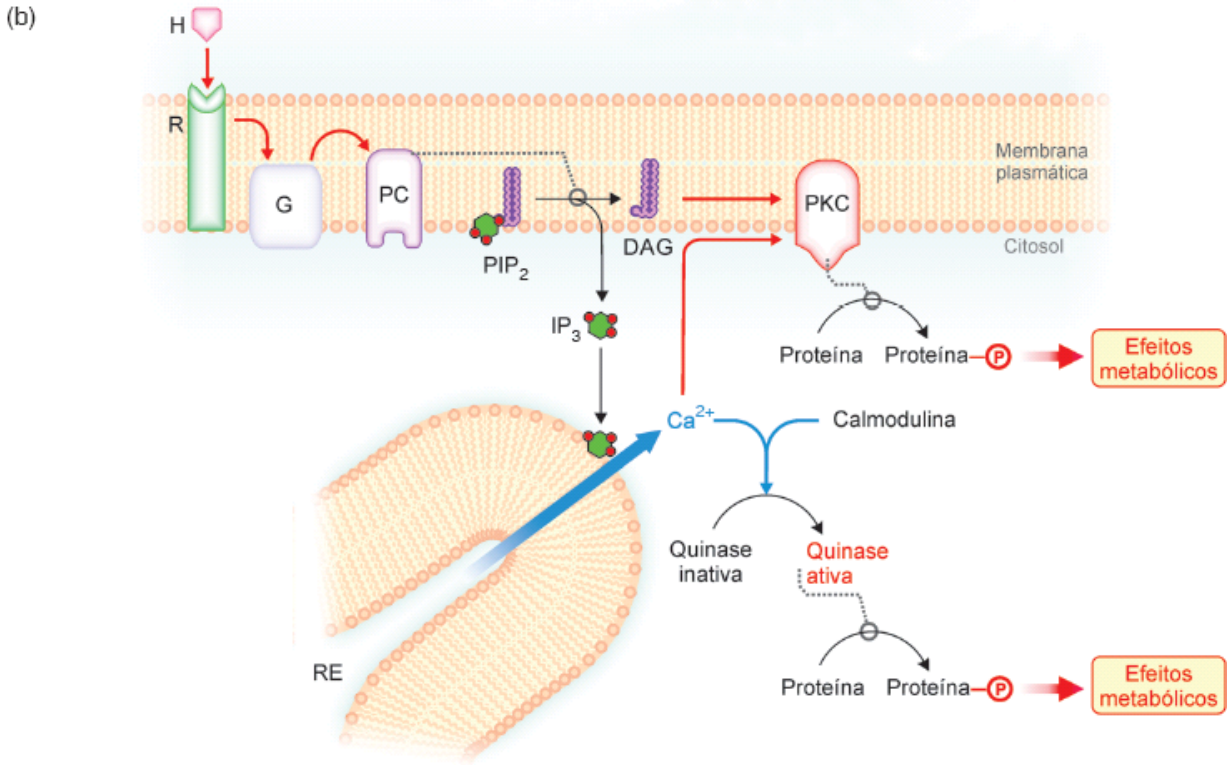


Figura 19.7 a) Estruturas do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) e dos produtos de sua hidrólise. PIP_2 e DAG são lipídios da membrana plasmática, o que não está mostrado na figura. b) Via de transdução de sinal do fosfatidilinositol bisfosfato (ou via da fosfolipase C). A sequência de eventos está descrita no texto. H = hormônio; R = receptor; G = proteína G; PC = fosfolipase C; RE = retículo endoplasmático; PKC = proteína quinase C. O hormônio poderia ser, por exemplo, a adrenalina ligando-se a receptores α_1.

O 1,2-diacilglicerol (DAG) permanece ligado à membrana e na presença de íons Ca^{2+}, disponíveis graças a IP_3, estimula uma proteína quinase de membrana, a *proteína quinase C*, assim denominada por depender de ***C***a^{2+}. Esta enzima catalisa a fosforilação de um conjunto de proteínas, diferente do conjunto modificado pelo complexo Ca^{2+} • calmodulina. A alteração da atividade de todas estas proteínas-alvo desencadeia a resposta celular ao hormônio.

Exemplos de hormônios que acionam a via do fosfatidilinositol bisfosfato são a adrenalina, atuando em receptores α_1 (Seção 19.6), a vasopressina (agindo em músculos lisos de vasos) e os hormônios hipotalâmicos de liberação de tirotrofina (TRH) e de gonadotrofinas (GnRH), que estimulam a liberação dos hormônios hipofisários TSH, LH e FSH.

O complexo Ca^{2+} · calmodulina e cAMP interagem na regulação da atividade celular

A *calmodulina* (*calmodulin*, de ***cal****cium-****modul****ating prote****in***) ocorre sob forma livre ou constitui a subunidade receptora de íons Ca^{2+} da glicogênio fosforilase quinase (Seção 20.1.1). Trata-se de uma proteína pequena, com quatro sítios de ligação para Ca^{2+} (Figura 19.8). A ocupação destes sítios por Ca^{2+} determina uma mudança de conformação na calmodulina, que pode então ligar-se a proteínas-alvo, geralmente proteína quinases, alterando sua atividade. Em vários casos de regulação de enzimas pelo *complexo* Ca^{2+} · *calmodulina* — glicogênio fosforilase quinase, proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina, miosina quinase de músculos

lisos etc. —, ocorre ativação. Os processos metabólicos que utilizam Ca^{2+} ou cAMP como segundos mensageiros são interligados: uma mesma enzima pode ser regulada tanto por Ca^{2+} · calmodulina como por cAMP, como ocorre com a glicogênio fosforilase quinase e a miosina quinase de músculos lisos (Seção 22.6).

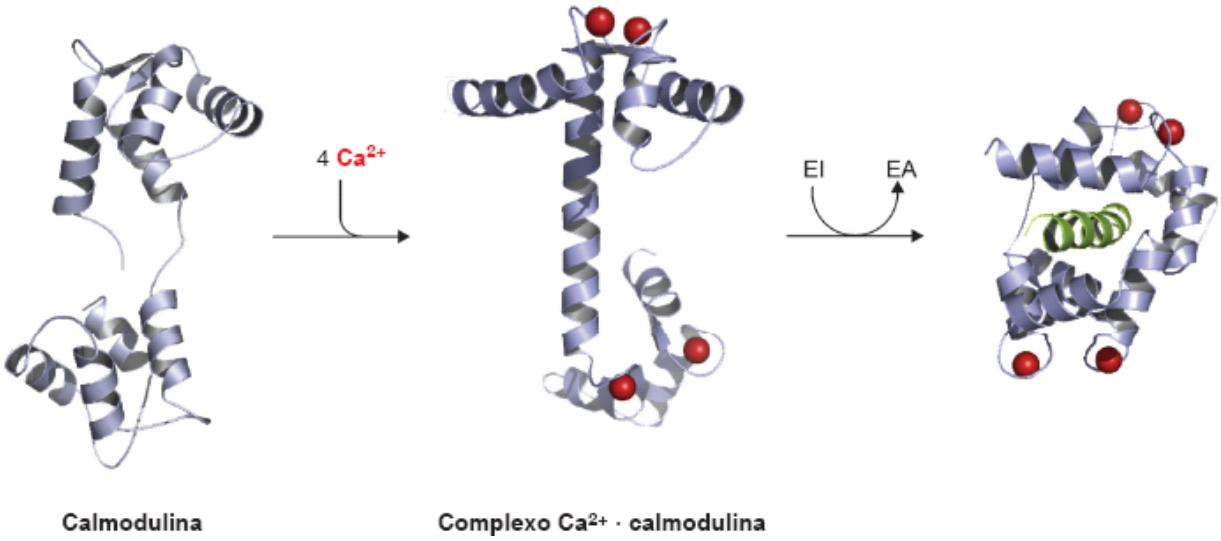


Figura 19.8 A calmodulina liga-se a íons Ca^{2+} (esferas vermelhas) e sofre uma modificação estrutural, que a torna apta a interagir com sua proteína-alvo, a enzima E. No exemplo, a enzima é autoinibida por um segmento de sua cadeia polipeptídica, o peptídio helicoidal assinalado em verde, que bloqueia seu centro ativo (o restante da molécula da enzima foi omitido). O complexo Ca^{2+} · calmodulina dobra-se sobre o peptídio inibidor, removendo-o da enzima inativa (EI), que é convertida na forma ativa (EA).

19.5 Transdução de sinais sensoriais

Nos seres humanos e em outros vertebrados, os mecanismos de percepção de estímulos gerados no próprio organismo ou de estímulos oriundos do meio ambiente são semelhantes. Todavia, nas vias de transdução de sinal dos exemplos relatados de hormônios, o resultado é a modificação da fisiologia celular. No caso da transdução de sinais externos (fótons, odorantes etc.), o resultado do estímulo inicial é a geração de um

impulso nervoso, que conecta a célula sensorial ao cérebro. Esta é a situação dos processos da visão e do olfato, resumidos a seguir.

Visão

As células fotossensíveis da retina dos animais, os cones e bastonetes, são neurônios sensoriais que formam sinapses com neurônios intermediários, que se comunicam com o nervo óptico e, finalmente, com o cérebro.

Na membrana celular dos cones e bastonetes está presente a *rodopsina*, um receptor hepta-helicoidal (7TM) (Figura 2.12), composto por uma porção proteica, a *opsina*, e um grupo prostético, 11-*cis*-retinal, derivado da vitamina A (Seção 18.4). Esta molécula fotossensível é o *pigmento visual*, assim chamado por sua propriedade de absorver luz, e que inicia a transdução do sinal visual. A absorção de um fóton pelo 11-*cis*-retinal provoca sua isomerização para uma forma toda *trans*, provocando uma alteração na estrutura da rodopsina. Esta nova forma da proteína ativa uma proteína G, previamente ligada a GDP. Pela ativação, há uma troca de GDP por GTP. A subunidade α da proteína G desliga-se das demais (β e γ) e associa-se a uma cGMP fosfodiesterase, que é estimulada. Esta ativação provoca a redução do nível celular de cGMP, o que, por sua vez, acarreta o fechamento de canais iônicos dependentes de cGMP. A consequência deste fechamento é a hiperpolarização da membrana, resultando em um potencial de ação e o início do impulso nervoso que, processado pelo sistema nervoso central, constitui a visão. Neste caso, verificam-se duas transduções de sinal: a transformação de um estímulo físico (o fóton) em diminuição da concentração de um composto químico (cGMP) e a conversão desta diminuição de concentração em um estímulo elétrico.

Olfato

A transdução de estímulos olfativos é análoga à transdução de sinal dos hormônios que utilizam cAMP como segundo mensageiro (Seção 19.4.1).

Os neurônios olfativos, situados no epitélio nasal, têm numerosos cílios em uma de suas extremidades. Na membrana desses cílios estão presentes centenas de receptores específicos para diferentes compostos voláteis: são

os receptores olfativos, da família dos receptores 7TM, associados à proteína G_{olf}. A ligação de um odorante ao receptor olfativo desencadeia a mesma sequência de eventos da via de transdução de sinal de hormônios que estimulam a adenilato ciclase (Figura 19.4 a). A grande concentração de cAMP resultante determina a abertura de canais iônicos da membrana ciliar, seguida de despolarização da membrana e ativação do neurônio olfativo, na forma de um sinal elétrico enviado ao cérebro. Neste caso, há também duas transduções de sinal: a ligação do odorante levando ao aumento da concentração de cAMP e este aumento provocando o impulso nervoso.

19.6 Adrenalina, glucagon e insulina

Os hormônios que têm papel fundamental na regulação do metabolismo — *adrenalina*, *glucagon* e *insulina* — são discutidos brevemente neste capítulo. ***Sua atuação em vias metabólicas específicas está analisada nos capítulos seguintes.***

19.6.1 Adrenalina (epinefrina)

Os hormônios *adrenalina* (ou *epinefrina*) e *noradrenalina* (ou *norepinefrina*) são sintetizados na medula das glândulas suprarrenais, também denominadas adrenais, a partir de tirosina (Figura 19.9). São chamados, juntamente com a dopamina, de *catecolaminas* por sua semelhança estrutural ao catecol. A adrenalina é o principal produto da medula adrenal, constituindo cerca de 80% das catecolaminas. Também são sintetizadas por neurônios autonômicos, onde atuam como neurotransmissores.

A secreção de adrenalina é provocada por estímulo nervoso autônomo sobre as suprarrenais em situações de perigo real ou imaginário, exercício físico (Capítulo 22), hipoglicemia (Capítulo 21) e exposição a baixas temperaturas. A adrenalina determina uma série coordenada de respostas fisiológicas e metabólicas que permitem ao indivíduo reagir a essas situações. Entre os efeitos mais importantes estão: 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 da frequência cardíacas; glicogenólise muscular e hepática; lipólise no tecido adiposo e gliconeogênese hepática. Seus efeitos metabólicos convergem para aumentar a oferta de substratos oxidáveis, contrapondo-se aos da insulina e coadjuvando os do glucagon.

As diferentes ações da adrenalina sobre os vários tecidos são resultantes da presença de diversos tipos de *receptores adrenérgicos* nas células-alvo. A distinção entre os tipos de receptores é estabelecida com base na atuação de *agonistas*, isto é, substâncias capazes de ligarem-se aos receptores e induzir respostas equivalentes às do hormônio ou de *antagonistas*, compostos que se unem aos receptores, mas sem provocar as ações hormonais. Ainda com base na especificidade ou na potência da ação de agonistas e antagonistas, foram identificados vários subtipos de receptores adrenérgicos: α_{1A}, α_{1B} e α_{1D}; α_{2A}, α_{2B} e α_{2C}; β_1, β_2 e β_3; DA_1 a DA_5.

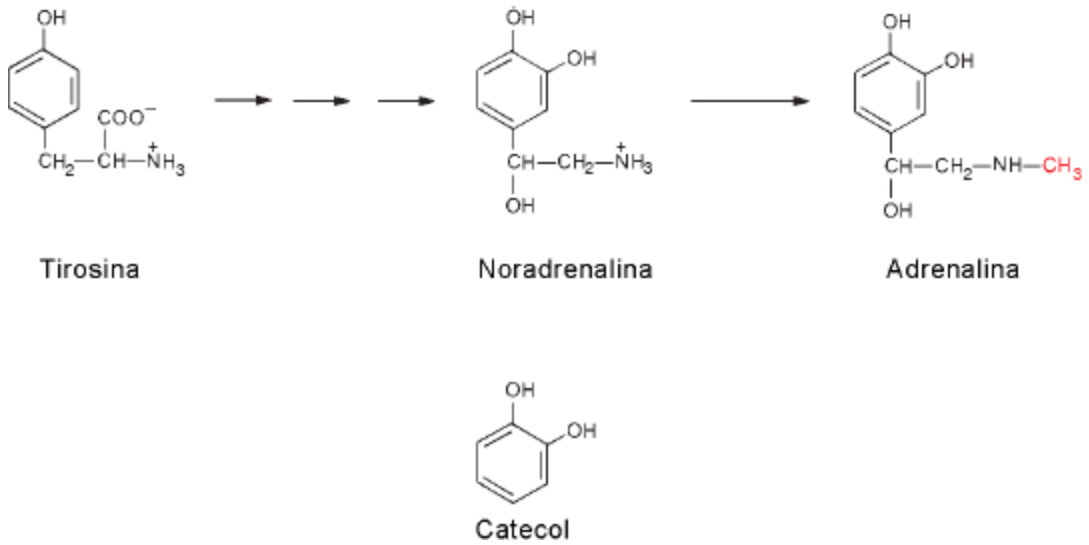


Figura 19.9 A tirosina é precursora das catecolaminas, com estrutura semelhante ao catecol. Por reações de hidroxilação e descarboxilação, a tirosina origina a noradrenalina que é metilada, convertendo-se em adrenalina.

Os receptores adrenérgicos, embora provoquem respostas tão diversas, pertencem todos à família dos receptores hepta-helicoidais (7TM), acoplados a proteínas G. Dependendo do tipo de receptor ativado (α, β etc.), uma via de transdução de sinal é acionada, envolvendo a participação de uma determinada proteína G. A ligação adrenalina-receptor α_1 tem seus efeitos mediados pela proteína G_q na via da fosfolipase C. Quando se liga a receptores α_2 e aos três subtipos de receptores β, a via de transdução de sinal acionada é a via da proteína quinase A (PKA): no primeiro caso há inibição da adenilato ciclase e no segundo caso, estimulação. Os receptores α_2 são do tipo R_i e interagem com uma proteína G_i, que inibe a adenilato ciclase; já os β_1, β_2 e β_3 são receptores R_S, que determinam a ativação da adenilato ciclase, mediada por proteínas G_s.

As ações metabólicas da adrenalina (Tabela 19.3) resultam de sua interação com receptores β nos órgãos efetores e do consequente aumento de atividade da PKA.

Como as respostas à ativação dos receptores adrenérgicos são muito variadas, agonistas e antagonistas, por mimetizarem ou inibirem os efeitos hormonais, têm largo emprego terapêutico. Exemplos: *atenolol*, utilizado como hipotensor, é antagonista de β_1, que medeia aumento da pressão arterial; *salmeterol*, agonista de β_2, que causa broncodilatação (Seção 22.6), é empregado no tratamento da asma.

O *cortisol*, um hormônio esteroide produzido pelo córtex das suprarrenais, atua conjuntamente com a adrenalina e glucagon na resposta do organismo ao estresse, aumentando a disponibilidade de substratos oxidáveis. Promove a gliconeogênese por meio de duas ações: estimula a proteólise e a consequente 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 do teor de ácidos graxos circulantes.

Tabela 19.3 Efeitos metabólicos de adrenalina, insulina e glucagon.

	Adrenalina	Glucagon	Insulina
Glicemia	↑	↑	↓

Glicólise	–	↓	↑
Gliconeogênese	↑	↑	↓
Glicogenólise	↑	↑	↓
Glicogenogênese	–	↓	↑
Lipólise	↑	↑	↓
Lipogênese	–	↓	↑
Cetogênese	–	↑	↓

↑ = glicemia ou velocidade da via aumentada; ↓ = glicemia ou velocidade da via diminuída.

19.6.2 Glucagon

O glucagon é um peptídio formado por 29 aminoácidos, sintetizado pelas células α das ilhotas de Langerhans do pâncreas. É liberado na corrente sanguínea quando a concentração de glicose circulante é baixa (hipoglicemia). Seu papel fisiológico principal é aumentar a produção e a exportação de glicose pelo fígado, de modo a elevar a glicemia. O glucagon determina este resultado por estimular as vias que produzem glicose — glicogenólise e gliconeogênese — e inibir aquelas que a consomem — síntese de glicogênio e glicólise.

Seus efeitos metabólicos, com exceção da estimulação da síntese de glicose nos hepatócitos, são eminentemente degradativos (Tabela 19.3), incidindo sobre carboidratos, lipídios e proteínas, em especial no fígado e tecido adiposo. Essas ações do glucagon somam-se às da adrenalina, fazendo parte da adaptação do organismo a situações de carência de nutrientes nos intervalos entre as refeições e no jejum (Capítulo 21). No tecido muscular, desprovido de receptores de glucagon, predominam os efeitos da adrenalina.

A transdução de sinal do glucagon ocorre pela via da proteína quinase A (PKA). O glucagon liga-se a seus receptores (R_S) na membrana plasmática das células-alvo e eles passam a interagir com uma proteína G_S, que estimula a adenilato ciclase: o nível de cAMP aumenta, resultando na ativação da PKA. As reações de fosforilação catalisadas pela PKA são

responsáveis pela interferência do glucagon no metabolismo e na transcrição gênica.

A regulação da secreção de glucagon durante a hipoglicemia é complexa, envolvendo a participação de diversos fatores. É estimulada por adrenalina, também liberada nessa condição, e que inibe a secreção de insulina; a glicose, direta ou indiretamente, por ação mediada por insulina, inibe a secreção de glucagon. Estes fenômenos ilustram a oposição funcional entre glucagon (e adrenalina) e insulina. No diabetes, estes mecanismos de controle estão alterados: a secreção de glucagon diminui na hipoglicemia e permanece elevada na hiperglicemia.

19.6.3 Insulina

A insulina é uma proteína pequena, formada por 51 aminoácidos organizados em duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto (Figura 19.10). É secretada pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, em resposta à hiperglicemia, e tem efeitos metabólicos antagônicos aos do glucagon e da adrenalina (Tabela 19.3). Os níveis de insulina e glucagon sofrem uma alternância periódica estritamente regulada (Figura 21.1). Na deficiência de insulina, como no *diabetes tipo 1*, os níveis de glucagon aparecem sempre muito elevados.

A insulina liga-se a seu receptor na superfície celular, desencadeando cascatas de sinais que regulam muitos processos celulares.

Níveis altos de insulina provocam diminuição do número de seus receptores

Há uma relação inversa entre a concentração plasmática de insulina e o número de seus receptores. Como acontece com outros hormônios que se ligam a receptores na superfície celular (Seção 19.4), esta regulação é mantida por endocitose do complexo insulina-receptor, seguida por proteólise da insulina e de parte dos receptores, e pelo retorno do restante deles para a membrana. Na ausência do hormônio, os receptores são sintetizados, restabelecendo a sua quantidade normal. Quando o nível de insulina é mantido alto, a recomposição dos receptores não se completa e, a longo prazo, verifica-se uma diminuição do número de receptores. É o que

ocorre no diabetes tipo 2, em que há uma diminuição da resposta celular à insulina, frente aos níveis aumentados do hormônio.

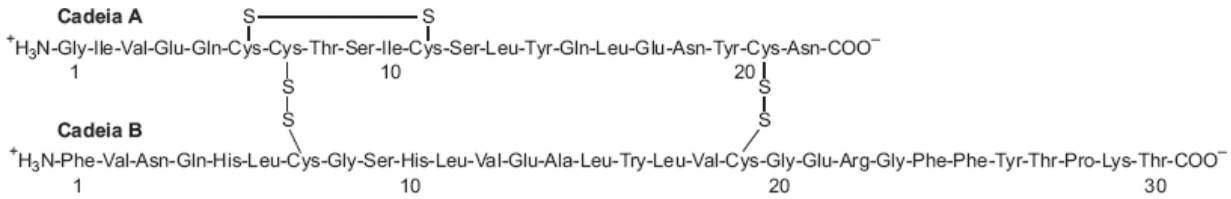


Figura 19.10 Estrutura da insulina humana. A insulina é sintetizada como única cadeia polipeptídica, contendo mais 24 aminoácidos ligados ao resíduo B_1 e 35 aminoácidos ligando B_{30} a A_1. Por ação de enzimas hidrolíticas, estes segmentos são eliminados, restando as duas cadeias unidas por pontes dissulfeto que constituem a forma funcional do hormônio.

O receptor da insulina tem atividade de proteína quinase

O receptor de insulina está presente na membrana plasmática de todas as células de mamíferos, em quantidades que variam de algumas poucas dezenas em hemácias até milhares em hepatócitos e adipócitos. É uma glicoproteína constituída por duas subunidades α e duas β, ligadas por pontes dissulfeto (Figura 19.11).

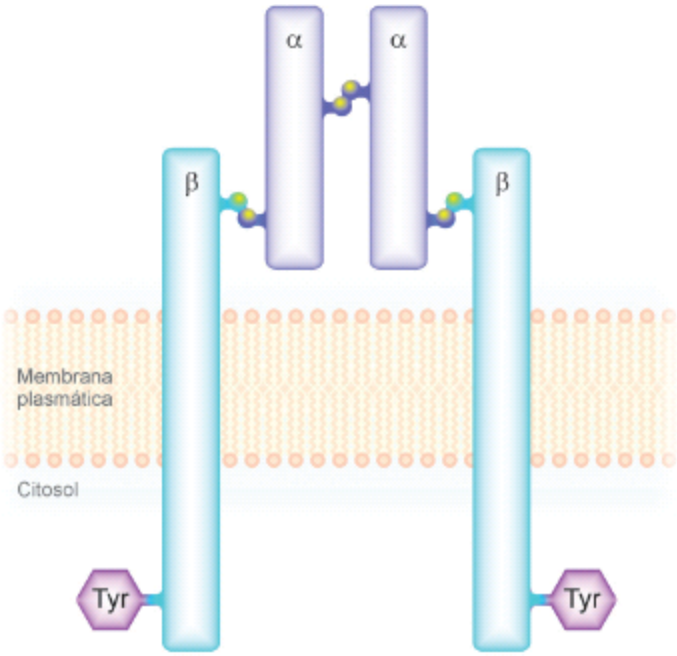


Figura 19.11 O receptor de insulina é uma proteína transmembrana formada por quatro subunidades ($\alpha_2\beta_2$), unidas por pontes dissulfeto (cada uma representada por duas pequenas esferas unidas). A ligação do hormônio se dá nas subunidades α; os segmentos internos das subunidades βcontêm diversos resíduos de tirosina (Tyr) passíveis de autofosforilação (a figura mostra somente um destes resíduos em cada subunidade β).

As subunidades α situam-se extracelularmente e as subunidades β atravessam a membrana plasmática. A porção citoplasmática das subunidades β apresenta atividade de proteína quinase, específica para resíduos de tirosina — *tirosina quinase* — e contém resíduos de tirosina suscetíveis à fosforilação. A ligação da insulina às subunidades α ativa as subunidades β, que catalisam a fosforilação cruzada daqueles resíduos, ou seja, uma subunidade β fosforila tirosinas da outra subunidade β — o receptor de insulina funciona como a glicogenina (Seção 13.1), por constituir-se em enzima e substrato.

A autofosforilação do receptor faz aumentar sua atividade intrínseca de tirosina quinase, o que desencadeia a fosforilação em cascata de uma série de proteínas sinalizadoras, muitas das quais são também proteína quinases — são acionadas diferentes vias de transdução de sinal, responsáveis pelos múltiplos efeitos da insulina, que incidem em processos tão diversos quanto o transporte de metabólitos, a regulação do metabolismo e a proliferação e a diferenciação celulares; em relação à homeostase de glicose, promove a tomada de glicose pelos tecidos periféricos (músculos e tecido adiposo) e suprime a síntese de glicose no fígado.

A via da PI3K é uma das principais vias de sinalização da insulina

Na *via da fosfatidilinositol 3-quinase* (*PI3K*, de ***P**hosphatidylinositol **3**-**K**inase*) (Figura 19.12), o receptor, na presença de insulina, sofre autofosforilação e liga-se a proteínas denominadas *IRS* (de ***I**nsulin **R**eceptor **S**ubstrates*). IRS pertencem à família das chamadas *proteínas adaptadoras*, que apresentam a propriedade de se ligar aos resíduos fosforilados de tirosina do receptor. O receptor, então com a atividade de tirosina quinase estimulada, fosforila IRS. As proteínas adaptadoras, quando fosforiladas, funcionam como adesivos moleculares, recrutando os demais componentes

intracelulares da cascata de sinalização e conectando-os ao receptor ativado na superfície celular. Um destes efetores é a *lipídio quinase* que empresta seu nome à via — *fosfatidilinositol 3-quinase* (*PI3K*) —, que se associa aos resíduos fosforilados de tirosina de IRS e se torna estimulada. A enzima introduz um grupo fosfato no carbono 3 do anel inositol do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2), o fosfolipídio da membrana plasmática mostrado na Figura 19.7 a, convertendo-o em *fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato* (PIP_3).

O aumento da concentração de PIP_3 cria, em regiões restritas da membrana, ancoradouros moleculares para proteínas que, na ausência da insulina, encontram-se dispersas no citosol. Várias proteínas sinalizadoras têm domínios que se ligam especificamente a este fosfoinositídio. Da união com PIP_3, resultam a ativação e a aproximação dessas proteínas, que se organizam em complexos sinalizadores que atuam coordenada e sequencialmente.

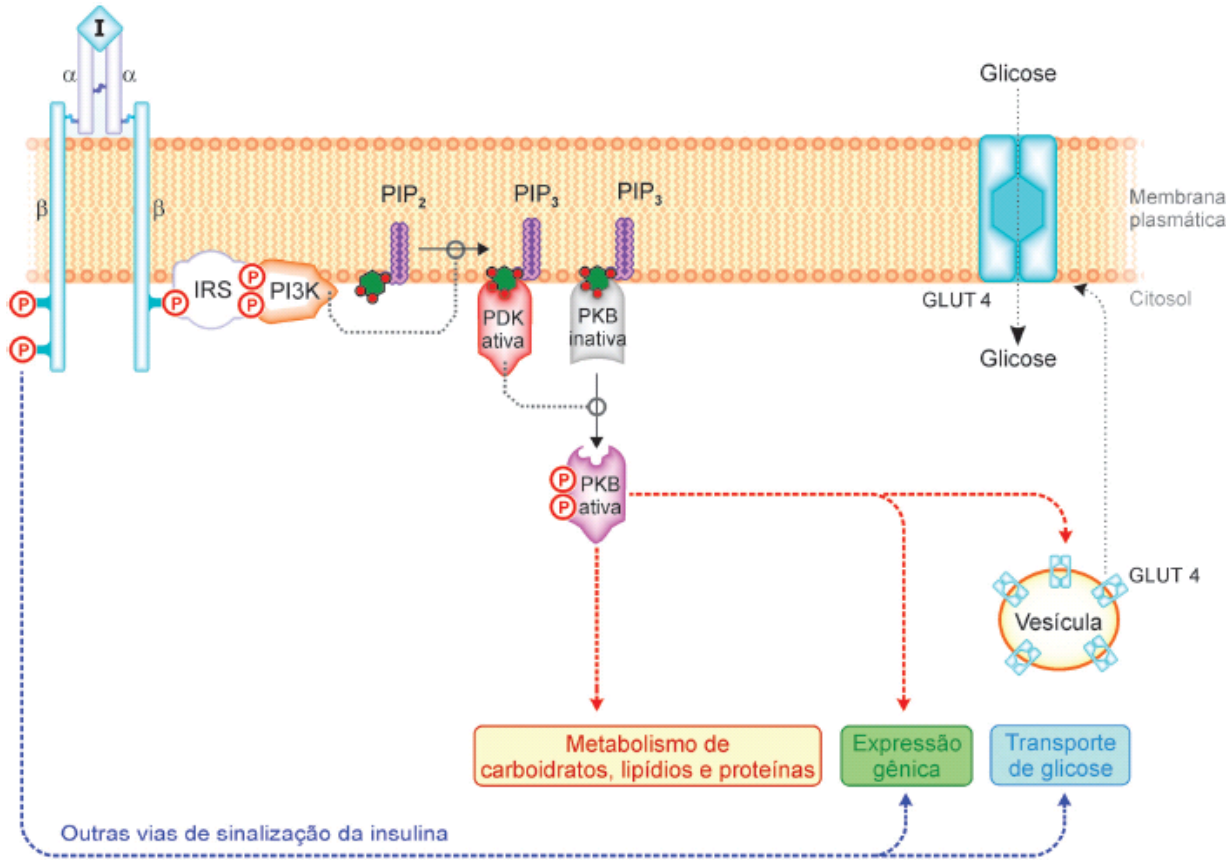


Figura 19.12 Via de transdução de sinal da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Na presença de insulina, o receptor é estimulado e adiciona grupos fosfato (Ⓟ) a resíduos de tirosina de suas subunidades β. A proteína adaptadora IRS liga-se a estes resíduos e é fosforilada pelo receptor. Uma vez nesta forma, IRS associa-se a PI3K, que se torna ativa e converte PIP_2 em PIP_3. Duas proteína quinases citosólicas ancoram-se nas moléculas de PIP_3: PDK e PKB. A união a PIP $_3$aproxima as quinases e estimula PDK, que fosforila PKB, ativando-a. PKB, então, passa a atuar sobre os diversos processos celulares controlados por insulina: o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, a expressão gênica e o transporte de glicose.

Uma proteína importante estimulada por ligação a PIP_3 é a *proteína quinase dependente de fosfoinositídio* (*PDK*, de ***P**hosphoinositide-**d**ependent **K**inase*). PDK fosforila, e estimula, algumas proteína quinases, das quais se destaca a *proteína quinase B* (*PKB*). PKB é uma proteína quinase específica para resíduos de serina e treonina, assim denominada por guardar semelhanças com a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase C (PKC) em mamíferos; é também chamada de *Akt*[2]. PKB tem atuação ampla e diversificada: além de ser ativada em diversos cânceres humanos, efetua o acoplamento de sinais extracelulares e o metabolismo.

A insulina interfere na fosforilação e na síntese de enzimas

A insulina foi purificada em 1922 e, a despeito de intensa investigação ao longo de 90 anos, o mecanismo da sua atuação permanece controverso. As respostas fisiológicas à insulina, tais como o controle do metabolismo, da transcrição gênica e da síntese proteica, além do transporte de glicose e aminoácidos, poderiam ser devidas a modificações no estado de fosforilação e, consequentemente, no funcionamento de proteínas efetoras. Admite-se que a proteína quinase B (PKB), o componente final da via da PI3K (Figura 19.12), seja capaz de mediar a maioria dos efeitos metabólicos da insulina.

Os eventos de fosforilação catalisados pela PKB convergem para a predominância das formas *desfosforiladas* de enzimas, porque alguns de

seus substratos são:

1. fosfoproteína fosfatases, a principal sendo a fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1), que se tornam estimuladas e passam a remover os grupos fosfato de enzimas;
2. fosfodiesterase de cAMP, que é ativada, levando à diminuição do nível de cAMP e à desativação da proteína quinase dele dependente, a PKA;
3. proteína quinases, como a proteína quinase dependente de AMP (AMPK — Seção 19.7) e a glicogênio sintase quinase (GSK-3), que são inativadas e deixam de fosforilar enzimas.

A *glicogênio sintase quinase* (*GSK-3*), em células não estimuladas, é ativa e catalisa a adição de grupos fosfato a várias enzimas[3], inclusive a glicogênio sintase, inibindo-as. Com insulina, PKB fosforila e inativa GSK-3, suspendendo o bloqueio exercido sobre certas vias metabólicas, como a síntese de glicogênio (Seção 20.1).

Tais ações da insulina fariam prevalecer as formas desfosforiladas de enzimas e explicariam seu antagonismo ao glucagon e à adrenalina. Na realidade, o mecanismo das respostas à insulina é mais complexo e não completamente compreendido.

Além de modificar a atividade enzimática, a insulina determina alterações na concentração de enzimas nos seus tecidos-alvo, em especial nos músculos esqueléticos e cardíaco, tecido adiposo e fígado, por intervenção na transcrição dos genes que as codificam. Conhecem-se, atualmente, mais de uma centena de RNAs mensageiros cuja síntese é regulada por insulina. Um exemplo importante ocorre na interrupção da síntese de glicose no fígado: PKB, a proteína quinase ativada na via da PI3K, fosforila e inativa fatores de transcrição, impedindo a transcrição dos genes de enzimas da gliconeogênese, como fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose 6-fosfatase; a insulina, então, inibe a gliconeogênese, por desligar a expressão desses genes. Outro nível de atuação da insulina é a tradução de RNAs mensageiros: ela modula a síntese proteica por meio da fosforilação de proteínas ribossomais e de fatores de iniciação e de alongamento. A modulação da expressão gênica

por insulina envolve a participação de outras vias de transdução de sinal, além da via da PI3K.

A insulina aumenta o transporte de glicose para o interior das células

O transporte de glicose através da membrana plasmática das células de mamíferos é um processo passivo, catalisado por uma família de permeases, denominadas *GLUT* (de ***Glu****cose* ***T****ransporter*) 1 a 14, segundo a ordem de sua descoberta. Estes transportadores diferem quanto à distribuição pelos tecidos, às propriedades cinéticas e à especificidade em relação ao substrato (alguns transferem também outros açúcares); diferem ainda quanto à sensibilidade à insulina.

O grupo mais bem caracterizado de GLUTs compreende GLUT 1 a 4 (Tabela 19.4). *GLUT 1, 3* e *4* são proteínas com alta afinidade por glicose. Por exibirem valores de K_M menores que a concentração normal de glicose sanguínea (5 a 8 mM — Figura 21.1 A), são responsáveis pela captação basal do açúcar. *GLUT 2* tem baixa afinidade por glicose, contribuindo para a captação de glicose apenas quando a glicemia aumenta, como após as refeições. Das quatro permeases referidas, somente *GLUT 4* é dependente de insulina.

GLUT 1 tem distribuição ubíqua, sendo mais abundante em células que obtêm energia exclusivamente a partir de glicose, como hemácias e cérebro; ocorre também em quantidades moderadas no tecido adiposo, músculos e fígado.

GLUT 2 é expresso primariamente nas células β do pâncreas e no fígado. Em hiperglicemia, a velocidade do transporte de glicose por GLUT 2 é diretamente proporcional à concentração do substrato (K_M muito acima da glicemia normal), ao passo que os outros transportadores do grupo estão saturados, funcionando em velocidades constantes. Por esta razão, GLUT 2 atua como um sensor de glicose nas células β do pâncreas: no estado pós-prandial, quando a glicemia aumenta, essas células respondem com liberação de insulina. O fígado tem uma situação especial no que se refere à dependência de insulina: embora GLUT 2, que medeia a entrada de glicose, seja insensível ao hormônio, o fígado depende da insulina para a síntese de glicoquinase, sem a qual não pode utilizar a glicose. GLUT 2 transporta também frutose em rins e intestino delgado.

Tabela 19.4 Transportadores de glicose em mamíferos.

Transportador	Localização	K_M para glicose (mM)	Dependência de insulina
GLUT 1	Todos os tecidos, abundante em cérebro e hemácias	1-5	Não
GLUT 2	Fígado, células β do pâncreas, rins, intestino delgado	15-25	Não
GLUT 3	Cérebro	1-5	Não
GLUT 4	Tecido adiposo, músculos esqueléticos e cardíaco	1-5	Sim

Concentração normal de glicose sanguínea = 5 a 8 mM.

GLUT 3 é o principal transportador dos neurônios do cérebro. Sua alta afinidade pelo substrato (tem o menor K_M para glicose) é coerente com a necessidade de glicose pelo cérebro, garantindo a utilização mesmo quando a glicemia é baixa.

GLUT 4 catalisa o transporte de glicose nos tecidos adiposo e muscular (esquelético e cardíaco), que pode ser aumentado por insulina de 10 a 20 vezes, em poucos segundos. A transferência de glicose para o interior dessas células resulta em diminuição do aumento pós-prandial do nível de glicose plasmática, o efeito mais rápido e marcante da insulina.

A insulina facilita ainda o transporte de aminoácidos para as células, particularmente as musculares.

A estimulação do transporte de glicose por insulina é mediada pela via da PI3K

As bases moleculares das atuações da insulina são tão complexas que o conhecimento disponível sobre o seu efeito de aumentar a permeabilidade da membrana plasmática à glicose, descrito há mais de 50 anos, permanece incipiente.

GLUT 4, o transportador de glicose em músculos e tecido adiposo, fica armazenado em vesículas citosólicas que, na presença de insulina, são deslocadas para a membrana plasmática, com a qual se fundem por exocitose, posicionando GLUT 4 na membrana (Figura 19.12). O estímulo

da entrada de glicose deve-se ao maior número de moléculas de GLUT presentes na superfície celular.

A mobilização de GLUT 4 dos estoques internos para a membrana plasmática envolve a participação da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Esta via, portanto, além de interferir na regulação do metabolismo e da expressão gênica, promove o transporte de glicose.

A atividade física promove o deslocamento de GLUT 4 para a membrana, aumentando a permeabilidade das fibras musculares à glicose. Este efeito permanece normal na vigência da resistência à insulina e, por esta razão, o exercício é recomendado para o controle da glicemia em portadores de diabetes. Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar este resultado do exercício (Seção 19.7).

A insulina também age no cérebro, regulando o apetite

A insulina, além de atuar nos tecidos-alvo periféricos (fígado, adiposo, músculo), age diretamente no cérebro — neurônios de diversas áreas do hipotálamo expressam o receptor de insulina. O hipotálamo coordena os sinais nutricionais e hormonais, desempenhando um papel decisivo na regulação do balanço energético e do metabolismo. Determinados efeitos da insulina no sistema nervoso central coincidem com os da leptina, que também tem seus receptores concentrados no hipotálamo: ambas sinalizam saciedade, diminuindo o apetite. As vias de transdução de sinal de insulina e leptina têm etapas comuns, que resultam na ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Na obesidade, a tomada de alimento permanece em níveis normais ou aumentados apesar das altas concentrações plasmáticas dos dois hormônios, sugerindo uma resistência hipotalâmica à sinalização hormonal.

19.7 Proteína quinase dependente de AMP (AMPK)

A *proteína quinase dependente de AMP* (*AMPK*) é uma enzima ubíqua em eucariotos, cuja atividade se eleva em situações de estresse como hipóxia, jejum etc. e na atividade física, quando o consumo de ATP provoca aumento na razão AMP/ATP. Sua estimulação resulta de regulação alostérica por AMP e de fosforilação por proteína quinases ainda

indefinidas. Apesar de o nome da enzima derivar do efeito do AMP sobre sua atividade, este é modesto (aumento de até cinco vezes) em comparação com o acréscimo promovido por modificação covalente, que chega a 1.000 vezes. Por outro lado, alguns estudos sugerem que a proteína quinase B (PKB), estimulada por insulina (Figura 19.12), fosforila AMPK em sítios diferentes, causando a sua inativação.

Uma vez na forma ativa, AMPK fosforila proteínas-alvo nos tecidos periféricos, causando o bloqueio de vias que consomem ATP, como a síntese de ácidos graxos e de colesterol, e a ativação de vias que levam à produção de ATP, como a oxidação de ácidos graxos e a glicólise. No hipotálamo, atua como mediadora das ações de hormônios e adipocinas, de modo a garantir a manutenção do sinal de fome durante períodos de balanço de energia negativo; insulina e leptina, que reduzem a ingestão de alimentos, suprimem a atividade da AMPK nos neurônios hipotalâmicos. Deste modo, além de regular a oxidação e o armazenamento de substratos nos tecidos periféricos, a AMPK participa do controle central do apetite.

O transporte de glicose em músculos esqueléticos de mamíferos é estimulado por insulina e também pelo exercício. A indução do transporte pela contração muscular é insulinoindependente, e seria regulada por AMPK.

AMPK pode ser ativada por vários agentes farmacológicos. É o que acontece com *antidiabéticos orais*, como a *metformina* (Seção 21.4). Por participar do controle da saciedade, AMPK é alvo de interesse para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da obesidade e do diabetes tipo 2. Embora as bases moleculares do efeito do exercício não sejam completamente conhecidas, sua aplicação terapêutica é fundamental para diabéticos e obesos, por causar uma melhora significativa na resistência à insulina.

Bibliografia

Agius L: Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* **10** (12): 1175-1187, 2010.

Aronson JK: Where name and image meet — the argument for “adrenaline”. *BMJ* **320** (7233): 506-509, 2000.

Barnes PJ: Theophylline. *Am J Respir Crit Care Med* **188** (8): 901-906, 2013.

Buchen L: Cell signalling caught in the act. *Nature* **475**: 273-274, 2011.

Carling D *et al*.: AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nature Chem Biol* **7** (8): 512-518, 2011.

Chen J F *et al*.: Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nat Rev Drug Discov* **12** (4): 265-286, 2013.

Edelstein SJ: Allosteric interactions after 50 years. *J Mol Biol* **425** (9): 1391-1395, 2013.

Hay N: Akt isoforms and glucose homeostasis — the leptin connection. *Trends Endocrinol Metab* **22** (2): 66-73, 2011.

Heroes E *et al*: The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. *FEBS J* **280** (2): 584-595, 2013.

Leto D, Saltiel AR: Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature Rev Mol Cell Biol* **13** (6): 383-396, 2012.

Rasmussen SGF *et al*.: Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477** (7366): 549-55, 2011.

Siu FY *et al*.: Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature* **499** (7459): 444-449, 2013.

Stark R *et al*.: AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol* **366** (2), 215-223, 2013.

Taylor CW, Dale P: Intracellular Ca^{2+} channels — a growing community. *Mol Cell Endocrinol* **353** (1-2): 21-28, 2012.

Vanhaesebroeck B *et al*.: PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature Rev Mol Cell Biol* **13** (3): 195-203, 2012.

Zorn JA, Wells JA: Turning enzymes ON with small molecules. *Nat Chem Biol* **6** (3): 179-188, 2010.

[1]As siglas da denominação inglesa das proteína quinases, fosfoproteína fosfatases e de outras enzimas serão adotadas neste texto, graças ao seu uso consagrado na literatura.

[2]O acrônimo ***Ak***t não tem relação com a função da enzima, referindo-se à designação da linhagem de camundongo, ***Ak***, da qual foi isolado um retrovírus ***t***ransformante, Ak***t***; o oncogene viral foi denominado *v-akt* e verificou-se que codificava uma proteína quinase específica para serina/treoniona. PKB (ou Akt) nas células humanas é codificada pelo gene *c-akt*, homólogo ao oncogene viral *v-akt*.

[3]A enzima GSK-3, diferentemente do que seu nome indica, não é específica para a glicogênio sintase; trata-se de uma proteína quinase.

OceanofPDF.com

20 Regulação das Vias Metabólicas Principais

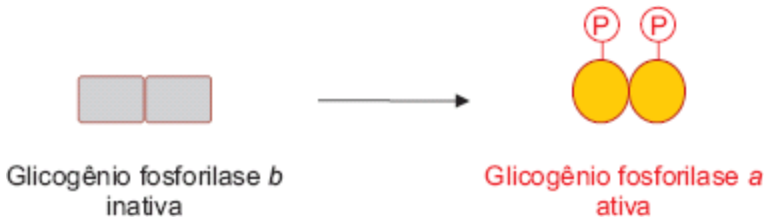
20.1 Regulação do metabolismo do glicogênio

A degradação e a síntese de glicogênio são efetuadas por vias distintas e, evidentemente, ativadas em situações fisiológicas opostas. As regulações alostérica e hormonal destas vias são coordenadas, de tal modo que a estimulação de uma delas ocorre simultaneamente com a inibição da outra. Os mecanismos de controle operantes em músculos esqueléticos de mamíferos serão descritos inicialmente e, a seguir, aqueles existentes no fígado.

20.1.1 Regulação da degradação do glicogênio muscular

Regulação por modificação covalente

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).

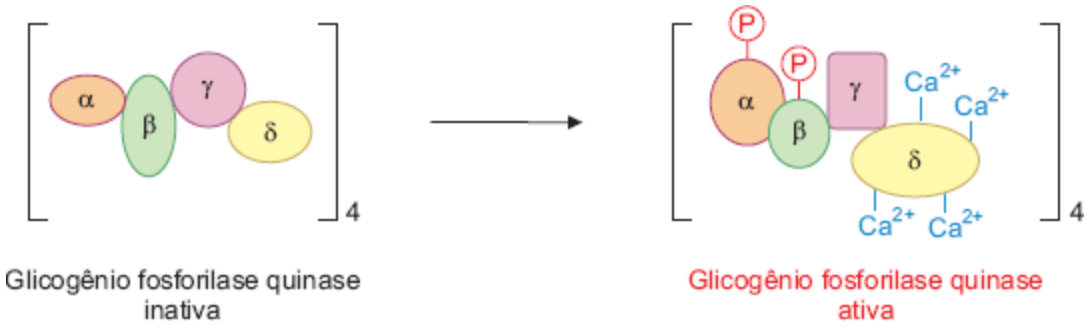


A ativação da enzima é obtida por fosforilação de um resíduo de serina de cada monômero da forma *b* (inativa), que se converte na forma *a* (ativa).

A reação é catalisada pela glicogênio fosforilase quinase, que também existe em duas formas, uma inativa e outra ativa.

A *glicogênio fosforilase quinase* (ou *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 A (PKA), ativada por AMP cíclico (cAMP), produzido sob estímulo de adrenalina interagindo com receptores β (Seção 19.4.1).
2. Ligação da subunidade δ, idêntica à calmodulina, a íons Ca^{2+}, liberados dos depósitos intracelulares para o citosol das 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 no esquema anterior.

A degradação do glicogênio muscular pode, então, ser provocada em primeira instância, por estímulo hormonal ou nervoso. No primeiro caso, o mediador intracelular é cAMP e, no segundo caso, íons Ca^{2+}. O processo completo de ativação da glicogênio fosforilase resulta de uma sequência de ativações enzimáticas, conhecida como *cascata enzimática* (Figura 20.1). Revendo o processo em ordem cronológica de seus eventos, tem-se:

1. Ligação de adrenalina a receptores β.
2. Modificação da proteína G e troca de GDP por GTP (Figura 19.4 a).

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 PKA, liberando as subunidades catalíticas, ativas.
6. Fosforilação, e ativação, da glicogênio fosforilase quinase pela PKA.
7. Fosforilação da forma *b* da glicogênio fosforilase pela glicogênio fosforilase quinase, convertendo-a na forma *a*, ativa.
8. Degradação do glicogênio pela glicogênio fosforilase.

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: o estímulo hormonal é aumentado de muitas ordens de grandeza. Adicionalmente, o estímulo nervoso que causa o aumento da concentração sarcoplasmática de Ca^{2+} é quase sempre acompanhado da liberação de adrenalina — as estimulações sobre a degradação do glicogênio são convergentes, ainda mais porque, quando as subunidades α e β estão fosforiladas, a afinidade da enzima por Ca^{2+} é maior, promovendo então sua conversão à forma de maior atividade possível.

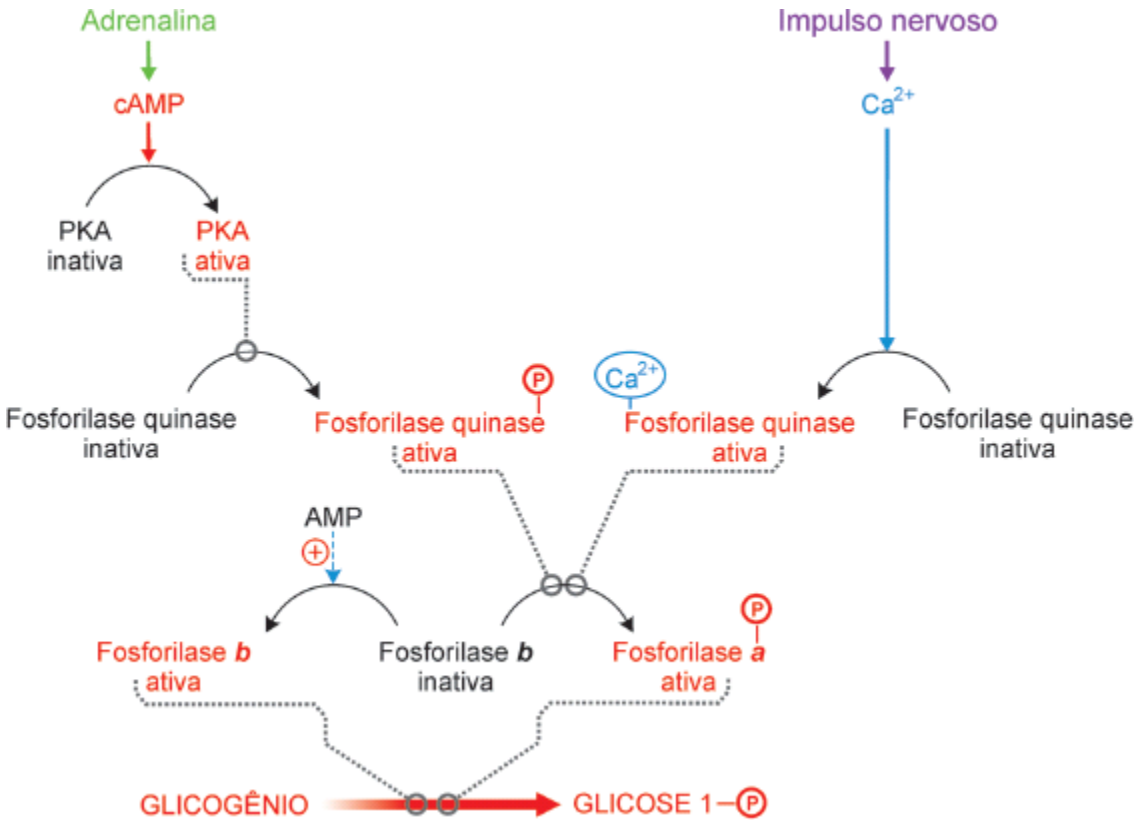


Figura 20.1 Cascata enzimática de ativação da degradação do glicogênio muscular, desencadeada por estímulo hormonal ou nervoso. A adrenalina induz aumento da concentração de cAMP, que estimula a proteína quinase A (PKA); o estímulo nervoso faz subir o teor citosólico de íons Ca^{2+}. A fosforilase quinase, uma vez ativada por fosforilação ou por ligação com íons Ca^{2+}, fosforila a fosforilase *b*, convertendo-a na forma ativa, a fosforilase *a*, que catalisa a glicogenólise. A mesma conversão resulta de ativação alostérica por AMP. Ⓟ = grupo fosfato (PO_3^{2-}).

Regulação alostérica

A glicogênio fosforilase também é sensível à regulação por efetuadores alostéricos: a forma *b*, encontrada no músculo em repouso, é fortemente estimulada por adenosina 5′ -monofosfato (AMP) (Figura 20.1). A concentração celular de AMP é habitualmente baixa, mas eleva-se durante a contração muscular, cujo grande dispêndio energético é suprido pela conversão de ATP em ADP. À medida que cresce a concentração de ADP, o equilíbrio da reação catalisada pela *adenilato quinase* (ou *mioquinase*)

$$2\ ADP \leftrightharpoons ATP + AMP$$

favorece a formação de ATP, fornecendo energia adicional para o trabalho muscular, 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. Com efeito, alguns músculos são capazes de mobilizar glicogênio, sem conversão detectável de fosforilase *b* em *a*.

Embora a regulação da glicogênio fosforilase por modificação covalente seja a mais importante e de resultados mais radicais, o conjunto das duas regulações converge todas as formas da enzima para as formas ativas.

A degradação do glicogênio libera glicose 1-fosfato[1], que, isomerizada a glicose 6-fosfato, é metabolizada nas células musculares pela via glicolítica que também está estimulada. A contração muscular, por períodos curtos, é sustentada pelo ATP produzido na glicólise. É importante lembrar que a glicose proveniente da glicogenólise muscular destina-se *sempre* a uso interno, ao contrário do que acontece no fígado.

20.1.2 Regulação da síntese do glicogênio muscular

cAMP e Ca^{2+} estimulam a degradação e inibem a síntese do glicogênio muscular

Quando a degradação de glicogênio está estimulada, a síntese está inibida. Esta regulação oposta e simultânea acontece porque (1) a enzima que catalisa a glicogenólise (glicogênio fosforilase) é *ativa* na forma fosforilada, ao passo que a enzima que catalisa a glicogênese (glicogênio sintase) é *inativa* na forma fosforilada e (2) as duas enzimas são substratos da mesma cascata enzimática que determina a fosforilação de proteínas. A adrenalina, portanto, determina 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 (Figura 20.2).

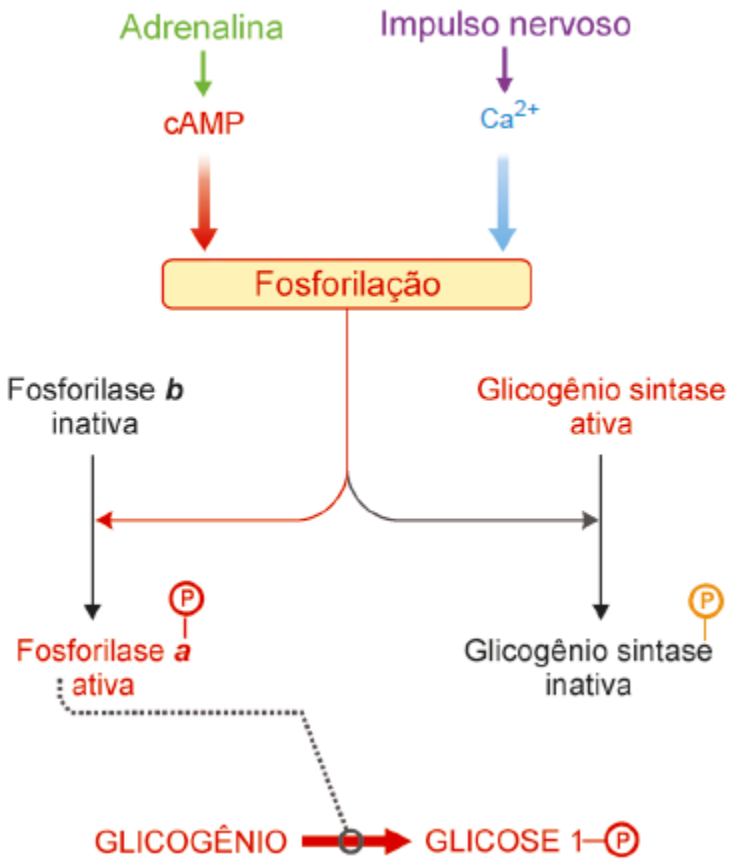


Figura 20.2 Esquema resumindo os eventos de fosforilação provocados por adrenalina e estímulo nervoso que acarretam o estímulo da degradação e a inibição da síntese do glicogênio muscular.

A regulação da síntese de glicogênio é mais complexa e menos conhecida do que a regulação da degradação. A forma fosforilada e inativa da glicogênio sintase é chamada de *glicogênio sintase b* (*GS b*) ou *glicogênio sintase* ***D*** (*GSD*), por ser ***d***ependente de glicose 6-fosfato como efetuador alostérico positivo; a forma desfosforilada e ativa é a *glicogênio sintase a* (*GS a*) ou *glicogênio sintase* ***I*** (*GSI*), por ser ***i***ndependente de glicose 6-fosfato. Como acontece com a glicogênio fosforilase, a regulação da glicogênio sintase por modificação covalente é a mais importante, mas a regulação alostérica pode ser significativa em algumas situações. Por exemplo, quando a fosfofrutoquinase 1 está inibida (Seção 20.2), há acúmulo de glicose 6-fosfato que ativa a GSD, promovendo a síntese de glicogênio.

A glicogênio sintase de músculos pode ser fosforilada em nove resíduos de serina, pela ação de onze proteína quinases. Neste aspecto, difere da glicogênio fosforilase que é regulada pela fosforilação de um único resíduo de serina e catalisada por uma única enzima, a fosforilase quinase.

A inativação da glicogênio sintase, por conversão da forma GSI em GSD, é acionada pelos mesmos sinais, hormonal e nervoso, que causam a estimulação da glicogenólise (Figura 20.3). Neste caso, além das proteína quinases da cascata da degradação do glicogênio — PKA e fosforilase quinase —, são consideradas importantes a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), a proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina e a proteína quinase dependente de AMP (AMPK).

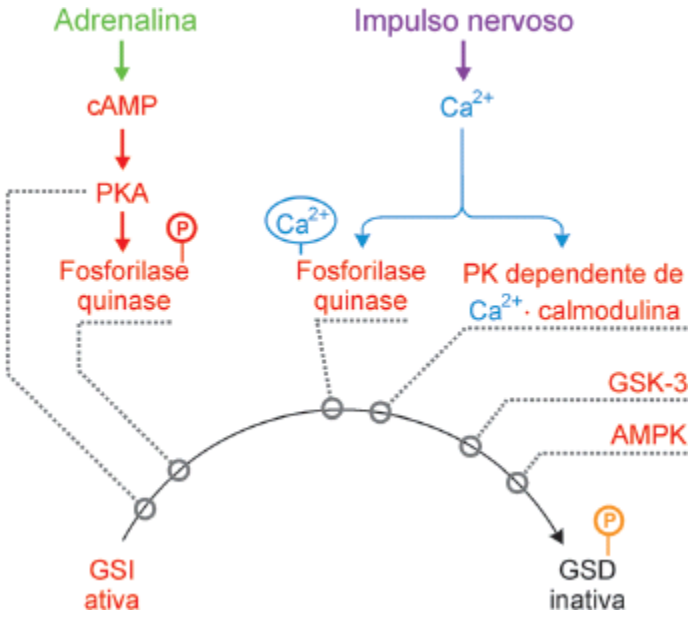


Figura 20.3 Cascata enzimática de inibição da síntese de glicogênio muscular. A conversão da forma ativa, GSI, na inativa, GSD, é promovida pela PKA e pela fosforilase quinase, como na glicogenólise, e também pela proteína quinase dependente deCa^{21}· calmodulina, glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) e proteína quinase dependente de AMP (AMPK). As formas ativas das enzimas estão representadas em vermelho.

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 (PKA) ativa.
4. Enzimas da glicogenólise fosforiladas pela PKA e estimuladas; glicogênio sintase fosforilada, porém inibida, devido à ação das diversas proteína quinases citadas.

Os eventos que ocorrem para reverter cada uma destas condições são os seguintes:

1. Graças à atividade GTPásica da subunidade α da proteína G, o GTP a ela associado é hidrolisado a GDP. Esta mudança de nucleotídios diminui a afinidade da subunidade α pela adenilato ciclase e as duas se separam: a subunidade α associa-se às outras subunidades da proteína G e a adenilato ciclase fica inativa, cessando a produção de cAMP (Figura 19.4 a).
2. A fosfodiesterase hidrolisa o cAMP a 5′-AMP, reduzindo a concentração celular do nucleotídio cíclico.
3. Desligada do cAMP, a subunidade reguladora da PKA volta a associar-se à subunidade catalítica e a enzima torna-se inativa.
4. As enzimas fosforiladas têm seus grupos fosfato removidos por hidrólise catalisada pela fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1). Durante o tempo em que prevaleceu a ação da adrenalina, a PP-1 estava bloqueada por fosforilação de sua subunidade GM e do seu Inibidor I-1 catalisada pela PKA (Figura 19.6).

Desta forma, quando termina o estímulo de adrenalina, as condições prevalecentes não permitem que aconteçam novas fosforilações de proteínas. A mudança decisiva no sentido do metabolismo do glicogênio

dá-se quando as enzimas então fosforiladas têm os seus grupos fosfato removidos, por intervenção da insulina.

A insulina promove a síntese de glicogênio

A síntese de glicogênio depende, de forma essencial, da insulina. O exato mecanismo de sua atuação apresenta pontos obscuros, mas um de seus efeitos reconhecidos é causar a desfosforilação de proteínas (Seção 19.6.3). Este efeito seria devido à estimulação da proteína quinase B (PKB), o componente final da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), uma das vias de transdução de sinal de insulina. PKB fosforila enzimas reguladoras, causando mudanças em suas atividades. A glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) e a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) são bloqueadas, deixando de fosforilar suas proteínas-substrato (Figura 20.3); a ativação da fosfodiesterase determina a queda do nível de cAMP, resultando no bloqueio da PKA (Figura 20.1); da estimulação de PP-1 decorre a remoção de grupos fosfato de suas enzimas-alvo (Figura 20.4). Todas estas alterações fazem predominar as formas enzimáticas desfosforiladas, inativas no caso da degradação do glicogênio e ativa na síntese. A insulina também promove a síntese da glicogênio sintase.

Para que a glicogenogênese possa ser levada a cabo, é obviamente necessário que, além da adequação das atividades enzimáticas, haja disponibilidade do substrato precursor, a glicose. As fibras musculares são insulinodependentes, só podendo receber glicose quando, em virtude de glicemia elevada, o pâncreas libera insulina. Isto é o que ocorre após as refeições, permitindo que a maior parte da glicose plasmática seja captada e convertida a glicogênio, já que, nesta situação, o transporte de glicose é estimulado e as regulações das enzimas inibem a degradação do glicogênio e ativam a sua síntese.

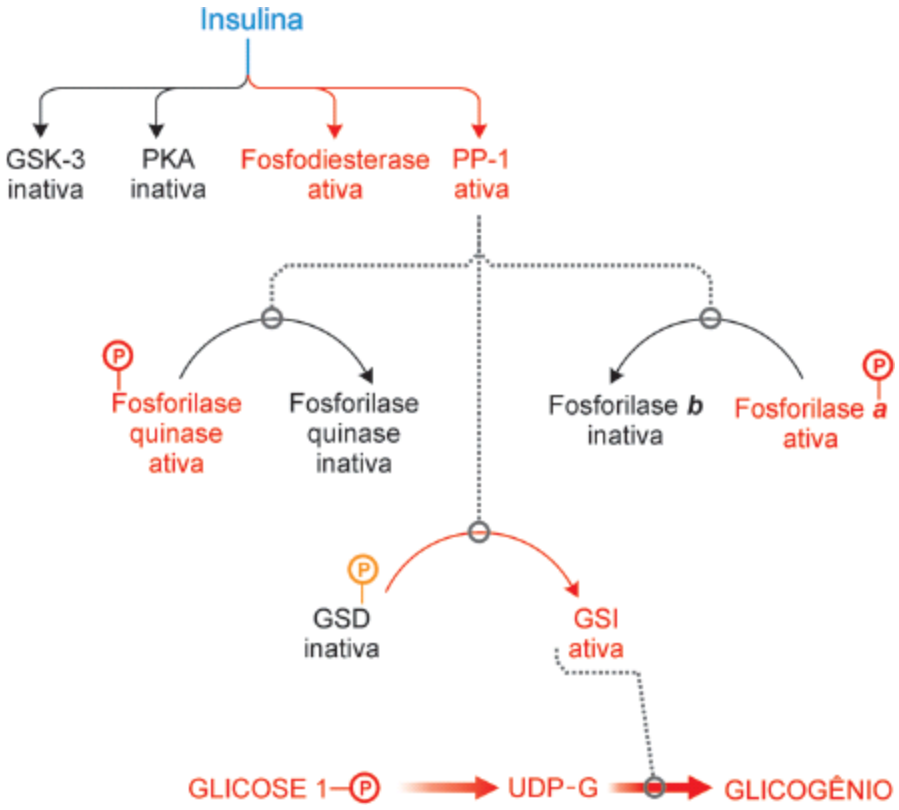


Figura 20.4 Desfosforilação de enzimas do metabolismo do glicogênio muscular, determinada por insulina. Grupos fosfato deixam de ser adicionados ou passam a ser hidrolisados, devido a mudanças na atividade das enzimas: glicogênio fosforilase quinase 3 (GSK-3), proteína quinase A (PKA), fosfodiesterase de cAMP e fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1), descritas no texto. As enzimas envolvidas na degradação do glicogênio param de atuar e a glicogênio sintase é convertida à forma ativa (GSI), podendo catalisar a síntese de glicogênio.

20.1.3 Regulação do metabolismo do glicogênio hepático

A regulação do metabolismo do glicogênio hepático é semelhante à do muscular

No fígado, o metabolismo do glicogênio é regulado por cascatas de reações semelhantes às descritas para o músculo, que resultam em ativação da glicogenólise e inibição da glicogenogênese.

No caso da degradação do glicogênio, entretanto, fígado e músculo diferem quanto ao principal estímulo hormonal: nos hepatócitos ele é

provocado por glucagon. A lógica funcional desta diferença está no destino da glicose resultante da degradação. No músculo, a glicose é destinada à glicólise, à obtenção de ATP pelo próprio músculo. No fígado, a glicose é exportada para corrigir a hipoglicemia que assinalou a liberação do glucagon.

A adrenalina também atua sobre o metabolismo do glicogênio hepático, embora este controle seja secundário em relação àquele exercido por glucagon. Os efeitos da adrenalina são mediados por sua ligação a *receptores*β — com ativação da via de sinalização da PKA, à semelhança do que ocorre no músculo — e a *receptores*α_1, com estimulação da via da fosfolipase C (Seção 19.4.2). Dois segundos mensageiros desta via (Figura 20.5), íons Ca^{2+} e 1,2-diacilglicerol (DAG), ativam a glicogênio fosforilase quinase, a proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina e a proteína quinase C (PKC). Essas quinases fosforilam e estimulam a glicogênio fosforilase e, coadjuvadas pela glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) e pela proteína quinase dependente de AMP (AMPK), fosforilam e inibem a glicogênio sintase.

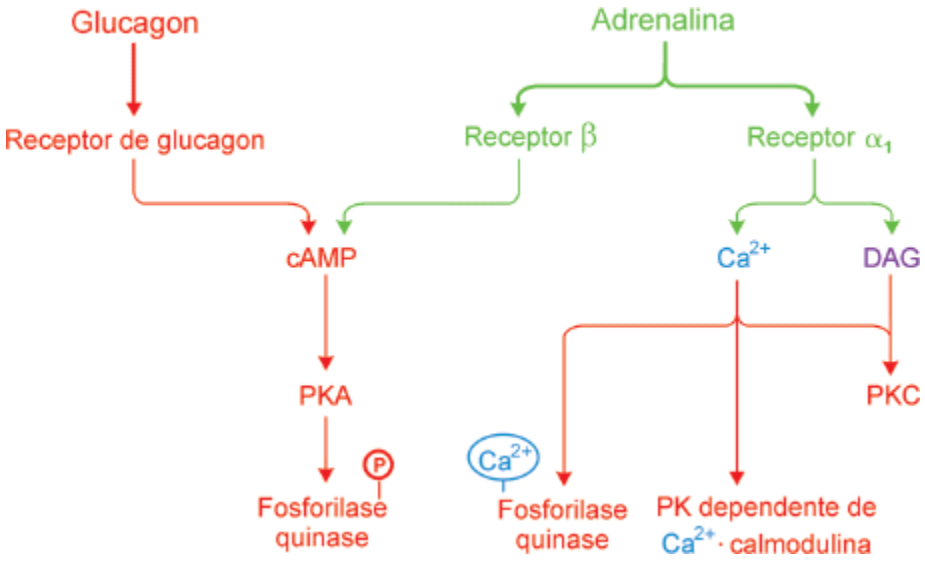


Figura 20.5 Regulação do metabolismo do glicogênio hepático por glucagon e adrenalina. A interação dos hormônios com seus receptores na membrana plasmática dos hepatócitos (receptores β da adrenalina) ativa a via da proteína quinase A (PKA), que tem cAMP como segundo mensageiro; PKA fosforila e estimula a fosforilase quinase. A adrenalina

também se liga a receptores α_1, acionando a via da fosfolipase C. Os segundos mensageiros desta via, íons Ca^{2+} e 1,2-diacilglicerol (DAG), estimulam a fosforilase quinase, a proteína quinase dependente de Ca^{2+} · calmodulina e a proteína quinase C (PKC). A ativação dos três receptores hormonais tem como consequência promover a degradação e inibir a síntese do glicogênio.

A síntese do glicogênio hepático, assim como a de músculo, é promovida por insulina. A glicogênio sintase hepática pode ser fosforilada em sete resíduos de serina. A remoção dos grupos fosfato é catalisada por uma isoenzima da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1), que se liga ao glicogênio pela subunidade GL, cuja síntese é induzida por insulina; diferentemente da isoenzima de músculo, não é regulada por fosforilação, mas por alosteria. A glicogênio sintase também é ativada por glicose 6-fosfato, que a torna mais sensível à ação da PP-1.

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 glicoquinase, 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.

A própria glicose contribui para que o glicogênio seja sintetizado em vez de degradado, atuando como efetuador alostérico. Quando sua concentração nos hepatócitos aumenta, refletindo o aumento de sua concentração plasmática, a glicose liga-se à glicogênio fosforilase *a*, tornando os grupos fosfato mais acessíveis à fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1). Desfosforilada, a forma *b* é inativa. Adicionalmente, PP-1 é inibida alostericamente por ligação, à sua subunidade GL, da glicogênio fosforilase *a*; a conversão da fosforilase à forma *b* induzida por glicose resulta na liberação de PP-1-GL, que pode, então, desfosforilar e ativar a glicogênio sintase. O papel regulador exercido pela glicose é análogo ao da glicose 6-fosfato sobre a glicogênio sintase.

A glicose 1-fosfato obtida da degradação do glicogênio é quase sempre isomerizada a glicose 6-fosfato. Este açúcar, no fígado, é hidrolisado a glicose, que é liberada na circulação — nas situações em que a

glicogenólise hepática ocorre, a glicose 6-fosfato não pode ser metabolizada pela glicólise, por que esta via está inibida.

20.2 Regulação da glicólise e da gliconeogênese

A glicólise é encontrada em todas as células de mamíferos. No fígado e no córtex renal, processa-se também a gliconeogênese, uma via antagônica à glicólise. Nestes órgãos, a regulação das duas vias é feita de forma inversa, 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.

20.2.1 Regulação alostérica e por modificação covalente

Há três sítios de controle da glicólise e da gliconeogênese: 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. A próxima tabela resume os controles das duas vias.

Sítios de controle da glicólise e gliconeogênese (Etapas diferentes nas duas vias)	Enzimas-alvo da regulação (Reações irreversíveis)			
Conversão entre:	Glicólise		Gliconeogênese	
1) Glicose e glicose 6-fosfato	Glicoquinase		Glicose 6-fosfatase	
2) Frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato	Fosfofrutoquinase 1		Frutose 1,6-bisfosfatase	
3) Fosfoenolpiruvato e piruvato	Piruvato quinase		Fosfoenolpiruvato carboxiquinase + piruvato carboxilase	

Segue-se a análise dos três sítios de controle da glicólise e da gliconeogênese, no *fígado*, o principal órgão responsável pela gliconeogênese e no *músculo*.

Primeiro sítio de controle: glicoquinase e glicose 6-fosfatase

A primeira reação da glicólise

$$\text{Glicose} + \text{ATP} \longrightarrow \text{Glicose 6-fosfato} + \text{ADP} + \text{H}^+$$

é catalisada pelas *hexoquinases I* a *III*, na maioria dos tecidos de mamíferos. As três isoenzimas exibem cinética *michaeliana* típica (Figura 20.6) e alta afinidade por glicose, com valores de K_M entre 0,01 e 0,1 mM. Como o intervalo fisiológico de flutuação da concentração de glicose plasmática é de 5 a 8 mM, estas hexoquinases funcionam sempre em velocidade máxima ($V_{máx}$). Ou seja, a velocidade da reação que catalisam independe do valor da glicemia, assegurando um suprimento constante de glicose para células estritamente dependentes deste açúcar, como as do cérebro e hemácias, e também para outros tecidos como o muscular, adiposo etc. Outro mecanismo de regulação permite ajustar a captação de glicose pelo tecido à sua utilização — o produto da reação, *glicose 6-fosfato*, é um potente inibidor das hexoquinases I-III. Quando a utilização da glicose 6-fosfato diminui, sua concentração aumenta e as hexoquinases ficam momentaneamente inibidas, limitando a fosforilação da glicose. Assim, no período absortivo, quando o nível de insulina é alto, as fibras musculares recebem glicose (GLUT 4, o transportador de glicose nestas células é estimulado por insulina) e utilizam-na para obtenção de ATP e para síntese de glicogênio. Saturados os estoques de glicogênio, a utilização da glicose 6-fosfato diminui, restringindo a captação de glicose plasmática.

No fígado, a situação é diferente, pela presença da *hexoquinase IV* ou *glicoquinase*[2]. Embora promovendo a mesma reação, esta isoenzima tem propriedades cinéticas diferentes das outras hexoquinases e, até mesmo, excêntricas. Apesar de ser uma enzima monomérica, a glicoquinase exibe cooperatividade na ligação com o substrato, refletida em uma curva sigmoide de saturação com glicose (Figura 20.6), à semelhança das enzimas

alostéricas, que são oligoméricas. A concentração de glicose que estabelece a metade da $V_{máx}$ da reação catalisada pela glicoquinase — designada $K_{0,5}$ ou $S_{0,5}$, em vez de K_M, por não obedecer à cinética de Michaelis-Menten — é cerca de 5 mM, próxima da glicemia de jejum e dezenas de vezes maior do que o K_M das outras hexoquinases. A glicoquinase difere das outras hexoquinases por ter afinidade muito menor pela glicose e por não ser inibida pela glicose 6-fosfato.

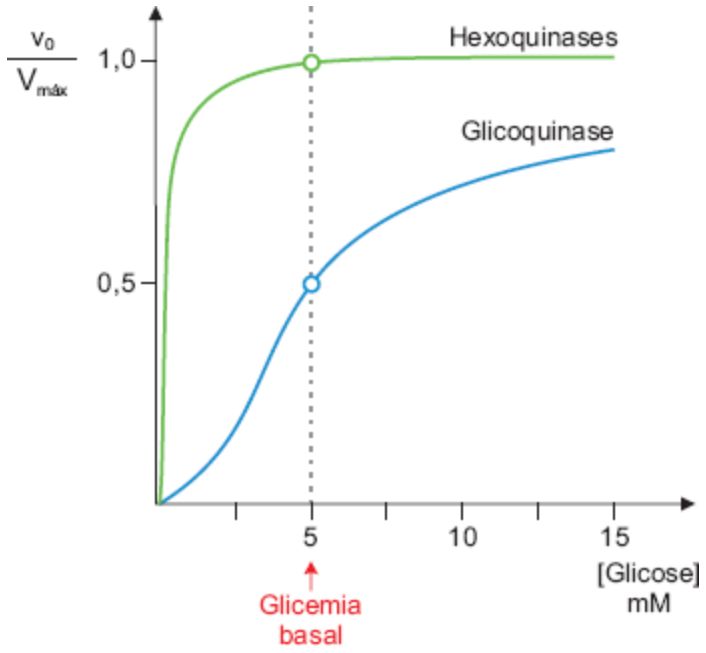


Figura 20.6 Curvas de saturação com glicose para as hexoquinases I a III e para a glicoquinase. Em valores próximos da concentração basal (de jejum) de glicose plasmática (5 mM), as hexoquinases funcionam em velocidade constante, ao passo que a glicoquinase catalisa a reação em velocidades proporcionais à glicemia. $v_0/V_{máx}$ 5 velocidades relativas de reação.

A importância do valor de $K_{0,5}$ da glicoquinase é adaptar rigorosamente sua atividade à glicemia, pois aumentos do nível sanguíneo de glicose levam a aumentos significativos da velocidade da reação. É o que acontece após a ingestão de uma refeição: a maior velocidade da reação da glicoquinase permite converter o excedente de glicose em glicogênio, armazenado no fígado, e em triacilgliceróis, estocados no tecido adiposo.

Nesta situação, também se eleva a velocidade do transporte por GLUT 2 (Seção 19.6.3), possibilitando a entrada de glicose nos hepatócitos. Por outro lado, quando há redução da glicemia, a baixa afinidade da glicoquinase pelo açúcar limita sua tomada pelo fígado, deixando-o disponível para os tecidos que dele não podem prescindir.

Quando a concentração plasmática de glicose é baixa, a atuação da glicoquinase é restringida, não somente devido à sua baixa afinidade pelo substrato, mas também porque a enzima é bloqueada por uma *proteína reguladora*. Esta proteína altera a atividade da glicoquinase e a sua localização intracelular. A proteína reguladora localiza-se no núcleo do hepatócito, para onde sequestra a glicoquinase, com a qual forma um complexo inativo. Na presença de altos níveis de glicose, a afinidade da proteína reguladora pela glicoquinase diminui, o complexo é desfeito e a glicoquinase passa para o citosol, onde pode catalisar a fosforilação da glicose. Por outro lado, a frutose 6-fosfato promove a formação do complexo nuclear inativo. O acúmulo de frutose 6-fosfato sinaliza interrupção da glicólise em etapas posteriores, coadunando-se com a inibição da glicoquinase. O glucagon, liberado na hipoglicemia, bloqueia a mobilização da enzima para o citosol — a glicoquinase transita entre o citosol e o núcleo dependendo da disponibilidade de substrato e das condições hormonais vigentes. Em resumo, as propriedades da glicoquinase, aliadas às de GLUT 2, capacitam o fígado a fazer ajustes na glicemia e utilizar a glicose apenas quando ela é abundante.

Na gliconeogênese, a etapa contrária à fosforilação da glicose é catalisada pela *glicose 6-fosfatase*:

$$\text{Glicose 6-fosfato} + H_2O \longrightarrow \text{Glicose} + P_i$$

O valor do K_M da glicose 6-fosfatase é muito maior do que a concentração basal de glicose 6-fosfato nos hepatócitos, de modo que sua atividade é proporcional ao conteúdo intracelular de seu substrato. A produção de glicose 6-fosfato aumenta em virtude do estímulo da glicogenólise e da gliconeogênese no jejum, quando a atuação da glicose 6-fosfatase é decisiva para a exportação de glicose do fígado para outros órgãos; nesta condição, a via glicolítica encontra-se inibida. Nenhuma

regulação alostérica é conhecida para a glicose 6-fosfatase; o controle existe no nível da transcrição.

Segundo sítio de controle: fosfofrutoquinase 1 e frutose 1,6-bisfosfatase

A conversão de frutose 6-fosfato a frutose 1,6-bisfosfato é promovida pela *fosfofrutoquinase 1* na glicólise e a transformação oposta, na gliconeogênese, pela *frutose 1,6-bisfosfatase* (Figura 20.7 a). Estas reações compõem a etapa mais importante e a mais complexa da regulação das duas vias. A seguir, estão indicados os principais efetuadores alostéricos das duas enzimas:

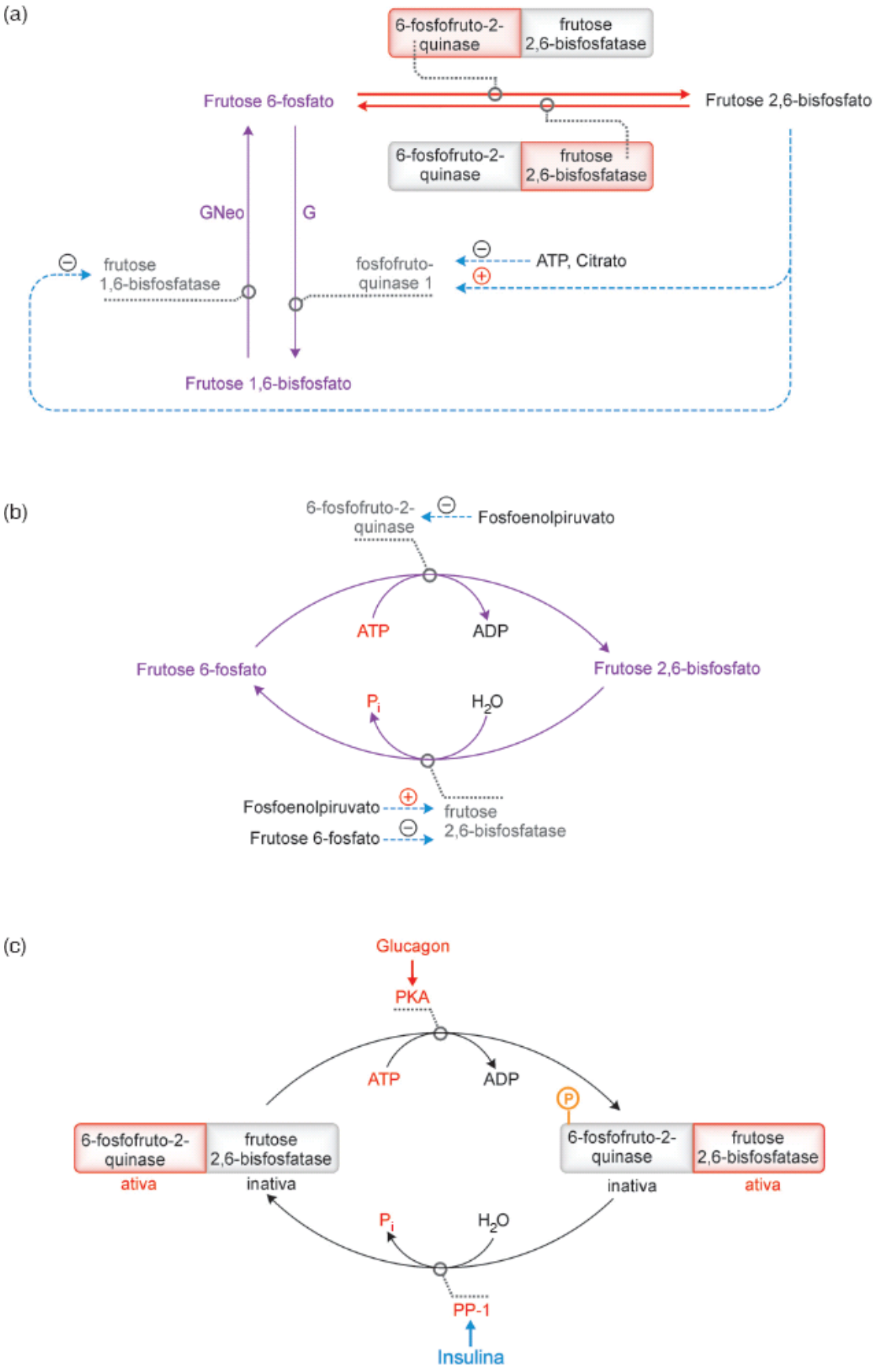

(a)
6-fosfofruto-2-quinase
frutose 2,6-bisfosfatase
Frutose 6-fosfato
Frutose 2,6-bisfosfato
6-fosfofruto-2-quinase
frutose 2,6-bisfosfatase
GNeo
G
frutose 1,6-bisfosfatase
fosfofruto-quinase 1
ATP, Citrato
Frutose 1,6-bisfosfato
(b)
6-fosfofruto-2-quinase
Fosfoenolpiruvato
ATP
ADP
Frutose 6-fosfato
Frutose 2,6-bisfosfato
Pi
H2O
Fosfoenolpiruvato
Frutose 6-fosfato
frutose 2,6-bisfosfatase
(c)
Glucagon
PKA
ATP
ADP
P
6-fosfofruto-2-quinase
frutose 2,6-bisfosfatase
ativa
inativa
6-fosfofruto-2-quinase
frutose 2,6-bisfosfatase
inativa
ativa
Pi
H2O
PP-1
Insulina

Figura 20.7 Segundo sítio de controle da glicólise/gliconeogênese: interconversão de frutose 6-fosfato e frutose 1,6-bisfosfato. As setas tracejadas azuis indicam regulações alostéricas, positivas (+) e negativas (–). a) Regulação alostérica da fosfofrutoquinase 1, a enzima da glicólise (G), e da frutose 1,6-bisfosfatase, da gliconeogênese (GNeo). A 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase está representada por um retângulo contendo os domínios com atividade de quinase e de fosfatase. b) Regulação alostérica da formação e da hidrólise de frutose 2,6-bisfosfato catalisadas pelas atividades de 6-fosfofruto-2-quinase e de frutose 2,6-bisfosfatase da enzima bifuncional. P_i = fosfato inorgânico (HPO_4^{2-}). c) Regulação por modificação covalente da 6 - fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase. Ⓟ = grupo fosfato (PO_3^{2-}).

	Efetuadores alostéricos	
Enzimas	**Negativos**	**Positivos**
Fosfofrutoquinase 1	ATP; Citrato	AMP; Frutose 2,6-bisfosfato
Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 2,6-bisfosfato	—

A inibição da fosfofrutoquinase 1, também chamada *6-fosfofruto-1-quinase*, por *ATP* representa uma situação clássica de regulação por *feedback* ou retroinibição, em que um produto final da via regula sua velocidade. A inibição por *citrato* permite adequar a intensidade da glicólise à do ciclo de Krebs: se o suprimento de substratos para o ciclo ultrapassa sua capacidade de utilizá-los, acumula-se citrato que, difundindo-se para o citosol, inibe a fosfofrutoquinase 1.

A ativação da fosfofrutoquinase 1 por *AMP* é particularmente importante no caso de músculos esqueléticos em contração vigorosa, quando aumenta a concentração de AMP. Nesta situação, também cresce a disponibilidade de substrato para a glicólise, por duas razões: a proteína quinase dependente de AMP (AMPK) promove a migração de GLUT 4 para a superfície celular, o que faz aumentar o transporte de glicose plasmática; o metabolismo do glicogênio está regulado no sentido degradativo, fornecendo glicose intracelularmente. A consequência é uma

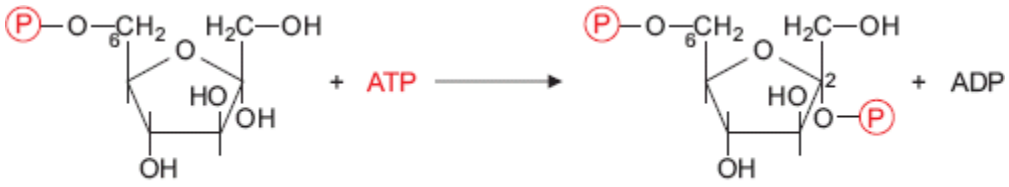
aceleração da glicólise, com produção de grande quantidade de NADH. O aporte de oxigênio para o músculo é de início insuficiente para permitir a oxidação de NADH pela cadeia de transporte de elétrons. Resulta um aumento da concentração de NADH mitocondrial, que acaba por refletir-se no citosol, pois há pouco NAD^+ na mitocôndria para ser usado pelo sistema de lançadeira para oxidar o NADH citosólico. Este é, então, oxidado na reação catalisada pela *lactato desidrogenase*, que reduz piruvato a lactato. O NAD^+ assim produzido permite o prosseguimento da glicólise anaeróbia, gerando ATP para sustentar a contração muscular. O lactato é captado pelo fígado, que é capaz de convertê-lo a glicose. Esta, uma vez na circulação, pode ser aproveitada pelas células musculares, onde o seu transporte está estimulado.

No fígado, a *frutose 2,6-bisfosfato* é o efetuador alostérico mais potente na ativação da fosfofrutoquinase 1 e na inibição da frutose 1,6-bisfosfatase. O controle da atividade da glicólise e da gliconeogênese vai depender da concentração desta forma bisfosforilada da frutose. Sendo assim, sua própria produção está sob controle estrito.

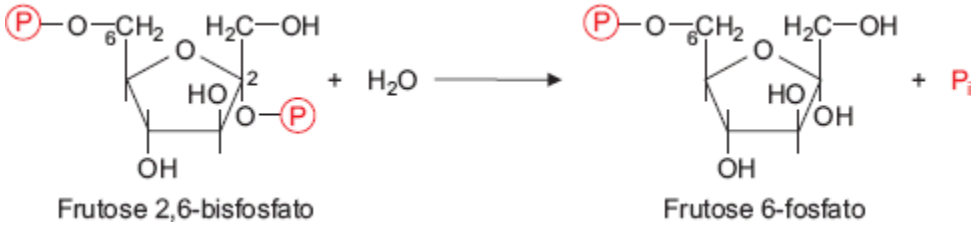
A produção de frutose 2,6-bisfosfato é submetida a controle alostérico e hormonal

O conteúdo celular de frutose 2,6-bisfosfato está na dependência de duas ações catalíticas — quinase e fosfatase —, presentes em domínios diferentes de uma mesma enzima bifuncional, chamada *6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase*. A atividade de quinase é, às vezes, denominada *fosfofrutoquinase 2*, para distingui-la da fosfofrutoquinase 1. As duas fosfofrutoquinases são relacionadas: a fosfofrutoquinase 1, que catalisa a produção de um intermediário da glicólise, a frutose 1,6-bisfosfato, é ativada alostericamente pelo produto da reação da fosfofrutoquinase 2, a frutose 2,6-bisfosfato.

A frutose 2,6-bisfosfato é produzida pela seguinte reação, catalisada pela *6-fosfofruto-2-quinase* da enzima bifuncional:



A frutose 2,6-bisfosfato, além de não ser um intermediário da glicólise, 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, catalisada pela *frutose 2,6-bisfosfatase* da enzima bifuncional:



Assim, quando a atividade de 6-fosfofruto-2-quinase está favorecida, aumenta a concentração de frutose 2,6-bisfosfato; o oposto ocorre quando prevalece a ação de frutose 2,6-bisfosfatase. Como já citado, a frutose 2,6-bisfosfato ativa fortemente a fosfofrutoquinase 1 e inibe a frutose 1,6-bisfosfatase, favorecendo a glicólise e restringindo a gliconeogênese (Figura 20.7 a).

A 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, responsável pelo nível de frutose 2,6-bisfosfato, está submetida a controle alostérico e por modificação covalente.

A regulação alostérica da enzima bifuncional está mostrada na tabela a seguir e na Figura 20.7 b.

	Efetuadores alostéricos	
Atividades da enzima bifuncional	**Negativos**	**Positivos**
6-Fosfofruto-2-quinase	Fosfoenolpiruvato	—
Frutose 2,6-bisfosfatase	Frutose 6-fosfato	Fosfoenolpiruvato

Deste modo, o teor de frutose 2,6-bisfosfato depende diretamente do nível de frutose 6-fosfato e inversamente do nível de fosfoenolpiruvato. O aumento da concentração de *fosfoenolpiruvato* indica (1) que este composto não está sendo utilizado pela piruvato quinase ou (2) que está sendo produzido pela gliconeogênese. Em qualquer dos dois casos, os seus efeitos sobre as atividades da enzima bifuncional levam à queda da concentração de frutose 2,6-bisfosfato, diminuindo a velocidade da glicólise e abrindo caminho para que se complete a gliconeogênese. Por outro lado, altos níveis de *frutose 6-fosfato* decorrem de altos níveis de glicose — o acúmulo de frutose 6-fosfato assinala a necessidade de sua utilização pela glicólise e impede a síntese de glicose quando este açúcar está disponível. Isto é obtido pelo bloqueio exercido pela frutose 6-fosfato sobre a frutose 2,6-bisfosfatase: a concentração de frutose 2,6-bisfosfato aumenta, estimulando a fosfofrutoquinase 1 e a oxidação da glicose e inibindo a frutose 1,6-bisfosfatase e a produção de glicose.

Em mamíferos, foram descritas quatro isoenzimas da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, que apresentam localização e mecanismos de regulação característicos. No caso da isoenzima hepática, o predomínio de uma de suas duas atividades depende de regulação por modificação covalente. Sob estímulo de glucagon, principalmente, e de adrenalina, a via de transdução de sinal da PKA é acionada e a enzima bifuncional é fosforilada em um resíduo de serina do segmento aminoterminal: sua atividade de quinase é inibida e a de fosfatase é estimulada (Figura 20.7 c), o que faz reduzir a concentração de frutose 2,6-bisfosfato. Por consequência, a fosfofrutoquinase 1 fica inativa, impedindo a glicólise, e a frutose 1,6-bisfosfatase tem sua atividade restabelecida, levando ao estímulo da gliconeogênese.

A enzima bifuncional de músculos esqueléticos difere da isoenzima de fígado por não conter sítios de fosforilação na porção aminoterminal, não sofrendo regulação por modificação covalente.

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. À medida que se prolonga o jejum e vai sendo esgotado o suprimento de glicogênio hepático, aumenta a importância da gliconeogênese para a produção de glicose. O fluxo gliconeogênico soma-

se à degradação do glicogênio, aumentando a produção de 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.

A insulina, liberada em hiperglicemia, tem efeito oposto ao glucagon e à adrenalina. Por intermédio de diversos mecanismos, que incluem a atuação da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1), a insulina promove a desfosforilação da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, que passa a exibir apenas a atividade de quinase. Os níveis de frutose 2,6-bisfosfato aumentam, ativando a fosfofrutoquinase 1 e inibindo a frutose 1,6-bisfosfatase: a glicólise é ativada e a gliconeogênese é bloqueada, frente a situações de grande oferta de glicose, como após as refeições.

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 e adrenalina, 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 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase. A isoenzima bifuncional de músculo cardíaco apresenta em sua porção carboxila terminal vários resíduos de serina, passíveis de fosforilação por proteína quinases componentes de diversas vias de sinalização. Tais modificações covalentes ativam a 6-fosfofruto-2-quinase, em vez de inibir, como ocorre com a isoenzima hepática, a concentração de frutose 2,6-bisfosfato aumenta, estimulando a fosfofrutoquinase 1 e, portanto, a glicólise.

Adrenalina, hipóxia, insulina e contração intensa ativam a glicólise no miocárdio por determinarem a fosforilação e a estimulação da atividade de quinase da enzima bifuncional. A liberação de adrenalina sinaliza a necessidade de produção de ATP para sustentar o trabalho muscular e seu efeito é mediado pela proteína quinase A (PKA). A glicólise no coração

também é estimulada quando o fluxo sanguíneo é deficiente, como na isquemia do miocárdio. Nestas condições, o déficit de oxigênio impede o prosseguimento da fosforilação oxidativa e a única fonte de ATP é a glicólise: a síntese de ATP é reduzida, acarretando aumento na concentração de AMP. A consequência é a estimulação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) que fosforila a enzima bifuncional, coadjuvando o efeito da PKA. A resposta à insulina inclui a ativação da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e da proteína quinase B (PKB), que adiciona grupos fosfato à enzima bifuncional, acarretando a estimulação da glicólise; assim, quando os níveis sanguíneos de glicose se elevam, o coração pode passar a usar glicose em vez de ácidos graxos.

Há indicações que, nos músculos esqueléticos, o exercício faz aumentar o nível de frutose 2,6-bisfosfato. Este aumento deve-se à mudança do perfil isoenzimático da enzima bifuncional: há diminuição da isoenzima de músculo e aumento da isoenzima cardíaca.

Terceiro sítio de controle: piruvato quinase e piruvato carboxilase + fosfoenolpiruvato carboxiquinase

A regulação do terceiro sítio incide especialmente sobre a *piruvato quinase*.

O efetuador alostérico positivo da piruvato quinase é a *frutose 1,6-bisfosfato* (Figura 20.8 a). 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” para receber o fluxo de substratos da via glicolítica. A piruvato quinase hepática é inibida por *alanina*. Esta regulação é fundamental durante períodos prolongados de jejum, quando o fígado recebe quantidades apreciáveis de alanina, uma das formas de transporte dos aminoácidos provenientes do catabolismo de proteínas musculares. A alanina é um composto gliconeogênico e, para a síntese de glicose, deve sofrer transaminação, originando piruvato. O piruvato é transformado 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. Como descrito no segundo sítio de controle da glicólise/gliconeogênese, este composto atua como efetuador alostérico da 6-fosfofruto-2-

quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, inibindo sua atividade de quinase e estimulando a de fosfatase. Decresce a concentração de frutose 2,6-bisfosfato, cessando o estímulo sobre a fosfofrutoquinase 1 e o bloqueio da frutose 1,6-bisfosfatase. As consequências são a interrupção da via glicolítica e a ativação simultânea da gliconeogênese.

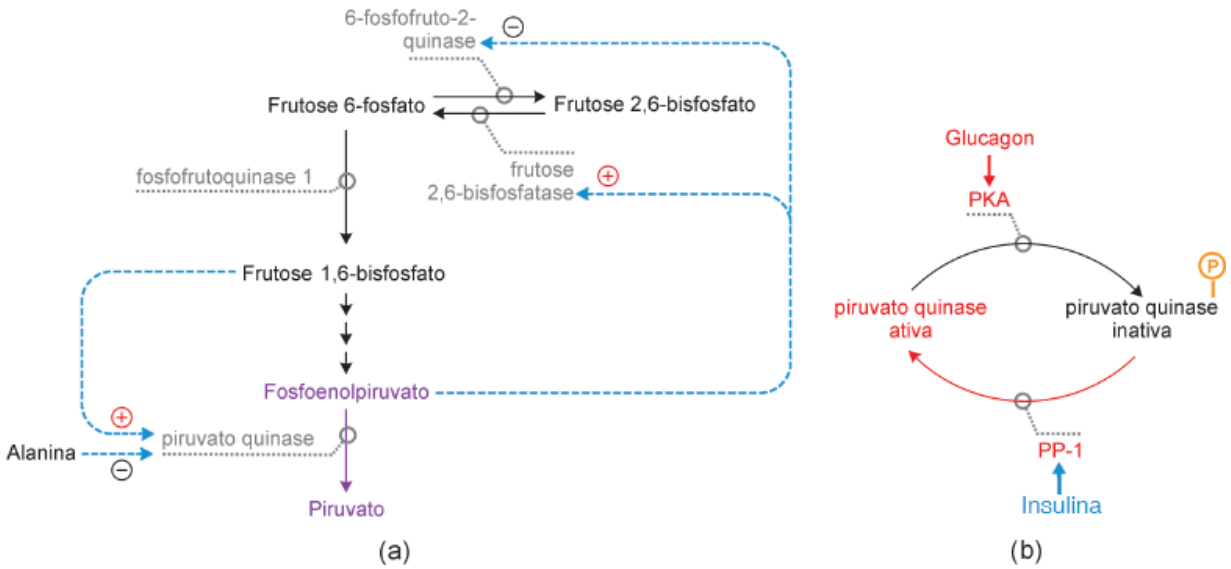


Figura 20.8 Terceiro sítio de controle da glicólise/gliconeogênese: piruvato quinase. a) Regulação alostérica. A enzima é estimulada por frutose 1,6-bisfosfato, cuja produção cresce com a disponibilidade de glicose; é inibida por alanina e, neste caso, o fosfoenolpiruvato inibe a formação de frutose 2,6-bisfosfato, o principal ativador da fosfofrutoquinase 1: a glicólise é desacelerada e a gliconeogênese, favorecida. b) Regulação por modificação covalente. Sob estímulo de glucagon, a piruvato quinase é fosforilada pela proteína quinase A (PKA), tornando-se inativa e favorecendo a gliconeogênese; na presença de insulina, a remoção de grupo fosfato pela fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1) ativa a enzima, propiciando o consumo de glicose pela glicólise.

A piruvato quinase dos hepatócitos também sofre modificação covalente (Figura 20.8 b): a fosforilação converte a forma ativa em inativa. No jejum, o glucagon estimula a via da PKA e esta inativação se processa, aumentando a concentração de *fosfoenolpiruvato*. Em hiperglicemia, sob

ação da insulina, a piruvato quinase é desfosforilada pela proteína fosfatase 1 (PP-1), tornando-se ativa — o sentido das regulações é invertido.

O controle alostérico da piruvato carboxilase está descrito na Seção 20.5. Em relação à fosfoenolpiruvato carboxiquinase, não foram identificados efetuadores alostéricos.

20.2.2 Modulação da concentração de enzimas da glicólise e da gliconeogênese

Outro mecanismo decisivo de regulação da glicólise e da gliconeogênese incide sobre o conteúdo enzimático celular, manifesta-se em prazos mais longos que as regulações alostérica e por modificação covalente, e é exercido pela disponibilidade de substratos na dieta e, principalmente, por ação hormonal.

No fígado, a expressão dos genes da piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase, frutose 1,6-bisfosfatase e glicose 6-fosfatase é induzida por glucagon, glicocorticoides ou catecolaminas. O glucagon ainda inibe a transcrição dos genes da glicoquinase, da fosfofrutoquinase 1 e da piruvato quinase. É o que ocorre no jejum e no diabetes, quando prevalece a sua ação. Outra ação do glucagon, já mencionada, é impedir a translocação, e a consequente estimulação, da glicoquinase do núcleo para o citosol. O resultado é a aceleração da gliconeogênese e a desaceleração da glicólise.

No período absortivo, a insulina estimula a síntese de glicoquinase, fosfofrutoquinase 1 e piruvato quinase, que têm suas concentrações elevadas em torno de cinco vezes, e reprime a produção das enzimas gliconeogênicas induzidas por glucagon. Tais variações da expressão gênica resultam da ativação de vias de transdução de sinal da insulina, como a da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Seção 19.6.3).

A regulação da gliconeogênese hepática é fundamental para o ajuste da glicemia. A insulina é o mais importante hormônio inibidor da via — no diabetes tipo 2, caracterizado por resistência à insulina e/ou por secreção deficiente do hormônio, a produção de glicose pelo fígado é drasticamente aumentada. Os mecanismos sinalizadores que medeiam a regulação das enzimas gliconeogênicas e glicolíticas têm interesse particular, por

constituírem alvos de intervenção farmacológica para restaurar a sensibilidade à insulina.

20.3 Regulação da via das pentoses fosfato

Os produtos principais da via das pentoses fosfato são NADPH e ribose 5-fosfato. A pentose fosfato é precursora da síntese de nucleotídios; NADPH é a coenzima redutora das sínteses de ácidos graxos, colesterol e hormônios esteroides, e de reações de dissipação de radicais livres. As desidrogenases da parte oxidativa da via das pentoses fosfato que convertem $NADP^+$ a NADPH são inibidas competitivamente por NADPH. O bloqueio é abolido por oxidação de NADPH a $NADP^+$ pelos processos citados. Nos seres humanos, as sínteses redutoras ocorrem intensamente no fígado, tecido adiposo, glândulas mamárias, córtex da suprarrenal, ovários e testículos, e os mecanismos antioxidantes, nas hemácias.

O destino da glicose 6-fosfato — via das pentoses fosfato ou glicólise — está subordinado às razões ATP/ADP e NADPH/$NADP^+$ intracelulares. Quando a razão ATP/ADP é baixa (carga energética celular baixa), a glicose é degradada pela via glicolítica, produzindo ATP, pois, nestas condições, a glicólise está estimulada pelos processos reguladores já descritos; não ocorre síntese de ácidos graxos e a razão NADPH/$NADP^+$ é alta, inibindo a via das pentoses fosfato. Se a razão ATP/ADP elevar-se, a fosfofrutoquinase 1 da glicólise é inibida e a síntese de ácidos graxos, favorecida, consumindo NADPH e eliminando a inibição das desidrogenases da via das pentoses fosfato: o metabolismo da glicose 6-fosfato passa a ser desviado para esta via. A formação de ácidos graxos também consome ATP, de modo que, à medida que a razão ATP/ADP diminui, a glicólise volta a ocorrer até que a concentração de ATP aumente, a via seja desacelerada e assim por diante. Deste modo, as velocidades das duas vias oscilam alternadamente, em resposta às razões ATP/ADP e NADPH/$NADP^+$ vigentes. O significado fisiológico deste “desvio” intermitente é propiciar a obtenção de NADPH, mantendo o fluxo dos carbonos precursores de ácidos graxos, originários da glicose.

A ocorrência da via das pentoses fosfato está associada a condições fisiológicas em que predominam processos de síntese. Quando as taxas

glicêmicas são altas, os níveis elevados de insulina resultantes acarretam, no tecido adiposo, aumento da permeabilidade à glicose e, no fígado, da produção de glicoquinase. Tais condições propiciam a síntese de ácidos graxos, que também é estimulada por insulina.

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 ao fato de ambas as vias ocorrerem no citosol e 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. Considerem-se os seguintes exemplos, nos quais:

1. são necessários NADPH e ribose 5-fosfato simultaneamente — há predomínio da parte oxidativa da via.
2. a demanda de ribose 5-fosfato é maior do que a de NADPH — a parte não oxidativa é acionada. As reações das transaldolases e transcetolases convertem frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, produzidos pela glicólise, em ribose 5-fosfato. Esta é a situação vigente na maioria dos tecidos, músculos, por exemplo, que devem produzir ribose 5-fosfato para a síntese de nucleotídios, mas não se encarregam das sínteses redutoras já citadas.
3. a necessidade de NADPH, para produção de ácidos graxos, por exemplo, é maior do que a de ribose 5-fosfato — a ribulose 5-fosfato produzida na parte oxidativa é convertida a frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato pela etapa não oxidativa. A frutose 6-fosfato pode retornar à via das pentoses fosfato após sua conversão a glicose 6-fosfato pela fosfoglicoisomerase ou ganhar a via glicolítica. A maior parte do gliceraldeído 3-fosfato é reconduzido à glicólise e, posteriormente, convertido em acetil-CoA e em ácidos graxos; o restante origina glicerol 3-fosfato,

necessário para a esterificação dos ácidos graxos sintetizados, formando triacilgliceróis.

20.4 Regulação do complexo piruvato desidrogenase

O piruvato tem vários destinos possíveis no fígado: ser totalmente oxidado a CO_2 (via acetil-CoA e ciclo de Krebs), ser reduzido a lactato ou ser utilizado como precursor na síntese de lipídios (via acetil-CoA), de carboidratos (gliconeogênese) e de aminoácidos (transaminação). A ação do *complexo piruvato desidrogenase* (*PD*), transformando piruvato em acetil-CoA, limita os destinos do piruvato: a acetil-CoA só pode ser oxidada ou convertida a lipídios e, em situações particulares, a corpos cetônicos. O complexo enzimático conecta a glicólise ao ciclo de Krebs e à síntese de lipídios, desempenhando papel estratégico no controle da utilização de glicose como fonte de energia ou como substrato precursor na biossíntese de ácidos graxos e colesterol.

O complexo PD de mamíferos contém, além das três enzimas que catalisam a oxidação de piruvato a acetil-CoA (Seção 9.2), duas enzimas reguladoras específicas, a *piruvato desidrogenase quinase* (*PDK*) e a *piruvato desidrogenase fosfatase* (*PDP*). Quando fosforilado pela quinase, o complexo torna-se inativo; a remoção do grupo fosfato pela fosfatase reativa o complexo (Figura 20.9). Foram descritas várias isoenzimas da quinase e da fosfatase. A isoenzima considerada mais importante para a regulação de PD é PDK 4, que é especialmente abundante em músculos esqueléticos e cardíaco, e no fígado.

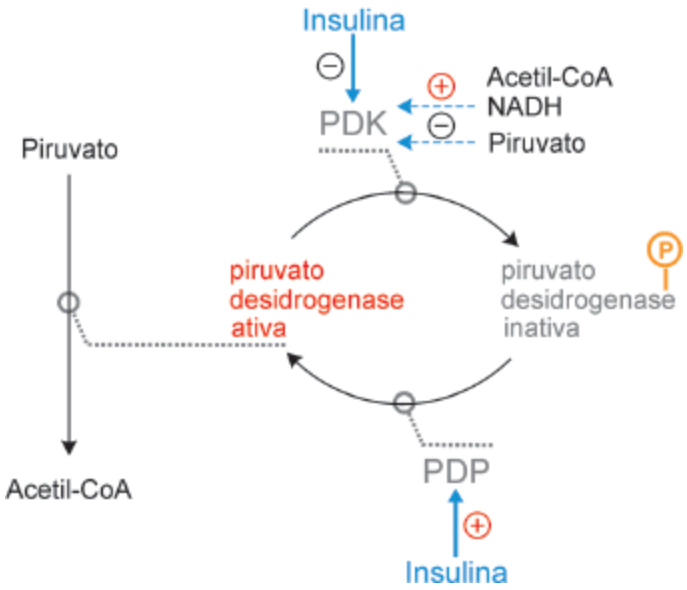


Figura 20.9 Regulação do complexo piruvato desidrogenase. A inibição do complexo por fosforilação é catalisada pela piruvato desidrogenase quinase (PDK); a atividade é restabelecida por hidrólise do grupo fosfato, acionada pela piruvato desidrogenase fosfatase (PDP). Acetil-CoA e NADH são os efetuadores alostéricos positivos da PDK e piruvato, o efetuador negativo. A insulina promove a síntese de PDP e reduz a de PDK, levando à ativação da piruvato desidrogenase.

Os mecanismos de regulação das PDKs incluem ativação alostérica por acetil-CoA e NADH, produtos da reação catalisada por PD e também da β-oxidação de ácidos graxos, e inibição por piruvato, o substrato do complexo. Este sistema de regulação controla a atividade de PD nos períodos fisiológicos de jejum, decorrentes da alimentação intermitente, e no exercício prolongado, quando há intensa oxidação de ácidos graxos e as razões acetil-CoA/CoA e $NADH/NAD^+$ mitocondriais aumentam, estimulando a PDK 4; adicionalmente, no jejum, o efetuador alostérico negativo da PDK 4, o piruvato, é escasso — PD fica inoperante.

A inibição de PD por fosforilação catalisada por PDK 4 no jejum prolongado seleciona o substrato a ser preferencialmente consumido, glicose ou ácidos graxos: favorece a utilização de ácidos graxos e é crucial para a economia de glicose. Os ácidos graxos são oxidados por músculos esqueléticos e cardíaco, fígado etc., poupando glicose para as células dela estritamente dependentes, como as do cérebro e as hemácias. A inativação

de PD facilita a oxidação de ácidos graxos por “economizar” piruvato para a formação de oxaloacetato, cuja oferta ao ciclo de Krebs permite oxidar acetil-CoA.

Tendo em vista que mamíferos não dispõem de vias para converter acetil-CoA em glicose, o bloqueio de PD permite preservar, além da própria glicose, compostos gliconeogênicos quando o açúcar é insuficiente. No fígado, o piruvato disponível pode formar oxaloacetato, que ganha acesso à gliconeogênese, então estimulada, sintetizando glicose. A acetil-CoA originada da degradação de ácidos graxos não só causa a supressão da oxidação de piruvato, como também estimula a carboxilação de piruvato a oxaloacetato — a acetil-CoA é o efetuador comum às duas reações (Seção 14.2).

No jejum, as proteínas musculares são hidrolisadas e os aminoácidos são exportados como alanina, produzida por transaminação com piruvato (Seção 17.2.1); a alanina é captada pelo fígado, onde é convertida a glicose (Seção 14.2) e ureia (Seção 17.2.1). A inibição de PD, além de propiciar níveis adequados de piruvato, garante a remoção do nitrogênio dos aminoácidos dos músculos, cuja degradação é estimulada por glicocorticoides durante o jejum prolongado. No exercício intenso, a consequência adicional da estimulação de PDK 4 em músculos é direcionar o piruvato originado da glicólise para a formação de lactato, em vez de ser oxidado; o lactato pode ser utilizado subsequentemente para síntese de glicose no fígado.

Por outro lado, quando há grande disponibilidade de glicose, a ativação do complexo piruvato desidrogenase (PD) permite a síntese de ATP e de ácidos graxos a partir do açúcar. Muita glicose significa muita insulina e muito piruvato, o efetuador alostérico negativo das PDKs. Um dos efeitos da insulina, por intermédio da via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e da proteína quinase B (PKB), é causar a fosforilação de fatores de transcrição e determinar mudanças opostas na expressão das enzimas reguladoras, reprimindo a transcrição das quinases e induzindo a das fosfatases. O resultado é a desfosforilação do complexo e a sua ativação. Novamente, PD tem papel fundamental na “decisão” entre a oxidação de glicose ou de ácidos graxos. A estimulação do complexo quando a glicose é abundante acaba por limitar a oxidação de ácidos graxos, devido à produção

de malonil-CoA, um intermediário da síntese de ácidos graxos, que impede a entrada de ácidos graxos na mitocôndria (Seção 20.7).

No estado diabético, a regulação de PD assemelha-se à do jejum, porque a repressão de PDK 4 e a indução das PDPs estão comprometidas, devido à falta de insulina ou resistência à sua atuação. A interrupção da oxidação de glicose contribuiria para a hiperglicemia característica dessa doença.

20.5 Regulação do ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs reduz coenzimas, mas não as oxida. É uma via que não tem autonomia funcional, necessitando do fornecimento de NAD^+ e FAD pela cadeia de transporte de elétrons para manter-se ativa. Deste modo, a velocidade de oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs está na dependência direta da velocidade da cadeia de transporte de elétrons, que, por sua vez, funciona acoplada à síntese de ATP. As razões NAD^+/NADH e ADP/ATP são especialmente importantes, não só porque o ciclo inclui três reações de oxidação-redução que requerem NAD^+, como pelo fato de NADH, ADP e ATP serem efetuadores alostéricos de enzimas do ciclo.

A regulação do ciclo de Krebs incide sobre a produção de citrato e 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* (Figura 20.10). 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 de acetil-CoA pelo ciclo. Esta limitação é contornada por maior formação de oxaloacetato induzida pela própria acetil-CoA: a *acetil-CoA* é efetuador alostérico positivo da *piruvato carboxilase*, que converte piruvato em oxaloacetato. 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 aminoácidos para síntese de oxaloacetato. O acréscimo na oferta de oxaloacetato permite máxima atividade da citrato sintase.

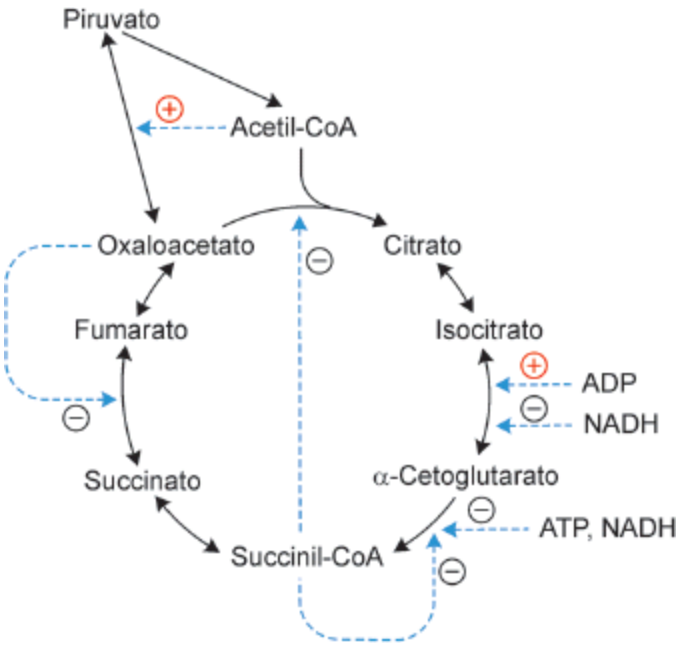


Figura 20.10 Principais regulações alostéricas do ciclo de Krebs. As setas tracejadas azuis indicam regulações alostéricas, positivas (+) e negativas (–).

O destino metabólico do citrato depende da atividade da isocitrato desidrogenase

Uma vez formado, o citrato poderá ser oxidado, por meio de prévia conversão a seu isômero, o isocitrato, por ação da aconitase. Se a oxidação de isocitrato estiver impedida, o equilíbrio da reação da aconitase favorece o acúmulo de citrato, na proporção de 10:1.

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 efetuadores 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 de citrato. Este aumento da velocidade do ciclo leva à produção de coenzimas reduzidas e consequente ativação da fosforilação oxidativa. À medida que a concentração de ADP diminui, decresce também a velocidade da fosforilação oxidativa, havendo elevação do teor de NADH, o inibidor alostérico da isocitrato desidrogenase. O citrato acumulado flui para o citosol, onde inibe a fosfofrutoquinase 1,

ajustando a velocidade da glicólise à do ciclo de Krebs; além disto, é o citrato o precursor da formação de acetil-CoA citosólica, 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 *complexoα-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*.

Não há regulações por modificação covalente descritas para o ciclo de Krebs. Nem mesmo a α-cetoglutarato desidrogenase, diferentemente da piruvato desidrogenase, tem sua atividade regulada por fosforilação/desfosforilação.

20.6 Regulação da cadeia de transporte de elétrons e da síntese de ATP — Controle respiratório

O transporte de elétrons e a síntese de ATP mitocondriais são processos fortemente acoplados. Realmente, se a síntese de ATP é absolutamente dependente do fluxo de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons ("cadeia respiratória"), a recíproca também é verdadeira: a transferência de elétrons só ocorre enquanto houver síntese de ATP. O acoplamento é resultado do *controle respiratório*, exercido pela disponibilidade de ADP (Seção 11.4). O ADP é o fator limitante porque a maior produção de ATP acarreta, forçosamente, diminuição da concentração de ADP. A síntese de ATP processa-se em velocidade paralela à sua utilização, sendo impedida sempre que o nível de ATP é compatível com a demanda. Vale lembrar que o conteúdo celular total de ATP é muito pequeno e sua utilização, ininterrupta e de intensidade muito variável. Um indivíduo adulto requer diariamente cerca de 2.000 vezes mais ATP do que seu organismo dispõe. Este dado enfatiza a obrigatoriedade da síntese contínua de ATP e o seu alto índice de renovação. Também explica o tempo diminuto em que uma célula aeróbia pode viver na ausência de oxigênio.

O controle respiratório tem um claro sentido de economia celular, como pode ser evidenciado pelas consequências de um eventual aumento da razão

ATP/ADP. Por falta de ADP, a fosforilação oxidativa torna-se inoperante e a cadeia de transporte de elétrons também, devido ao acoplamento dos dois processos. Segue-se o acréscimo na concentração de NADH e $FADH_2$, que não podem mais ser oxidados pela cadeia de transporte de elétrons. As vias metabólicas degradativas que necessitam de NAD^+e FAD, como o ciclo de Krebs, a oxidação de ácidos graxos etc., não podem prosseguir, ainda mais porque ATP e NADH passam a exercer seus efeitos de efetuadores alostéricos negativos em enzimas destas vias. Generalizando, a velocidade de produção de coenzimas reduzidas é função da velocidade de sua oxidação pela cadeia de transporte de elétrons, que depende da velocidade de síntese de ATP. O controle respiratório estabelece o ajuste perfeito da oxidação de substratos à necessidade celular de ATP, ou seja, a regulação do metabolismo energético.

Diversas evidências experimentais sugerem que a concentração de ADP não é o único fator determinante do controle respiratório em mitocôndrias de eucariotos. Postula-se a ocorrência de um *segundo mecanismo de controle respiratório*, assim denominado em contraposição ao primeiro mecanismo descrito, exercido pela disponibilidade de ADP. O segundo mecanismo do controle respiratório baseia-se na inibição alostérica da citocromo *c* oxidase (Complexo IV) por ATP. A inibição depende de intervenção hormonal: é abolida por ligação, à enzima, de *hormônios tireoidianos*, os principais reguladores da taxa metabólica basal em mamíferos, e acionada por fosforilação da enzima pela proteína quinase dependente de cAMP (PKA).

O primeiro mecanismo de controle respiratório opera em situações de valores elevados de potencial de membrana, quando as bombas de H^+ (Complexos I, III e IV) são inibidas e a ATP sintase, ativada (sua atividade aumenta com o potencial elétrico). A enzima, estimulada também por ADP, transloca prótons para dentro da mitocôndria, determinando a redução do gradiente eletroquímico e a ativação das bombas de H^+; o transporte de elétrons é, então, acelerado. O segundo mecanismo de controle respiratório atua quando o potencial de membrana é baixo e a razão ATP/ADP mitocondrial é alta. Sua função seria manter a força próton-motriz em valores relativamente baixos, o que é essencial para o desempenho adequado de atividades mitocondriais tais como: 1) a membrana interna da

mitocôndria é impermeável a H^+ apenas em condições de baixos potenciais de membrana, sendo que em valores altos, ocorre vazamento de prótons, resultando em desacoplamento da fosforilação oxidativa; 2) a formação de radicais livres aumenta com o gradiente eletroquímico. A supressão do segundo mecanismo por hormônios tireoidianos eleva o potencial de membrana, causando o desacoplamento parcial da fosforilação oxidativa e o aumento da taxa metabólica basal. A fosforilação, possibilitando a inibição alostérica da citocromo *c* oxidase por ATP, tem efeito oposto: otimiza a fosforilação oxidativa, por manter baixo o gradiente eletroquímico.

Além dos mecanismos de controle da *velocidade* da síntese de ATP e do transporte de elétrons, deve-se analisar a *eficiência* da fosforilação oxidativa e o grau de *termogênese* a ela subordinado. Esta regulação é particularmente importante em animais endotérmicos, que consomem uma parte considerável da energia produzida para a manutenção da temperatura corpórea. A eficiência da fosforilação oxidativa é definida pela razão P/O, entre fosfato (P_i) incorporado em ATP e oxigênio consumido (Seção 11.3.1). O desacoplamento da fosforilação oxidativa diminui a sua eficiência (reduz a razão P/O), levando à dissipação da força próton-motriz e ao aumento da termogênese. A atuação das proteínas desacopladoras (UCPs) (Seção 11.5) regula a fosforilação oxidativa, por impedir a elevação do potencial de membrana e a consequente inibição da citocromo *c* oxidase (e da cadeia de transporte de elétrons) quando aumenta a quantidade de ATP sintetizado.

Outra causa de desacoplamento da fosforilação oxidativa, já mencionada, é o vazamento inespecífico de prótons através da membrana interna da mitocôndria, verificado quando o gradiente eletroquímico é alto. Finalmente, o funcionamento inadequado dos componentes intrínsecos da fosforilação oxidativa também resulta em desacoplamento. Na presença de força próton-motriz elevada, as bombas de H^+ são menos eficazes, translocando menos prótons por elétron transferido, quer dizer, diminui a estequiometria H^+/e^-, resultando em uma menor relação P/O. Este fenômeno está mais bem comprovado no Complexo IV; acarreta os mesmo resultados que os demais processos desacopladores: promove a termogênese e reduz a produção de radicais livres.

O desacoplamento de mitocôndrias era considerado, originalmente, um artefato do método de isolamento das organelas. Na verdade, o gradiente eletroquímico não é totalmente utilizado para a síntese de ATP e o desacoplamento deve ser considerado inerente à fosforilação oxidativa.

A regulação da fosforilação oxidativa, como se pode observar, está longe de ser compreendida de modo completo.

20.7 Regulação do metabolismo de triacilgliceróis e ácidos graxos

A utilização ou a recomposição do depósito de triacilgliceróis do tecido adiposo — a maior reserva energética dos mamíferos — ocorrem em condições de carência ou abundância de nutrientes, respectivamente, que desencadeiam processos reguladores diferentes. Variações das necessidades energéticas, que acontecem entre o esforço físico vigoroso e o estado de repouso, também determinam alteração no sentido do metabolismo dos triacilgliceróis. Os principais hormônios que coordenam essas regulações são glucagon, adrenalina e insulina.

A degradação de triacilgliceróis é desencadeada por glucagon e adrenalina e inibida por insulina

Os triacilgliceróis dos adipócitos de mamíferos localizam-se no interior de uma única grande gota citoplasmática, envolvida por proteínas, a mais abundante sendo a perilipina 1.

A hidrólise do triacilglicerol em três ácidos graxos e glicerol (Seção 16.1) ocorre em etapas sequenciais, catalisadas pela lipase de triacilgliceróis do adiposo (ATGL), a lipase hormônio-sensível (HSL) e a monoacilglicerol lipase (MAGL) (Figura 20.11). A mobilização da reserva de triacilgliceróis requer que as lipases possam acessar os seus substratos, encobertos pelas perilipinas. Estas proteínas coordenam a mobilização ou a reconstituição da reserva de lipídios, expondo ou encobrindo o núcleo de triacilgliceróis à ação das lipases.

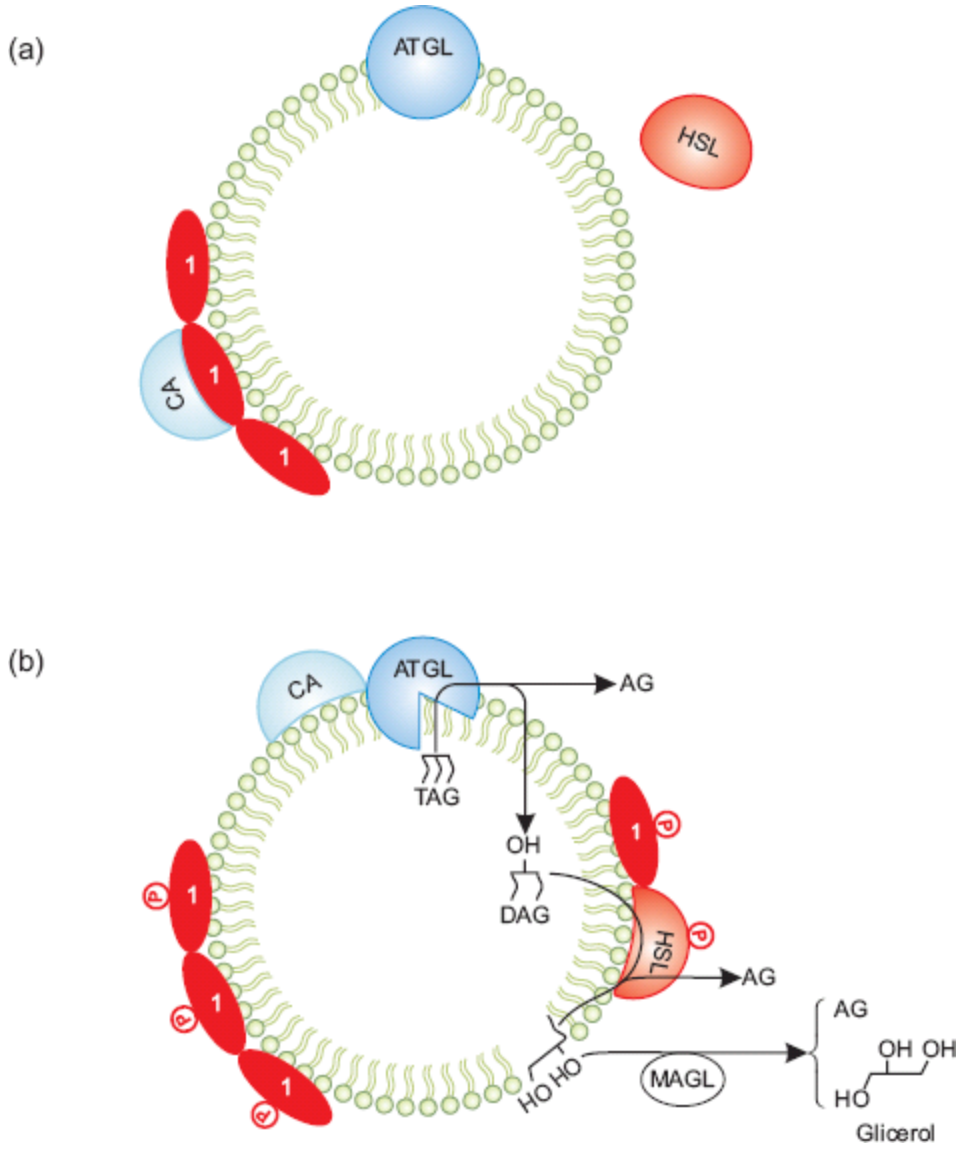


Figura 20.11 Lipólise na gota de lipídios dos adipócitos. a) Situação basal: a proteína coativadora (CA) da lipase de triacilgliceróis do adiposo (ATGL) encontra-se ligada à perilipina 1 (1) e a lipase hormônio-sensível (HSL) encontra-se dispersa no citosol. b) Estimulação por adrenalina: a PKA fosforila a perilipina 1, a proteína coativadora fica livre e associa-se com a ATGL, que catalisa a hidrólise dos triacilgliceróis (TAG) em ácido graxo (AG) e diacilglicerol (DAG). HSL, fosforilada pela PKA, é deslocada para a superfície da gota de lipídios, onde interage com a perilipina 1 fosforilada e hidrolisa diacilglicerol em ácido graxo e monoacilglicerol (MAG). Este é hidrolisado em ácido graxo e glicerol pela monoacilglicerol lipase (MAGL) que é solúvel no citosol.

A lipólise sofre controle hormonal por glucagon e adrenalina, antagônico ao da insulina; os hormônios determinam a modificação estrutural da gota de lipídios e da atividade das lipases, por mecanismos não totalmente compreendidos.

Em condições de hipoglicemia, há liberação de glucagon e, na atividade física, de adrenalina. A interação destes hormônios com seus receptores nos adipócitos aciona a via de transdução de sinal da proteína quinase dependente de cAMP (PKA). A lipase de triacilgliceróis do adiposo (ATGL) torna-se ativa somente quando complexada com um coativador proteico (CA). A perilipina 1, na forma desfosforilada, bloqueia a ligação do coativador à enzima, que fica inoperante; a fosforilação da perilipina 1 pela PKA causa a liberação do coativador que se associa com a ATGL, que passa a hidrolisar os triacilgliceróis. A lipase hormônio-sensível (HSL), dispersa no citosol, é também fosforilada e desloca-se para a superfície da gota de lipídios, onde se liga à perilipina 1 fosforilada e hidrolisa os diacilgliceróis produzidos por ação da ATGL. A monoacilglicerol lipase (MAGL) é ativa constitutivamente e completa a lipólise. Em resumo, as perilipinas, na forma desfosforilada, impedem que as lipases interajam com os triacilgliceróis; quando fosforiladas pela PKA, permitem essa interação e os triacilgliceróis são hidrolisados. Os ácidos graxos produzidos são liberados na corrente sanguínea, podendo suprir a demanda energética de músculos esqueléticos e cardíaco, e fígado. O aumento do nível de ácidos graxos no plasma promove a sua tomada por esses tecidos, aumentando 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 determina a sua oxidação; no jejum, o transporte e a oxidação de ácidos graxos estão estimulados.

A insulina, liberada quando a glicemia é alta, sinalizando abundância de nutrientes, promove a desfosforilação das lipases e das perilipinas: as enzimas são inibidas e as perilipinas interpõem-se entre as lipases e os triacilgliceróis, resultando o armazenamento desses compostos. As respostas à insulina seriam devidas à ativação da fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1), que passa a remover os grupos fosfato das proteínas, e da fosfodiesterase de cAMP, levando à diminuição do nível de cAMP; a insulina também estimula a síntese de lipídios.

A atividade da acetil-CoA carboxilase é crucial para a síntese de ácidos graxos

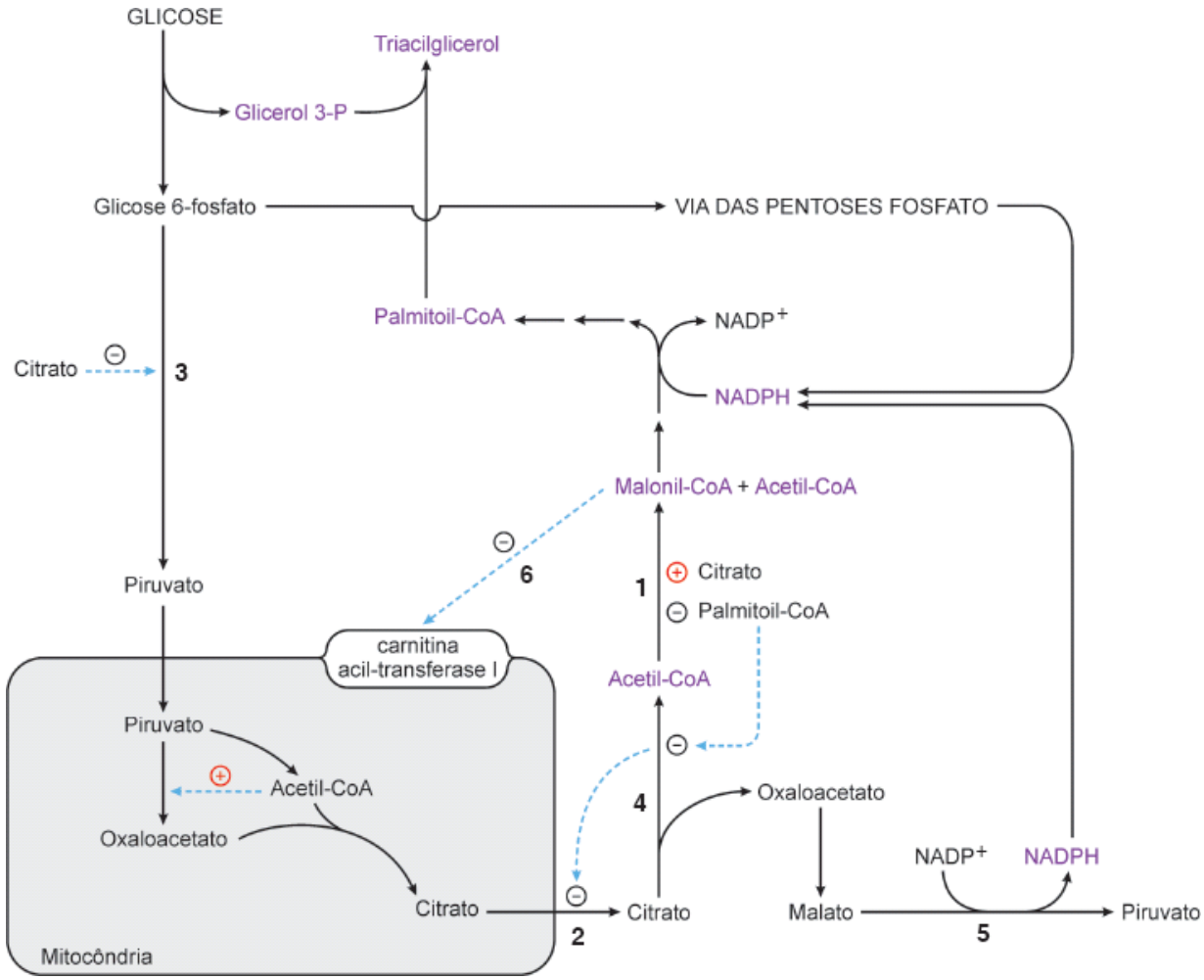


Figura 20.12 Síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis a partir de glicose: visão geral das regulações alostéricas. As setas tracejadas azuis indicam regulações alostéricas, positivas (1) e negativas (–), e hormonais. Os números referem-se às etapas descritas no texto.

A síntese de ácidos graxos e, consequentemente, 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* (etapa 1 na Figura 20.12). A enzima de aves e mamíferos é constituída por dímeros cataliticamente inativos que, ao se associarem, formam a enzima polimérica ativa, um mecanismo pouco comum de regulação da atividade enzimática. A acetil-CoA carboxilase sofre

regulação alostérica, que reflete o nível intracelular de efetuadores, e regulação hormonal, que sinaliza as necessidades globais do organismo.

A polimerização das subunidades processa-se na presença de *citrato*. Os níveis citoplasmáticos de citrato elevam-se quando não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs, em virtude da inibição da *isocitrato desidrogenase* e da α-*cetoglutarato desidrogenase*. É o que acontece quando a razão 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 efetuador alostérico negativo das duas enzimas. O citrato então acumulado é transportado pela *tricarboxilato translocase* (etapa 2 na Figura 20.12) da mitocôndria para o citosol, onde inibe a *fosfofrutoquinase* 1 (etapa 3), estimula a acetil-CoA carboxilase e origina acetil-CoA citosólica por ação da *citrato liase* (etapa 4).

O acúmulo de citrato sinaliza a disponibilidade de energia e de precursores para a síntese de ácidos graxos, obtidos, nos seres humanos, a partir de carboidratos da dieta, principalmente.

O produto da via de síntese, *palmitoil-CoA*, tem efeito oposto ao citrato, despolimerizando e inativando a enzina; exerce um controle amplo sobre a síntese de ácidos graxos, por atuar como efetuador alostérico negativo da acetil-CoA carboxilase e da citrato liase e inibir a tricarboxilato translocase.

NADPH, o agente da síntese de ácidos graxos, é fornecido pela via das pentoses e pela reação da enzima málica (etapa 5).

A acetil-CoA carboxilase é regulada por modificação covalente: sua fosforilação é acompanhada por dissociação nos protômeros inativos. Ela é fosforilada, e inibida, pela PKA e pela AMPK, as proteína quinases acionadas no jejum e no exercício. A insulina tem efeito oposto, determinando a desfosforilação e a estimulação da enzima. A regulação da citrato liase é homóloga à da glicogênio sintase: é fosforilada e inativada pela glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), que é bloqueada na presença de insulina. De todos estes modos, a insulina promove a síntese de ácidos graxos.

Nos vegetais e procariotos, a acetil-CoA carboxilase não exibe as regulações descritas para os mamíferos. A enzima de vegetais, localizada nos cloroplastos, é ativada por aumento do pH e da concentração de Mg^{2+}do estroma, obtidos sob 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 é estimulada quando ocorre divisão celular.

Durante a síntese de ácidos graxos, a sua degradação é impedida

A via da β-oxidação não é submetida a regulação alostérica ou modificação covalente. Seu funcionamento está subordinado ao suprimento de substrato, coenzima A, NAD^+ e FAD, sendo que o fornecimento das coenzimas oxidadas depende da cadeia de transporte de elétrons.

A disponibilidade de substrato para a β-oxidação é função da atividade do sistema de transporte de grupos acila para o interior da mitocôndria, o compartimento celular onde ocorre a sua degradação. Quando a acetil-CoA carboxilase está ativada — em situações de abundância de carboidratos e de níveis altos de insulina — aumenta a concentração de malonil-CoA, que, além de ser substrato da síntese de ácidos graxos, exerce um papel regulador na degradação destes compostos. Malonil-CoA inibe a *carnitina acil transferase I* (etapa 6 na Figura 20.12), a enzima responsável pela introdução de radicais acila na mitocôndria. Esta inibição previne a entrada e a oxidação na mitocôndria dos ácidos graxos recém-sintetizados, pois, enquanto ocorre a síntese, os níveis citoplasmáticos de malonil-CoA permanecem elevados. No jejum, invertem-se os resultados das regulações.

Outras ações da insulina estimulam a síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis

A insulina, liberada no período absortivo, atua na síntese de lipídios desde a entrada de glicose nas células até a transcrição de genes que codificam enzimas da via.

O estímulo do transporte de glicose para as células aumenta não só a oferta de precursores para a síntese de ácidos graxos, como também a de glicerol 3-fosfato, permitindo a esterificação dos ácidos graxos sintetizados. O tecido adiposo, responsável pelo armazenamento de triacilgliceróis, obtém glicerol 3-fosfato principalmente por redução de di-hidroxiacetona fosfato, proveniente da glicose percorrendo a via glicolítica, igualmente estimulada por insulina. Só dispondo de glicose, o adipócito pode sintetizar e armazenar triacilgliceróis. Com efeito, os carboidratos da dieta são a principal fonte de carbonos para a formação do depósito de triacilgliceróis

nos seres humanos. No fígado, o glicerol 3-fosfato pode ser formado por redução de di-hidroxiacetona fosfato ou por fosforilação de glicerol pela glicerol quinase, enzima muito ativa neste órgão.

Além da acetil-CoA carboxilase, outras enzimas são estimuladas por insulina, levando a um aumento na síntese de lipídios: *complexo piruvato desidrogenase* (Seção 20.4) e *glicerol 3-fosfato acil transferase* (Seção 16.7).

A insulina induz a transcrição dos genes de diversas enzimas do metabolismo de triacilgliceróis, como a acetil-CoA carboxilase e a sintase de ácidos graxos. No jejum ou diabetes, estas ações são revertidas por glucagon.

No jejum, o glucagon determina a degradação de triacilgliceróis e ácidos graxos

A regulação da lipólise nos 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 impossibilidade de produzir acetil-CoA a partir de glicose, devido à falta do açúcar e à inibição da glicólise e do complexo piruvato desidrogenase — é bloqueada pela inativação da acetil-CoA carboxilase. Como consequência, há 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 a matriz mitocondrial, onde podem ser oxidados.

Assim, no jejum, o ciclo da β-oxidação funciona ativamente, alimentado pelos ácidos graxos liberados do tecido adiposo. Adicionalmente, como a glicólise e o ciclo de Krebs estão desativados, por falta de substrato e por todos os mecanismos inibitórios então desencadeados, as coenzimas oxidadas pela cadeia de transporte de elétrons destinam-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 sequestrado pela gliconeogênese estimulada por glucagon — a obtenção de ATP pelo fígado

depende da oxidação, na fosforilação oxidativa, das coenzimas reduzidas na conversão de ácidos graxos a acetil-CoA pelo ciclo de Lynen. Deste modo, o glucagon, além de promover a manutenção da glicemia, provê o aporte de ácidos graxos e corpos cetônicos para satisfazer as necessidades energéticas dos tecidos que podem oxidá-los.

As sínteses 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.

No estado diabético, o bloqueio da produção de ácidos graxos e o aumento de sua degradação estabelecem níveis plasmáticos aumentados destes compostos, que poderiam induzir resistência à insulina.

O controle global do metabolismo de lipídios depende da razão insulina/glucagon e está tratado no Capítulo 21.

20.8 Regulação do metabolismo do colesterol

O colesterol é fundamental para os animais vertebrados. É um componente estrutural de membranas, e seus metabólitos, como sais biliares, hormônios esteroides e oxiesteroides desempenham funções biológicas importantes. A regulação da homeostase do colesterol celular e do organismo todo é essencial porque um excesso ou uma diminuição de colesterol podem ser danosos.

As lipoproteínas plasmáticas encarregam-se da distribuição de colesterol aos tecidos e 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 da síntese endógena, sobretudo no fígado e intestino delgado, ou dos alimentos.

Os lipídios da dieta ganham a circulação sanguínea sob a forma de quilomícrons, sintetizados no intestino delgado (Figura 20.13). Nos tecidos extra-hepáticos, os triacilgliceróis componentes dos quilomícrons são hidrolisados pela lipase lipoproteica (Seção 16.1), fornecendo ácidos graxos e glicerol. Os remanescentes dos quilomícrons, então enriquecidos em

colesterol, são retirados da circulação pelo fígado. Os quilomícrons são, então, responsáveis pela distribuição de triacilgliceróis aos tecidos extra-hepáticos e de colesterol ao fígado.

No período 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*[3], que são 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 é captada pelo 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. 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 (Seção 7.4.2).

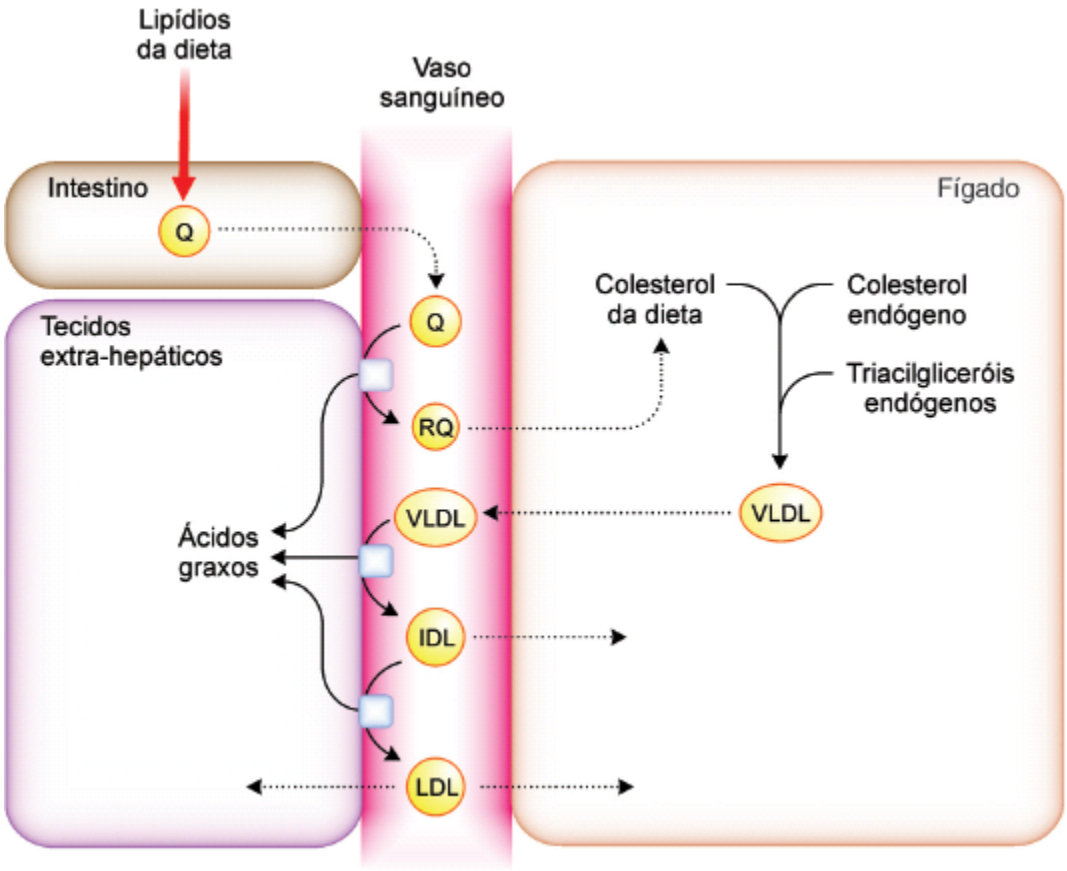


Figura 20.13 Transporte de lipídios aos tecidos pelas lipoproteínas plasmáticas. Os retângulos azuis voltados para o lúmen do vaso sanguíneo representam a lipase lipoproteica. Q: quilomícron; RQ: remanescente de quilomícron.

As *HDL* atuam no sentido oposto ao das LDL, removendo colesterol dos tecidos extra-hepáticos (Figura 20.14). São sintetizadas no fígado e, em menor extensão, no intestino delgado, 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 e o excesso de colesterol intracelular é transferido para a membrana plasmática e, em seguida, para o interior das HDL, como ésteres de colesterol. As HDL enriquecidas em colesterol, as *HDL maduras*, podem ser diretamente absorvidas pelo fígado, onde o colesterol pode ser transformado em sais biliares, que são excretados; adicionalmente, podem transferir o colesterol para outras lipoproteínas plasmáticas, VLDL e LDL principalmente, que também são absorvidas pelo fígado. Diz-se que as HDL efetuam o

transporte reverso de colesterol, dos tecidos para o fígado, o único órgão capaz de eliminar colesterol. Como o organismo humano não sintetiza enzimas que degradem o núcleo esteroide, a conversão em sais biliares é a principal via de excreção de colesterol.

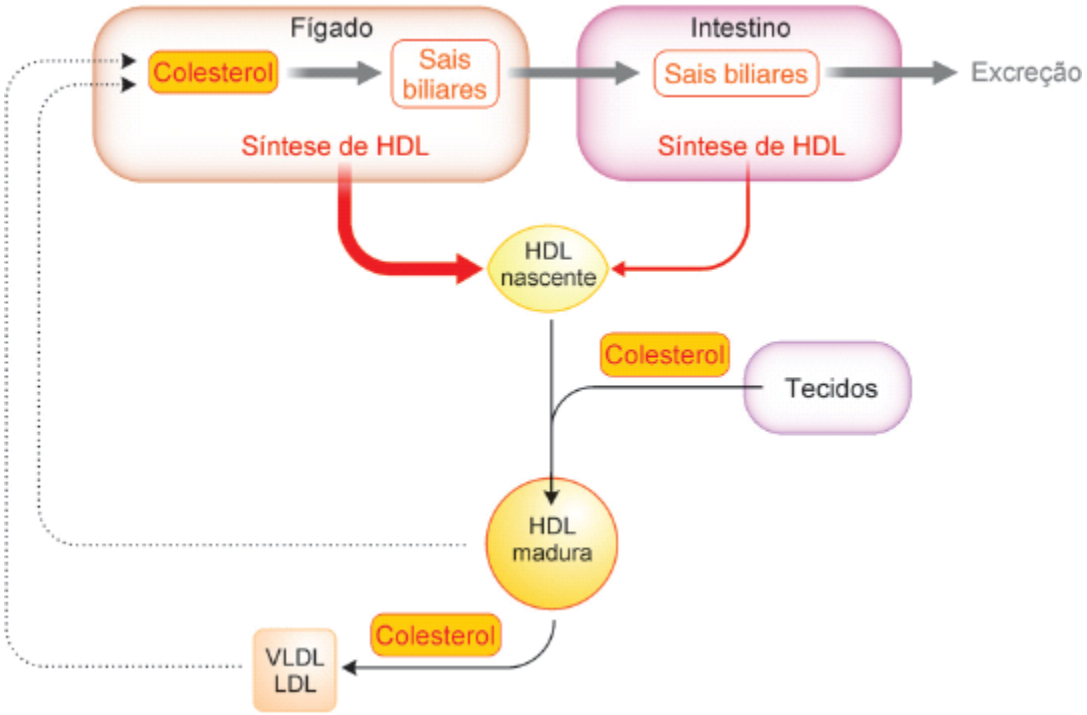


Figura 20.14 Esquema simplificado da remoção de colesterol dos tecidos por HDL. As HDL são sintetizadas pelo fígado e intestino delgado como partículas discoides, as HDL nascentes. O excesso de colesterol dos tecidos é transferido, sob a forma de ésteres de colesterol, para as HDL nascentes, que se convertem em partículas esféricas, as HDL maduras. Estas podem transferir colesterol para outras lipoproteínas (VLDL e LDL) ou serem incorporadas pelo fígado, onde o colesterol excedente pode ser convertido em sais biliares e excretado. As outras partículas contendo alto teor de colesterol, VLDL e LDL, também são transferidas para o fígado, para excreção do colesterol.

A concentração de colesterol regula a sua síntese

O teor de colesterol no plasma de um indivíduo sadio oscila dentro de um intervalo estreito. Esta homeostase é mantida, fundamentalmente,

graças à modulação da síntese hepática exercida pelo conteúdo de colesterol intracelular e por ação hormonal. A enzima mais importante na regulação da via de síntese de colesterol é a *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase* (*HMG-CoA redutase*). Concentrações elevadas de colesterol inibem a atividade da enzima e também a transcrição do gene que a codifica. A enzima é ainda regulada por modificação covalente: sua fosforilação e inativação é promovida por glucagon; a insulina determina sua desfosforilação e ativação. Mecanismos acionados em condições de alto conteúdo de colesterol alteram a expressão de outros genes:

1. Repressão do gene do *receptor de LDL*. As LDL penetram nas células por endocitose, iniciada pela ligação da lipoproteína a 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.
2. Indução de genes envolvidos no *transporte reverso de colesterol*, o transporte do excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado na forma de HDL, cujo nível aumenta.
3. Indução de genes relacionados com a *excreção de colesterol*, por exemplo, genes de enzimas reguladoras da via de síntese de sais biliares, propiciando a conversão de colesterol em sais biliares, equivalente à sua excreção.

Assim, quando a concentração de colesterol se eleva, a síntese e a tomada pelas células são suprimidas e a remoção e a excreção deste composto, estimuladas. Estes efeitos são devidos aos *oxiesteroides*, esteroides derivados do colesterol por incorporação de oxigênio na cadeia lateral. Os sensores dos níveis elevados de oxiesteroides, que refletem aqueles de colesterol, são os receptores nucleares LXRs (de ***L**iver **X** **R**eceptors*). A interação com os oxiesteroides leva à ativação destes receptores, que ativam ou reprimem a expressão gênica por ligarem-se a regiões reguladoras dos genes-alvo e atuarem em conjunto com coativadores ou corepressores.

A inibição da síntese de receptores de LDL, ocasionando uma menor incorporação celular de LDL-colesterol, tem como consequência o aumento da sua concentração no sangue (*hipercolesterolemia*). 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 por concentrações muito elevadas de colesterol plasmático.

A aterosclerose correlaciona-se com níveis aumentados de colesterol plasmático

A hipercolesterolemia promove o desenvolvimento de *aterosclerose*. Esta doença é devida a distúrbios no metabolismo de lipídios e à instalação de um processo inflamatório crônico na parede das artérias. Caracteriza-se pela deposição de lipídios — especialmente colesterol e ésteres de colesterol — na camada interna da parede de artérias, formando placas, denominadas *ateromas*[4]. 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 (isquemia) e a sua morte, devido à interrupção do aporte de oxigênio e de nutrientes e, consequentemente, da produção de energia. Isto é o que acontece no infarto do miocárdio. A aterosclerose é o tipo mais frequente de *arteriosclerose* (esclerose de artérias). A arteriosclerose é a principal causa de doenças cardiovasculares — coronariopatias, acidentes vasculares cerebrais (derrames), embolia pulmonar, trombose de artérias das extremidades (resultando em gangrena) etc. —, que constituem a principal causa de morte nos países desenvolvidos.

A ocorrência de aterosclerose não depende diretamente do teor total de colesterol plasmático, mas sim, da concentração da fração de LDL-colesterol. Por outro lado, há uma correlação negativa com o nível de HDL-colesterol, que tem um efeito protetor contra a aterosclerose. Estas constatações são coerentes com as funções exercidas pelos dois tipos de lipoproteínas plasmáticas: as LDL *fornecem* colesterol aos tecidos e as HDL *removem* 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. As HDL, além de efetuarem o transporte reverso de colesterol, exercem uma potente ação anti-inflamatória, importante nas disfunções metabólicas associadas a processos inflamatórios, como o diabetes. Doenças caracterizadas por níveis elevados e crônicos de LDL, como o diabetes, costumam estar associadas a aterosclerose. Mas, o exemplo mais dramático é a hipercolesterolemia familiar: os homozigotos apresentam concentração plasmática de LDL cerca de cinco vezes maior que o normal e a maioria morre de infarto 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, consequentemente, pela possibilidade de desenvolver aterosclerose. Afora os portadores de defeitos genéticos relativamente raros, como a hipercolesterolemia familiar, uma parcela significativa da população dos países industrializados 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 quantidade e o tipo de lipídios da dieta têm influência fundamental sobre a concentração do colesterol sanguíneo e a sua distribuição nas lipoproteínas plasmáticas. 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. As gorduras saturadas e as gorduras *trans* têm efeito hipercolesterolêmico e a sua substituição por gorduras contendo ácidos graxos mono ou poli-insaturados é extremamente benéfica na redução do colesterol do organismo. Os efeitos dos ácidos graxos sobre a colesterolemia e as suas fontes dietéticas encontram-se na Seção 18.2.4. As bases moleculares da atuação dos diferentes tipos de ácidos graxos ainda não são inteiramente compreendidas, mas é sabido que a intervenção dietética mais importante para estabelecer níveis recomendados de

colesterol plasmático é reduzir o teor de ácidos graxos saturados e ácidos graxos *trans* da dieta.

Quando alterações na dieta não são suficientes para a normalização do colesterol plasmático, utilizam-se terapias medicamentosas, que visam (1) reduzir a síntese endógena de colesterol, (2) aumentar a sua excreção como sais biliares ou (3) diminuir a sua absorção. No primeiro caso, empregam-se inibidores competitivos da HMG-CoA redutase, como as *estatinas*, que são metabólitos de fungos; no segundo caso, resinas positivamente carregadas (*colestiramina*, por exemplo), que, por ligarem-se aos sais biliares (negativamente carregados), impedem a sua reabsorção intestinal, intensificando a conversão de colesterol em sais biliares, ou seja, a sua excreção; no terceiro caso, inibidores da absorção de colesterol do lúmen do intestino delgado, como o *ezetimibe*. Tais terapias visam reduzir a concentração de colesterol, para estimular a síntese de receptores de LDL e, consequentemente, a maior tomada destas partículas pelo fígado, principalmente. Nos casos da utilização de fármacos inibidores da absorção de sais biliares ou de colesterol, os resultados obtidos são limitados, porque a diminuição do nível de colesterol estimula a sua síntese; somente a adoção conjunta destes fármacos com inibidores da síntese de colesterol propicia redução significativa da colesterolemia.

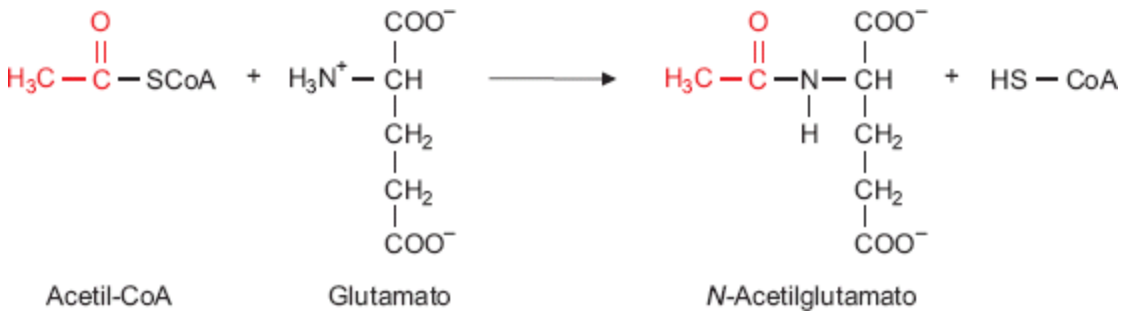
A qualidade de vida do indivíduo é, ainda, decisiva na prevenção da aterosclerose, que tem sido frequentemente associada ao estresse emocional, sedentarismo, obesidade etc.

20.9 Regulação do ciclo da ureia

A quantidade de ureia excretada por um indivíduo hígido aumenta significativamente em uma situação pouco usual, que é a ingestão de dieta com alto teor de proteína. A degradação dos aminoácidos excedentes origina os respectivos α-cetoácidos, que são convertidos em triacilgliceróis, e os grupos amino, que são eliminados como ureia. Nesta condição, há indução da síntese das enzimas do ciclo da ureia e da carbamoil-fosfato sintetase I, que podem ter suas concentrações elevadas de 10 a 20 vezes.

A síntese de ureia é submetida a regulação alostérica: a carbamoil-fosfato sintetase I é estimulada por *N-acetilglutamato*, um composto

produzido a partir de acetil-CoA e glutamato:



A reação é catalisada pela *N-acetilglutamato sintase*, que é ativada por *arginina*. Se a produção de ureia não ocorrer em velocidade adequada para eliminar a amônia gerada no catabolismo de aminoácidos, acumulam-se intermediários do ciclo da ureia, dentre os quais, arginina. Graças à sua atuação como efetuador alostérico, este aminoácido provoca um aumento da concentração de N-acetilglutamato, que, por sua vez, estimula a carbamoil-fosfato sintetase I. Deste modo, a arginina permite adequar a velocidade de formação de amônia à sua conversão em ureia.

Bibliografia

Chaves VE *et al.*: Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie* **93** (10): 1631-1640, 2011.

Czech MP *et* al: Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* **56** (5): 949-964, 2013.

Grininger M: Perspectives on the evolution, assembly and conformational dynamics of fatty acid synthase type I (FAS I) systems. *Curr Opin Struct Biol* **25**: 49-56, 2014.

Hong C, Tontonoz P: Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **13** (6): 433-444, 2014.

Jeong JY *et al.*: Transcriptional regulation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Diabetes Metab J* **36** (5): 328-335, 2012.

Krebs EG, Beavo JA: Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* **48**: 923-959, 1979.

Liangyou R: Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* **4** (1): 177-197, 2014.

Marcolongo P *et al.*: Multiple roles of glucose-6-phosphatases in pathophysiology: state of the art and future trends. *Biochim Biophys Acta* **1830** (3): 2608-2618, 2013.

Morris SM Jr: Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr* **22**: 87-105, 2002.

Novellasdemunt L *et al*.: Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *J Biol Chem* **288** (15): 10640-10651, 2013.

Nunes-Nesi A *et al*.: Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Curr Opin Plant Biol* **16** (3): 335-343, 2013.

Ramzan R *et al*.: Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1797** (9): 1672-1678, 2010.

Rovira J *et al*.: Upregulation of heart PFK-2/FBPase-2 isozyme in skeletal muscle after persistent contraction. *Eur J Physiol* **463**: 603-613, 2012.

Schwartz MW *et al*.: Cooperation between brain and islet in glucose homeostasis and diabetes. *Nature* **503**: 59-66, 2013.

Stenvinkel P *et al*.: Hibernating bears (Ursidae) — metabolic magicians of definite interest for the nephrologist. *Kidney Int* **83** (2): 207-212, 2013.

Tong L: Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci* **70** (5): 863-891, 2013.

Wu LE, Sinclair DA: SIRT2 controls the pentose phosphate switch. *EMBO J.* **33** (12): 1287-1288, 2014.

[1]Cerca de 90% dos resíduos de glicose do glicogênio são removidos como *glicose 1-fosfato*, por fosforólise catalisada pela glicogênio fosforilase e 10% como *glicose*, por hidrólise promovida pela enzima desramificadora (Seção 13.1).

[2]A *hexoquinase IV*, a isoenzima predominante em hepatócitos e células β do pâncreas, é inadequadamente chamada de *glicoquinase*, já que não é específica para glicose. Porém, devido ao seu uso consagrado, esta segunda denominação será mantida neste texto.

[3]A nomenclatura e a composição das lipoproteínas plasmáticas estão apresentadas na Tabela 6.3 (Seção 6.2.7).

[4]A 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.

OceanofPDF.com

21 Regulação Integrada do Metabolismo

As respostas do organismo humano a duas situações distintas — abundância e escassez de alimentos —, de alternância diária, ilustram a integração dos processos que compõem a regulação metabólica. A forma principal de regular o metabolismo é modular a ação das enzimas, responsáveis pelas reações que se processam no organismo. Dentre os mecanismos que intervêm na ação enzimática, os mais importantes são: mudança na atividade de enzimas, por regulação alostérica ou modificação covalente, variação da concentração de enzimas por 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 por ação hormonal.

Várias seções deste livro, em especial nos Capítulos 19 e 20, referem-se a enzimas que sofrem mudança de atividade e/ou de concentração em função do excesso ou da carência de nutrientes. Este capítulo trata de reunir, dentre essas enzimas, as mais relevantes, examinando o funcionamento de vias metabólicas centrais em determinados órgãos/tecidos e como eles interagem para propiciar a adaptação do organismo por inteiro frente a essas situações diferentes.

A concentração e a atividade das enzimas variam com a oferta de nutrientes

Quando há ingestão de nutrientes, os próprios nutrientes e a insulina, secretada em resposta ao aumento da glicemia, induzem a produção de enzimas de vias biossintéticas. Com as enzimas da gliconeogênese ocorre

uma exceção: sua síntese é reprimida. Concomitantemente, há repressão da síntese de outras enzimas, como as que aceleram a mobilização dos depósitos de energia. Nos intervalos entre as refeições, a situação inverte-se: devido à queda do nível de insulina e à liberação de outros hormônios — glucagon, principalmente, e cortisol — a produção das enzimas das vias de síntese é reprimida e há estimulação da formação de enzimas das vias degradativas e também da gliconeogênese, capacitando o fígado a fornecer glicose, indispensável a diversas células.

Em resumo, as flutuações na oferta de nutrientes ao longo do dia correspondem a flutuações dos níveis absolutos de insulina e glucagon e, ainda mais importante, da *razão insulina/glucagon*, tendo em vista que a concentração de insulina varia muito mais do que a de glucagon (Figura 21.1). Um dos resultados é a alternância de indução ou repressão da transcrição de genes estruturais de enzimas, que terão, então, suas concentrações modificadas. Particularmente notável é a repercussão da razão insulina/glucagon na concentração de enzimas hepáticas (Tabela 21.1).

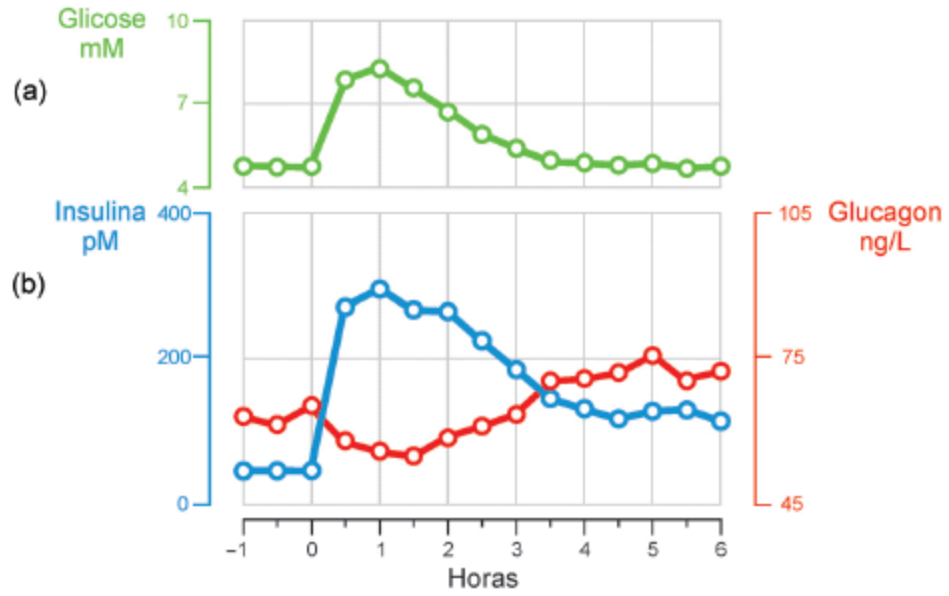


Figura 21.1 Concentrações plasmáticas de glicose (a) e de hormônios (b) após a ingestão de uma refeição (tempo zero), subsequente a 14 h de jejum. A partir da tomada da refeição, a glicose sanguínea passou de 4 mM para um máximo de 8 mM em 1 hora, retornando a níveis próximos dos basais

em 4 h. A insulina seguiu um padrão semelhante. O glucagon diminuiu para um mínimo em 1,5 h e aumentou gradualmente até atingir, no final do experimento, valores 50% maiores do que os basais. Baseada em Woerle HJ *et al.*: Pathways for glucose disposal after meal ingestion in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284** (4): E716-E725, 2003.

Tabela 21.1 Enzimas hepáticas cujas concentrações são alteradas com a disponibilidade de nutrientes e com a razão insulina/glucagon.

Período absortivo (insulina/glucagon alta)		Jejum (insulina/glucagon baixa)	
Enzimas induzidas	**Enzimas reprimidas**	**Enzimas induzidas**	**Enzimas reprimidas**
Glicoquinase	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Glicoquinase
Fosfofrutoquinase 1	Frutose 1,6-bisfosfatase	Frutose 1,6-bisfosfatase	Fosfofrutoquinase 1
Piruvato quinase	Glicose 6-fosfatase	Glicose 6-fosfatase	Piruvato quinase
Glicose 6-fosfato desidrogenase	Piruvato desidrogenase quinase	Piruvato desidrogenase quinase	
6-Fosfogliconato desidrogenase	Piruvato carboxilase	Piruvato carboxilase	
Citrato liase		Glutaminase	
Enzima málica		Transaminases	
Acetil-CoA carboxilase		Enzimas do ciclo da ureia	
Sintase de ácidos graxos		Carnitina-acil-CoA transferase I	
Δ9 dessaturase		HMG-CoA sintase	

Outro resultado, mais imediato, são as oscilações na atividade de enzimas, por regulação alostérica ou modificação covalente, que também dependem do estado nutricional e, consequentemente, da razão insulina/glucagon. O grau de fosforilação das enzimas, a modificação

covalente mais importante, é a resultante das ações opostas de proteína quinases e de proteína fosfatases.

A integração metabólica será analisada nos períodos subsequentes à ingestão de uma refeição: período absortivo (ou pós-prandial), pós-absortivo e jejum.

21.1 Período absortivo

No período absortivo prevalecem os efeitos da insulina

O *período absortivo* ou *pós-prandial*, que compreende cerca de 4 horas após a tomada de refeições, caracteriza-se, naturalmente, pela ocorrência de processos biossintéticos que incluem a recomposição das reservas energéticas (Tabela 21.2), diminuídas pelo jejum precedente.

Após uma refeição, os nutrientes absorvidos no intestino são conduzidos diretamente ao fígado. Este órgão retém uma fração considerável da glicose recebida e o seu conteúdo de glicogênio é elevado de 70 g (5% do seu peso) para 120 g, em média. O excedente de glicose é mantido em circulação, provocando aumento da glicemia, a que o pâncreas responde aumentando a liberação de insulina e diminuindo a de glucagon (Figura 21.1 e Tabela 21.3).

Tabela 21.2 Reservas energéticas de um homem adulto.

Órgão/tecido	Composto armazenado	Massa (kg)	Energia disponível	
			kcal	kJ
Fígado	Glicogênio	0,120	480	2.008
Músculos esqueléticos[1]	Glicogênio	0,300	1.200	5.020
Adiposo	Triacilgliceróis	15	135.000	564.840

[1]Os músculos esqueléticos são constituídos por 6 kg de proteínas que, embora não constituam material de reserva (não existe reserva de proteína nos animais), em jejum extremo, 50% do seu total chegam a ser consumidos.

Tabela 21.3 Níveis plasmáticos de substratos (mM) e hormônios.

	Período pós-absortivo	Período absortivo	Jejum		Diabetes tipo 1 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 (μU/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 *elevação da razão insulina/glucagon* determina profundas e amplas alterações metabólicas, decorrentes da supressão das vias de transdução de sinal do glucagon, destacando-se a via da proteína quinase dependente de cAMP ou proteína quinase A (PKA), e da ocorrência das vias de sinalização da insulina, como a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Estas vias de sinalização, descritas nas Seções 19.4.1 e 19.6.3, interferem no grau de fosforilação de enzimas e, portanto, em sua atividade, e também na concentração de enzimas, por mudança na velocidade de sua síntese. Com a diminuição do nível de glucagon, a PKA fica inativa; com o aumento do nível de insulina, a proteína quinase B (PKB) e a fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1) são estimuladas. Segue-se a descrição das consequências destes eventos reguladores em algumas células-alvo destes hormônios, resumidas na Figura 21.2.

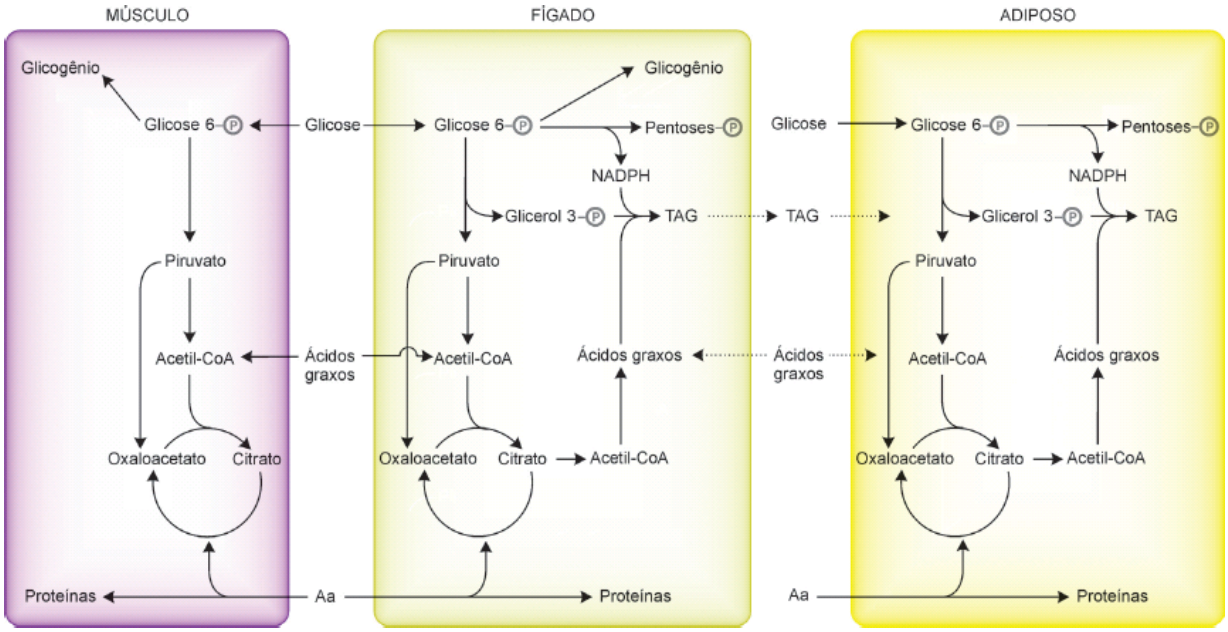


Figura 21.2 Período absortivo: esquema da distribuição dos nutrientes absorvidos e de alguns de seus destinos metabólicos em músculos esqueléticos, fígado e tecido adiposo. O transporte de lipídios pelas lipoproteínas plasmáticas não está mostrado. A alta razão insulina/glucagon determina a predominância dos processos de síntese.

Nos hepatócitos, as proteínas anteriormente fosforiladas pela PKA passam a ser substratos da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1). A isoenzima hepática de PP-1 não sofre regulação por modificação covalente, sendo ativada alostericamente por glicose (Seção 20.1.3), abundante no pós-prandial; a síntese de sua subunidade reguladora GL é induzida por insulina. PP-1, então, remove grupos fosfato da glicogênio fosforilase quinase, da glicogênio fosforilase *a* e da glicogênio sintase, inativando as duas primeiras e ativando a enzima de síntese, também estimulada por glicose 6-fosfato. Outras enzimas, como a glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) e a proteína quinase dependente de AMP (AMPK), que, na ausência de insulina, fosforilam e inativam a glicogênio sintase, com insulina, são fosforiladas e inativadas por PKB, suspendendo o bloqueio antes exercido sobre a síntese de glicogênio. Deste modo, a degradação do glicogênio hepático é impedida e a síntese é estimulada.

A glicose, no fígado, é fosforilada pela glicoquinase, estimulada pela própria glicose, que promove a dissociação do complexo inativo

glicoquinase-proteína reguladora, localizado no núcleo, resultando o deslocamento da enzima para o citoplasma, onde catalisa a fosforilação da glicose. Adicionalmente, a síntese de glicoquinase é induzida por insulina. A glicose 6-fosfato, além de ser metabolizada pela glicólise, origina glicose 1-fosfato para a síntese de glicogênio. O grande aporte de glicose contribui para a inibição da degradação do glicogênio, pois o açúcar promove a conversão da glicogênio fosforilase *a* na forma *b*, inativa. A síntese de glicogênio processa-se intensamente, uma vez que a glicogênio sintase está na forma desfosforilada, ativa. O fígado encaminha quase metade da glicose que recebe para a formação do polímero, cuja concentração final é, entretanto, limitada. Satisfeita a reserva de glicogênio, o remanescente é dirigido para a síntese de ácidos graxos.

No período pós-prandial, a gliconeogênese é inibida por insulina. Ela age, sobretudo, suprimindo a expressão dos genes de enzimas-chave da gliconeogênese, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase, a frutose 1,6-bisfosfatase e a glicose 6-fosfatase, por ativação da via da PI3K. Adicionalmente, a insulina promove a desfosforilação da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase fazendo prevalecer a atividade de quinase sobre a de fosfatase. Resultam níveis altos de frutose 2,6-bisfosfato, o efetuador alostérico negativo da frutose 1,6-bisfosfatase, concorrendo para a inoperância da gliconeogênese.

A via glicolítica funciona em grande velocidade, pois tem suas enzimas reguladoras, além da glicoquinase, na forma ativa — a fosfofrutoquinase 1 é ativada alostericamente por frutose 2,6-bisfosfato e o produto da reação por ela catalisada, a frutose 1,6-bisfosfato, estimula a piruvato quinase, cuja forma desfosforilada, ativa, predomina. Esta situação prevalece enquanto houver consumo de frutose 6-fosfato pela glicólise. O acúmulo deste intermediário da via leva ao bloqueio da glicoquinase, por ficar retida no núcleo, formando um complexo inativo com a proteína reguladora.

O complexo piruvato desidrogenase encontra-se desfosforilado devido ao aumento do teor de piruvato, originário de glicose, que é o efetuador alostérico negativo das piruvato desidrogenase quinases, PDK 4 principalmente, e por causa da insulina. O hormônio induz a transcrição das piruvato desidrogenase fosfatases e reprime a das quinases. Por consequência, a forma assumida pelo complexo é a ativa.

O aumento de atividade das três enzimas-chave — fosfofrutoquinase 1, piruvato quinase e piruvato desidrogenase — determina grande produção de acetil-CoA a partir de glicose. A piruvato carboxilase é ativada pela acetil-CoA, desviando parte do piruvato para produção de oxaloacetato. Os esqueletos de carbono de vários aminoácidos vêm enriquecer a concentração de intermediários do ciclo de Krebs, 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 $FADH_2$. Dispondo de tantas coenzimas reduzidas, a cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa ficam estimuladas, levando a grande produção de ATP. A alta atividade destes processos mantém-se enquanto a concentração de ADP permitir. 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 consequente elevação do nível de NADH.

A concentração intramitocondrial aumentada de NADH exerce efeito inibitório sobre o ciclo de Krebs, especialmente por efeito alostérico sobre a isocitrato desidrogenase e o complexo α-cetoglutarato desidrogenase. O resultado destas inibições é o *acúmulo de citrato,* que continua a ser produzido pela citrato sintase, mas não pode mais ser oxidado pelo ciclo de Krebs. O aumento da concentração mitocondrial de citrato promove seu transporte para o citosol, onde estimula a acetil-CoA carboxilase. Esta enzima e a citrato liase são ativadas por desfosforilação, além de serem induzidas, graças à influência da insulina. A acetil-CoA carboxilase transforma a acetil-CoA citosólica, produzida pela citrato liase a partir de citrato, em malonil-CoA. Malonil-CoA, além de ser substrato da síntese de ácidos graxos, inibe alostericamente a carnitina-acil transferase I, impedindo que os ácidos graxos recém-sintetizados sejam transportados para a mitocôndria e oxidados.

A síntese de ácidos graxos, por usar NADPH como poder redutor, faz cair a razão $NADPH/NADP^+$ citoplasmática, desbloqueando as desidrogenases da via das pentoses-fosfato, que são competitivamente inibidas pela coenzima reduzida. A atividade da via é ainda mais favorecida pela indução da síntese de glicose 6-fosfato desidrogenase por insulina. A

via das pentoses-fosfato gera NADPH, também formado na conversão de malato citosólico a piruvato, catalisada pela enzima málica, cuja concentração está aumentada por insulina. A glicose 6-fosfato é direcionada para a via das pentoses-fosfato já que não pode ser metabolizada pela glicólise, que está bloqueada pelo controle alostérico vigente nessa situação. Realmente, as altas concentrações de ATP e de citrato inibem a fosfofrutoquinase 1; caem os níveis de frutose 1,6-bisfosfato, o efetuador alostérico positivo da piruvato quinase, que tem sua atividade prejudicada.

Estabelece-se, portanto, um equilíbrio dinâmico, em que a produção de NADPH, acetil-CoA extramitocondrial, malonil-CoA e ATP é contrabalançada pelo consumo destes compostos na síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis. Conforme a razão ATP/ADP diminui, em virtude da utilização de ATP nestas e em outras sínteses, a glicólise é reativada, a glicose 6-fosfato origina piruvato, que origina acetil-CoA e oxaloacetato, formam-se coenzimas reduzidas no ciclo de Krebs e, finalmente, ATP na fosforilação oxidativa. Isto acontece até os níveis de ATP e citrato aumentem e voltem a inibir a glicólise: a glicose 6-fosfato passa a ser utilizada pela via das pentoses-fosfato. Deve-se notar que o funcionamento alternado das duas vias permite manter o fluxo dos carbonos da glicose para formar ácidos graxos e produzir NADPH.

A insulina favorece a entrada de aminoácidos nos tecidos e a síntese de proteínas, de modo que apenas os aminoácidos excedentes são oxidados e transformados em intermediários do ciclo de Krebs. A preferência dada à utilização de aminoácidos para a síntese proteica é resultado dos valores de K_M das duas categorias de enzima que têm os aminoácidos como substratos. As aminoacil-tRNA sintetases, que catalisam a ligação de aminoácidos aos tRNAs, encaminhando-os para a síntese de proteínas, têm valores de K_M muito menores do que as outras enzimas que metabolizam aminoácidos. Este fato é particularmente importante quando se consideram os aminoácidos essenciais.

Os produtos das sínteses hepáticas, com exceção do glicogênio, são destinados à exportação: os ácidos graxos, triacilgliceróis, fosfolipídios, colesterol e apoproteínas formam as lipoproteínas, que são liberadas na circulação.

No período absortivo todas as células podem receber glicose

Em condição de hiperglicemia, como a que ocorre no período absortivo, todos os transportadores de glicose estão atuantes, inclusive os que dependem de insulina para serem mobilizados para a membrana plasmática, como GLUT 4, que medeia a entrada de glicose no tecido adiposo e em músculos esqueléticos e cardíaco. Ou seja, todas as células tornam-se permeáveis à glicose.

Nos músculos esqueléticos, a glicose é polimerizada a glicogênio e no tecido adiposo, origina ácidos graxos e triacilgliceróis. Estas biossínteses sofrem regulação semelhante à das mesmas vias ocorrendo no fígado. Nos adipócitos, a glicose forma glicerol 3-fosfato, utilizado na esterificação dos ácidos graxos. Estes são também obtidos das lipoproteínas plasmáticas por ação da lipase lipoproteica, cuja concentração está aumentada por ação da insulina.

O acesso das lipases do tecido adiposo à gota de lipídios está bloqueado por desfosforilação das perilipinas promovida por insulina, de modo que os ácidos graxos produzidos no próprio adipócito, no fígado e os provenientes da dieta são depositados como triacilgliceróis.

Tendo em vista que os seres humanos, habitualmente, alimentam-se 3 vezes/dia e que a absorção dos nutrientes ingeridos leva de 4 a 5 h, o estado absortivo ou pós-prandial vigora durante a maior parte do período diurno. Está demonstrado que a hiperglicemia pós-prandial é um fator de risco importante para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em indivíduos diabéticos. Assim sendo, a manutenção da homeostase de glicose no período absortivo tornou-se objeto de grande interesse, visando ao maior entendimento da fisiopatologia do diabetes e à descoberta de alvos terapêuticos potenciais.

21.2 Período pós-absortivo

No período pós-absortivo prevalecem os efeitos do glucagon

A intensa remoção da glicose circulante pelos tecidos, permitida pela alta razão insulina/glucagon prevalente no período absortivo, reduz gradativamente a glicemia, até ser atingido o valor basal — em torno de 90

mg/100 mL (5 mM) — cerca de 4 horas após uma refeição. À medida que a glicemia aproxima-se desse valor, há uma inversão no hormônio secretado pelo pâncreas, passando a haver predomínio de glucagon. Inicia-se, assim, outro período, chamado *pós-absortivo*, durante o qual a glicemia será mantida principalmente pela degradação do glicogênio hepático, com contribuição crescente da gliconeogênese. Este período tem duração média de 12 horas, incluindo, portanto, o jejum noturno.

Durante o período pós-absortivo, o decréscimo da concentração plasmática de glicose é acompanhado por uma *diminuição da razão insulina/glucagon* — a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), de transdução de sinal da insulina, é interrompida e a via da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), de sinalização do glucagon, é iniciada. Nas células-alvo desses hormônios, a ativação da PKA e a desativação da proteína quinase B (PKB) e da fosfoproteína fosfatase-1 (PP-1) fazem predominar a forma fosforilada das proteínas-substrato. Muda também o resultado do controle da expressão gênica: enzimas reprimidas no período absortivo passam a ser induzidas. Até nova ingestão de alimentos, o sentido do metabolismo é invertido, passando a ser predominantemente degradativo.

O consumo de glicose passa a ser possível apenas pelos tecidos insulinoindependentes, como cérebro, hemácias e medula renal, que oxidam apenas glicose. A captação de glicose pelos tecidos que dependem de insulina, como músculos e tecido adiposo, é drasticamente reduzida devido à queda na concentração de GLUT 4 na superfície celular. A economia de glicose é considerável, já que os dois tecidos em conjunto respondem por grande porcentagem da massa corporal, e a glicose fica disponível para as células que a recebem por meio de transportadores independentes da insulina e que exibem baixos valores de K_M para o açúcar.

No fígado (Figura 21.3), inicia-se a degradação de glicogênio, graças à fosforilação e à ativação da glicogênio fosforilase, 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 de suas enzimas reguladoras. O glucagon estimula a PKA, que fosforila a 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, inibindo a primeira atividade e estimulando a segunda; caem os níveis de frutose 2,6-bisfosfato, o

principal ativador da fosfofrutoquinase 1. A piruvato quinase também é bloqueada por fosforilação catalisada pela PKA. Adicionalmente, o glucagon favorece a inibição da glicoquinase pela proteína reguladora e reprime a síntese de glicoquinase, fosfofrutoquinase 1 e piruvato quinase. O resultado é a interrupção da glicólise. 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. Com efeito, a relação citosólica NADPH/$NADP^+$ eleva-se, pois a síntese de ácidos graxos está restringida pela escassez de substratos e por inativação da acetil-CoA carboxilase e da citrato liase. A primeira enzima é fosforilada pela PKA e pela AMPK e a segunda pela glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3), ativas na ausência de insulina. Assim sendo, dos destinos da glicose 6-fosfato derivada da degradação de glicogênio, somente sua conversão a glicose é possível. A glicose, liberada pelo hepatócito, mantém a glicemia. A reserva hepática de glicogênio, entretanto, é insuficiente para a manutenção da glicemia normal mesmo durante o jejum noturno, quando há uma produção crescente de glicose pela gliconeogênese.

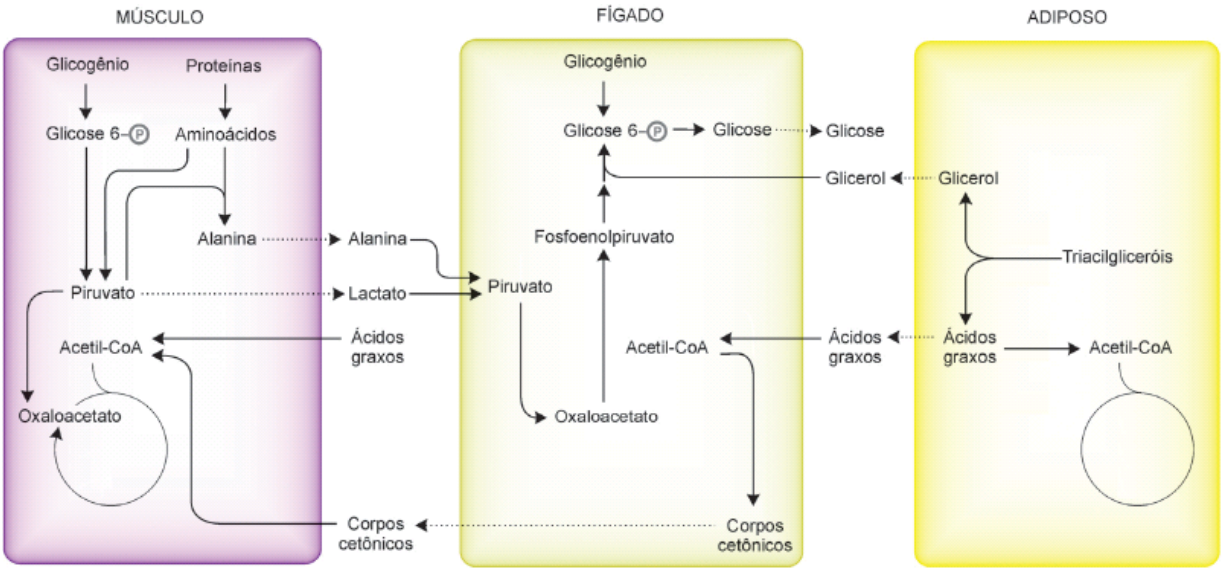


Figura 21.3 Período pós-absortivo/jejum: esquema das principais adaptações metabólicas induzidas pela baixa razão insulina/glucagon. No fígado, notar a não ocorrência do ciclo de Krebs devido ao consumo de oxaloacetato pela gliconeogênese, e o consequente desvio da acetil-CoA para formar corpos cetônicos; a inibição da piruvato desidrogenase impede

que o piruvato seja oxidado a acetil-CoA e preservado para originar oxaloacetato. No músculo, esta enzima também está inativa e o piruvato não se transforma em acetil-CoA; pode ser convertido em oxaloacetato, que mantém o funcionamento do ciclo de Krebs, em alanina, por transaminação com aminoácidos, ou em lactato. Alanina, glutamina (não mostrada na figura) e lactato são exportados do músculo.

Diversos mecanismos concorrem para ativar a gliconeogênese nos hepatócitos. A frutose 2,6-bisfosfato, que inibe a frutose 1,6-bisfosfatase, não está sendo produzida pela 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, que exibe apenas a atividade de fosfatase por estar fosforilada pela PKA. A acetil-CoA derivada da degradação de ácidos graxos (ver a seguir) atua como efetuador alostérico positivo da piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK 4) e da piruvato carboxilase, inibindo a oxidação de piruvato pela piruvato desidrogenase no primeiro caso e, no segundo, estimulando a carboxilação de piruvato a oxaloacetato, que origina glicose. À medida que aumenta a duração do jejum, a gliconeogênese torna-se mais intensa, devido ao aumento da concentração das enzimas: piruvato carboxilase, fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glicose 6-fosfatase, induzido por glucagon e cortisol. A gliconeogênese renal está igualmente estimulada.

A estimulação da degradação dos triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo pela PKA eleva o nível de ácidos graxos circulantes. Os ácidos graxos são essenciais para a manutenção das funções vitais de tecidos capazes de oxidá-los, como músculos esqueléticos e cardíaco, fígado, tecido adiposo etc. Nesta fase, a atividade hepática está canalizada para exportação de glicose, inicialmente proveniente do glicogênio e a seguir, da gliconeogênese. Não há oxidação de glicose ou de aminoácidos no fígado que possa prover ATP para sustentar a gliconeogênese e outros processos hepáticos — o combustível utilizado são os ácidos graxos. É esta também a fonte de energia do tecido muscular.

As altas razões acetil-CoA/CoA e $NADH/NAD^+$ mitocondriais resultantes da oxidação de ácidos graxos estimulam alostericamente a piruvato desidrogenase quinase (PDK 4), que também é induzida nesta situação; ela fosforila e inibe o complexo piruvato desidrogenase. Nas

células musculares, o bloqueio do complexo, ao impedir a oxidação aeróbia da glicose obtida da degradação de glicogênio, termina por favorecer a oxidação de ácidos graxos: o piruvato, impossibilitado de formar acetil-CoA, pode originar oxaloacetato para sustentar a oxidação da acetil-CoA derivada de ácidos graxos pelo ciclo de Krebs. No fígado, a piruvato desidrogenase está igualmente inativada, mas o oxaloacetato tem outro destino, a síntese de glicose.

21.3 Jejum

No jejum, intensificam-se os processos degradativos

O organismo humano tem uma capacidade notável de sobreviver sem ingerir alimentos por longos períodos, da ordem de 2 meses no caso de indivíduos saudáveis e até 1 ano, para obesos. Os estudos de Cahill, Owen e colaboradores, nas décadas de 1960 e 1970, foram decisivos para um maior entendimento das adaptações metabólicas ao jejum prolongado, em especial as que ocorrem no cérebro. Até então, acreditava-se ser a glicose o único substrato utilizado pelo cérebro, e os corpos cetônicos eram associados somente com a ocorrência de doenças, como o diabetes. Aqueles autores demonstraram, pela primeira vez, o papel essencial do consumo de corpos cetônicos pelo cérebro na sobrevivência ao jejum prolongado. Adicionalmente, evidenciaram a correlação existente entre a excreção de nitrogênio e a síntese de glicose, além da importância da atuação dos rins durante o jejum. Os resultados obtidos contribuíram para entender as necessidades nutricionais dos seres humanos, o planejamento de dietas adequadas para a redução do peso corpóreo e as síndromes de desnutrição crônica, como *kwashiorkor* e marasmo (Seção 18.3), que afetam uma parcela significativa das crianças de países em desenvolvimento.

No jejum, o glucagon atua praticamente sem o antagonismo da insulina e coadjuvado pelo cortisol, adaptando o organismo a sobreviver sem a ingestão de nutrientes.

Além de 12 horas de jejum, quando a gliconeogênese é responsável por 50% da glicose circulante, sua importância como via produtora de glicose suplanta a da glicogenólise. O glicogênio hepático está praticamente

esgotado com 24 horas de jejum e, após este tempo, a gliconeogênese é a única via capaz de manter a glicemia.

O principal substrato da síntese de glicose são os aminoácidos provenientes da degradação contínua de proteínas que, no jejum têm sua síntese prejudicada e sua degradação estimulada, pois há níveis baixos de insulina e altos de cortisol. A maior contribuição de aminoácidos para a gliconeogênese é dada pelas proteínas dos músculos esqueléticos (Figura 21.3), que são tecidos com grande concentração proteica; porém, as consequências da degradação de enzimas, que têm meias-vidas muito curtas, são muito mais amplas e sistêmicas, já que afetam todas as vias metabólicas. Na musculatura esquelética, o resultado líquido da descompensação entre síntese e degradação é o aumento da concentração de aminoácidos livres. A maioria dos aminoácidos é parcialmente metabolizada, originando intermediários passíveis de serem convertidos a alanina e glutamina. Nas fibras musculares, a transaminase específica para os aminoácidos ramificados (isoleucina, leucina e valina) é particularmente ativa. A atuação desta enzima, e das demais transaminases, resulta na transferência do grupo amino dos aminoácidos ramificados e de outros aminoácidos para piruvato e α-cetoglutarato, formando alanina e glutamina; piruvato e α-cetoglutarato são provenientes da degradação de glicogênio e de diversos aminoácidos do músculo. O bloqueio do complexo piruvato desidrogenase, fosforilado pela isoenzima muscular da piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK 4) impede a oxidação de piruvato a acetil-CoA, preservando este composto para a formação de alanina. A alanina e a glutamina produzidas são liberadas na circulação, constituindo a forma de transporte do nitrogênio dos aminoácidos derivados da proteólise muscular. A alanina é captada principalmente pelo fígado, onde o seu α-cetoácido, o piruvato, forma glicose e o grupo amino, ureia. A glutamina é utilizada como substrato pela gliconeogênese renal; enquanto o seu esqueleto de carbono origina glicose, o nitrogênio é convertido em íons NH_4^+, cuja excreção na urina contribui para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Assim, a gliconeogênese hepática e a renal estão associadas com a produção de ureia e de amônia, respectivamente. Como a eliminação do nitrogênio derivado dos aminoácidos utilizados para a síntese de glicose

não é acompanhada de ingestão, estabelece-se um *balanço nitrogenado negativo*.

A intensa degradação de ácidos graxos, mobilizados das reservas lipídicas, não acompanhada de degradação proporcional de carboidratos, leva ao acúmulo de acetil-CoA no fígado: a deficiência de oxaloacetato, continuamente retirado pela gliconeogênese, restringe a oxidação de acetil-CoA pelo ciclo de Krebs. A acetil-CoA acumulada condensa-se, formando os *corpos cetônicos* (Figura 21.3). 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 a acetil-CoA proveniente de ácidos graxos e corpos cetônicos a CO_2 e H_2O. 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 fortemente degradativo.

A maior parte da reserva energética está sob a forma de triacilgliceróis (Tabela 21.3). Os ácidos graxos não originam 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 saudáveis chegam a sobreviver a 1 a 2 meses de jejum. Uma adaptação decisiva para permitir esta longa sobrevida é o desenvolvimento, pelo cérebro, da capacidade de oxidar corpos cetônicos, além de glicose. A utilização desta nova fonte permite grande economia de glicose: após 2 a 3 dias de jejum diminui a intensidade da gliconeogênese e, consequentemente, a espoliação proteica, refletida na queda da excreção de nitrogênio urinário. Depois de 5 semanas de jejum, verifica-se a produção de apenas 5 g de glicose a mais do que a derivada da

renovação de proteínas endógenas. Nesta fase, os corpos cetônicos perfazem cerca de 60% do suprimento energético do cérebro.

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, a *cetoacidose*, com significativa redução do nível de bicarbonato plasmático (Tabela 21.3).

A Figura 21.4 mostra os resultados do trabalho de Cahill e colaboradores sobre os processos utilizados para manter a homeostase de glicose no jejum prolongado. A homeostase da glicose foi dividida em cinco fases, segundo a procedência predominante da glicose plasmática a partir da ingestão de uma refeição — ver também a Tabela 21.4. Na Fase I, a glicose é provida pelos carboidratos dos alimentos. Uma vez esgotado este suprimento, inicia-se a Fase II, durante a qual a glicemia é mantida pela glicogenólise hepática. À medida que diminui a reserva de glicogênio do fígado, a gliconeogênese torna-se cada vez mais importante, até que, após 16 h (12 h, segundo estudos mais recentes), contribui com 50% da glicose plasmática. Inicia-se a Fase III, na qual esta via é a fonte principal de glicose. Estas mudanças ocorrem dentro de mais ou menos 24 horas de jejum. Vários dias de jejum levam à Fase IV, na qual se inicia uma menor dependência da gliconeogênese: notar, na Figura 21.4, a queda no consumo de glicose que ocorre com 2 a 3 dias de jejum. Isto acontece porque os corpos cetônicos acumularam-se em níveis suficientemente altos para induzir sua entrada e sua oxidação no cérebro, onde passam a substituir parte da glicose anteriormente consumida para obter energia. A Fase V ocorre depois de algumas semanas de jejum e caracteriza-se por dependência ainda menor da gliconeogênese. As necessidades energéticas da maioria dos tecidos nesta fase são satisfeitas, em grande parte por oxidação de ácidos graxos ou de corpos cetônicos. Enquanto as concentrações de corpos cetônicos forem elevadas, a proteólise será menos intensa, preservando as proteínas musculares. Esta situação permanece até praticamente toda a gordura ser consumida. Depois disto, as proteínas musculares têm de ser utilizadas e, antes que se esgotem, advém a morte.

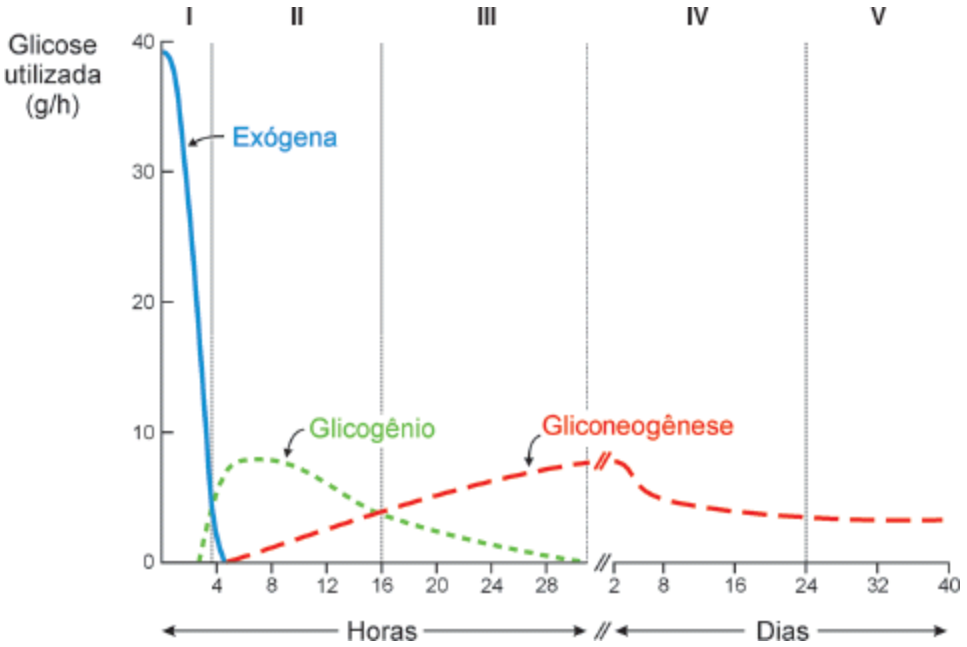


Figura 21.4 As cinco fases da homeostase da glicose em seres humanos. A figura mostra a quantidade de glicose utilizada e as suas origens — exógena ou da dieta, glicogênio hepático e gliconeogênese hepática e renal — ao longo do tempo, após a ingestão de uma refeição (tempo zero). Ver também a Tabela 21.4. Adaptada de Ruderman NB, Aoki TT and Cahill GF Jr *in* Hanson RW, Mehlman MA (editors): *Gluconeogenesis: Its Regulation in Mammalian Species*, p. 515. John Wiley & Sons, 1976.

Tabela 21.4 As cinco fases da homeostase de glicose: origem da glicose sanguínea, tecidos e órgãos que a utilizam e principais combustíveis para o cérebro nas diferentes fases.[1]

	Fases				
	I	II	III	IV	V
Origem da glicose sanguínea	Exógena	Glicogênio hepático; gliconeogênese hepática	Gliconeogênese hepática; glicogênio hepático	Gliconeogênese hepática e renal	Gliconeogênese hepática e renal
Tecidos/órgãos que usam glicose	Todos	Todos, exceto o fígado; músculo e adiposo em	Todos, exceto o fígado; músculo e adiposo em	Cérebro, hemácias, medula renal;	Cérebro, em velocidades baixas,

		velocidades baixas	velocidades intermediárias entre as Fases II e IV	pequenas quantidades pelo músculo	hemácias, medula renal
Principal combustível do cérebro	Glicose	Glicose	Glicose	Glicose, corpos cetônicos	Corpos cetônicos, glicose

[1] Adaptada de Ruderman NB et al., 1976.

21.4 Diabetes

A produção deficiente de insulina ou a resistência à sua ação ocasiona o diabetes

O diabetes *mellitus* é uma doença metabólica complexa que se apresenta sob formas diferentes, que têm em comum a hiperglicemia. Pode ser provocada por graus variáveis de deficiência de insulina e de redução da sensibilidade das células-alvo ao hormônio. Há dois tipos principais de diabetes.

O *diabetes tipo 1* (*insulinodependente* ou *juvenil*) é uma doença autoimune na qual as células β das ilhotas do pâncreas, produtoras de insulina, são destruídas progressivamente. É uma doença sob controle poligênico. A probabilidade de uma pessoa desenvolver diabetes tipo 1 é tanto maior quanto maior o grau de parentesco com uma pessoa com a doença. Manifesta-se mais frequentemente em crianças e adolescentes.

O *diabetes tipo 2* (*insulinoindependente* ou *da maturidade*), a forma mais comum do diabetes, caracteriza-se por resistência à insulina e por secreção deficiente de insulina, sendo que um distúrbio pode predominar sobre o outro. A resistência à insulina é uma condição na qual os tecidos deixam de responder ao hormônio, havendo a supressão dos seus efeitos mais marcantes, que são o estímulo da entrada de glicose nos tecidos, principalmente músculos e adiposo, e a inibição da produção de glicose pelo fígado. A hiperglicemia resultante estimula o pâncreas a secretar mais insulina, no sentido de normalizar a concentração de glicose sanguínea; todavia, mesmo na presença de altas concentrações do hormônio circulante,

a glicemia permanece elevada. Em muitos casos, a estimulação crônica das células β do pâncreas leva à sua falência e à secreção deficiente do hormônio.

No final da década de 1980, verificou-se que certos distúrbios metabólicos acometiam concomitantemente indivíduos adultos: hiperglicemia, obesidade, dislipemia aterogênica (níveis plasmáticos aumentados de triacilgliceróis e LDL-colesterol e níveis reduzidos de HDL-colesterol) e hipertensão arterial. Na época, esta condição foi denominada *Síndrome X* e posteriormente, *Síndrome Metabólica*; a causa subjacente de sua instalação é a resistência à insulina. Indivíduos afetados pela síndrome, em relação à população não afetada, têm um risco cinco vezes maior de desenvolver diabetes tipo 2 e um risco duas vezes maior para doenças cardiovasculares. A importância do diagnóstico da Síndrome Metabólica é a identificação precoce de pacientes com essa predisposição, possibilitando o início do tratamento para prevenir o desenvolvimento daquelas complicações. A Síndrome Metabólica tem alta incidência no mundo; nos Estados Unidos, por exemplo, afeta 25% dos adultos maiores de 20 anos e 40% dos maiores de 60 anos.

Historicamente, o diabetes tipo 2 era considerado uma doença característica de pessoas mais velhas, mas, com o aumento da incidência de obesidade em crianças, adolescentes e adultos jovens, passou a incidir também nestas populações. O diabetes tipo 2 pode evoluir para as mesmas complicações clínicas que o diabetes tipo 1, tais como doenças cardiovasculares — a principal causa de morte entre os diabéticos —, neuropatias, nefropatias, retinopatias, catarata etc.

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 tipo 1 (insulinodependente) não tratado. A deficiência na produção de insulina impede o aproveitamento de glicose pelos tecidos insulinodependentes e aumenta a produção de glicose pelo fígado, levando à hiperglicemia. Como deixa de haver inibição da síntese de glucagon por insulina, resulta uma hiperglucagonemia, agravando a hiperglicemia. Fica imposta ao organismo uma razão insulina/glucagon permanentemente baixa, mimetizando uma situação de

carência nutricional, apesar dos altos níveis plasmáticos de glicose (Tabela 21.3). Desta forma, prevalece o metabolismo degradativo: gliconeogênese acentuada, levando a intensa proteólise; lipólise acelerada, com alta produção de corpos cetônicos, que pode ocasionar cetoacidose grave, e balanço nitrogenado negativo. Todas estas alterações metabólicas são derivadas da carência celular de glicose e aminoácidos. Entretanto, a hiperglicemia também tem consequências. 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.

O controle estrito da glicemia é recomendado para todos os pacientes com diabetes, tendo em vista que a hiperglicemia está fortemente associada a muitas das complicações do diabetes. A alta concentração de glicose circulante provoca a formação de proteínas glicadas no sangue e nos tecidos. Nas hemácias, a glicose liga-se à hemoglobina, em uma reação não catalisada e irreversível, que depende da concentração de glicose e do tempo de vida das hemácias, em média, de 120 dias. O monitoramento do grau e da duração da hiperglicemia costuma ser feito medindo o teor de hemoglobina glicada (HbA_{1c}). Este dado reflete o valor médio da concentração de glicose ao longo dos 2 a 3 meses precedentes: indivíduos diabéticos podem apresentar concentrações de HbA_{1c} até três vezes maiores que indivíduos normais. Avaliações do teor de hemoglobina glicada constituem o procedimento padrão para avaliar a eficácia da abordagem terapêutica adotada para o tratamento da doença, adicionalmente a medidas pontuais da glicemia.

No início da década de 1920, acreditava-se que o quadro descrito para o diabetes tipo 1 poderia ser revertido com a administração do hormônio deficitário. Todavia, passadas algumas décadas, verificou-se que injeções periódicas de insulina não eram capazes de reproduzir o controle extremamente sofisticado do metabolismo, resultando em uma expectativa de vida reduzida, devido à instalação dos processos degenerativos inerentes à doença. Inúmeras estratégias terapêuticas foram desenvolvidas desde então, na tentativa de mimetizar os padrões fisiológicos de secreção de insulina, tornando possível o controle eficiente da glicemia.

As insulinas bovina e suína foram substituídas por insulina humana recombinante e, a partir de meados da década de 1990, tornaram-se disponíveis os *análogos de insulina*, resultantes de alterações na sequência de aminoácidos da cadeia β da insulina humana. Os análogos de insulina podem ser de ação rápida, intermediária ou lenta, permitindo ajustar os níveis de glicose na situação pós-prandial e nos períodos de jejum. Adicionalmente, estão disponíveis novos sistemas de infusão contínua de insulina ("bomba de insulina") que respondem com maior precisão a variações da glicemia do que injeções do hormônio. Uma nova forma de administração de insulina, não invasiva e mais bem aceita pelos pacientes, está disponível desde 2006: é a insulina em pó, absorvida por inalação (*insulina inalável*), empregada como alternativa para as insulinas subcutâneas de ação rápida. Porém, os efeitos a longo prazo sobre a função pulmonar não são conhecidos.

Os pacientes com diabetes tipo 1 necessitam de terapia insulínica permanente, a não ser que recebam transplante de pâncreas inteiro ou de ilhotas de Langerhans, uma abordagem terapêutica utilizada ainda em escala reduzida e experimental.

O controle do diabetes tipo 2 é conseguido por uma combinação de abordagens terapêuticas: regime alimentar, atividade física, administração de antidiabéticos orais e, ainda, insulina. Com efeito, devido aos benefícios advindos do controle rígido da glicemia, o uso de insulina, ou de análogos de insulina, passou a ser mais comum e precocemente empregado. Os antidiabéticos (ou hipoglicemiantes) orais são agentes farmacológicos que determinam redução da glicemia, por atuações diversas, tais como: reduzir a produção de glicose pelo fígado, promover a tomada do açúcar pelas células, estimular a secreção de insulina do pâncreas, retardar a digestão e, portanto, a absorção de carboidratos etc. O mecanismo de ação destes agentes, embora alguns sejam empregados há décadas, ainda é controverso. É o que acontece com a *metformina*, o fármaco mais utilizado para o tratamento do diabetes tipo 2: a hipótese aceita de que ela inibiria a gliconeogênese hepática por ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) tem sido questionada.

Uma nova abordagem terapêutica para reduzir a hiperglicemia do diabetes envolve a participação dos rins: inibidores do transportador de

glicose impedem a reabsorção renal de glicose que, então, é excretada na urina em vez de retornar à circulação e elevar a glicemia.

Bibliografia

Cahill GF Jr: Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr* **26**: 1-22, 2006.

Chao EC, Henry RR: SGLT2 inhibition — a novel strategy for diabetes treatment. *Nat Rev Drug Discov* **9** (7): 551-559, 2010.

Madiraju AK *et al.*: Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* **510** (7506): 542-546, 2014.

Miller RA *et al.*: Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* **494**: 256-260, 2013.

Owen OE: Ketone bodies as a fuel for the brain during starvation. *Biochem Molec Biol Ed* **33** (4): 246-251, 2005.

Reaven GM: Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**: 1595-1607, 1988.

Sacks DB: Hemoglobin A1c in diabetes: panacea or pointless? *Diabetes* **62**: 41-43, 2013.

Smyth S, Heron A: Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Med* **12** (1), 75-80, 2005.

Taylor R *et al.*: Direct assessment of liver glycogen storage by 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy and regulation of glucose homeostasis after a mixed meal in normal subjects. *J Clin Invest* **97**: 126-132,1996.

Young VR, Scrimshaw NS: The physiology of starvation. *Sci Am* **225** (4): 14-21, 1971.

OceanofPDF.com

22 Contração Muscular

Nos vertebrados, há três tipos principais de músculos: esquelético, cardíaco e liso. Os músculos esqueléticos têm contração voluntária, desencadeada por impulsos nervosos motores, ao passo que os músculos lisos e cardíaco apresentam contração involuntária, desencadeada por impulsos nervosos autônomos. 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 dos 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.

22.1 Estrutura do músculo esquelético

Os músculos esqueléticos são formados por feixes paralelos 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 principais de filamentos proteicos, *filamentos grossos* e *filamentos finos,* e sua disposição resulta no padrão de bandas de diferentes refringências, que conferem uma aparência estriada à fibra muscular examinada ao microscópio óptico. Ao microscópio eletrônico, é

possível visualizar zonas claras e escuras alternadas: as *bandas I* (de ***I**sotrópicas*), contendo somente filamentos finos, e as *bandas A* (de ***A**nisotrópicas*), contendo filamentos grossos e finos parcialmente sobrepostos. No centro da banda I, aparece a *linha Z* (ou *disco Z*) e no meio da banda A, a *linha M* (ou *disco M*). A unidade funcional é o *sarcômero*, a região compreendida entre duas linhas Z (Figura 22.1).

22.1.1 Filamentos grossos: miosina

Os filamentos grossos são constituídos basicamente por *miosina*, uma proteína com seis cadeias polipeptídicas, duas maiores, as *cadeias pesadas* (*MHC*, de ***M**yosin **H**eavy **C**hain*) e quatro menores, as *cadeias leves* (*MLC*, de ***M**yosin **L**ight **C**hain*), iguais duas a duas. As cadeias organizam-se em um segmento fibroso, a *cauda da miosina*, e duas porções globulares idênticas, as *cabeças da miosina* (Figura 22.2). As cabeças da miosina são também chamadas de *S1*, por corresponderem a um dos fragmentos peptídicos produzidos por digestão parcial da miosina com enzimas proteolíticas, o *fragmento S1* (de ***S**ubfragment **1***). A cauda é um longo bastão em dupla-hélice, resultante da associação das duas cadeias pesadas, com estrutura em α-hélice, que se enrolam uma sobre a outra, ao longo de grande extensão da região carboxila terminal. Na extremidade aminoterminal da dupla-hélice, as cadeias pesadas dobram-se separadamente e cada uma une-se a duas cadeias leves formando as cabeças da miosina. Cada cabeça (S1) consta de uma extremidade esférica e um pedúnculo; a primeira contém o domínio catalítico e o segundo, o domínio mecânico (ou regulador). O domínio catalítico contém o centro ativo com atividade ATPásica e o sítio de ligação aos filamentos finos. O domínio mecânico é constituído por um trecho em hélice da cadeia pesada ao qual se entrelaçam duas cadeias leves; situa-se entre o domínio catalítico e a cauda da miosina, aos quais se une por ligações flexíveis. Ou seja, o domínio mecânico apresenta dois pontos de articulação, que permitem mudança de sua orientação durante o ciclo de contração muscular, razão pela qual é chamado de “braço-alavanca” (*lever arm*).

Os filamentos grossos são formados por centenas de moléculas de miosina, associadas cauda a cauda (Figura 22.3). As cabeças ficam

orientadas em direções opostas em relação ao centro do sarcômero, onde se encontram somente segmentos lineares, as caudas, que constituem a zona mais clara ao redor da banda M na Figura 22.1. As cabeças projetam-se a intervalos regulares, podendo ligar-se aos filamentos finos, constituindo as *pontes cruzadas*.

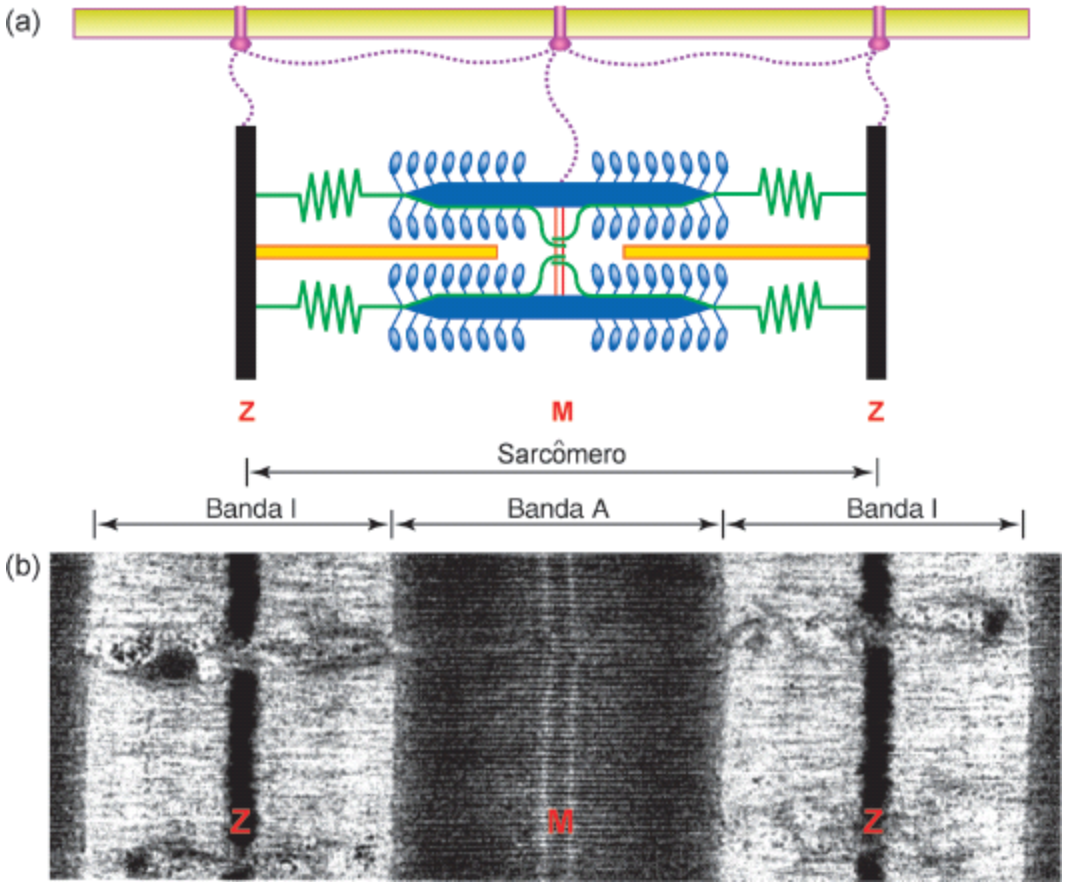


Figura 22.1 a) Diagrama da estrutura do sarcômero. Os filamentos grossos (azuis) e os finos (amarelos) são organizados em paralelo por duas estruturas transversais, os discos Z (pretos) e M (vermelho). Os discos Z definem os limites do sarcômero e ancoram os filamentos finos. Os filamentos de titina (verdes) são flexíveis e conectam os filamentos grossos aos discos Z e M. Os filamentos extrassarcoméricos (linhas pontilhadas) ligam-se a proteínas integradas (magenta) do sarcolema (barra cor pistache, com borda magenta). b) Micrografia eletrônica de um segmento de miofibrila em corte longitudinal. As regiões de sarcômeros adjacentes ocupadas somente por filamentos finos aparecem como uma faixa clara, a

banda I, em cujo centro localiza-se o disco Z. Os filamentos grossos sobrepostos a uma parte dos filamentos finos formam a zona escura no meio do sarcômero, a banda A, no centro da qual fica o disco M. Adaptada de Agarkova e Perriar, 2005.

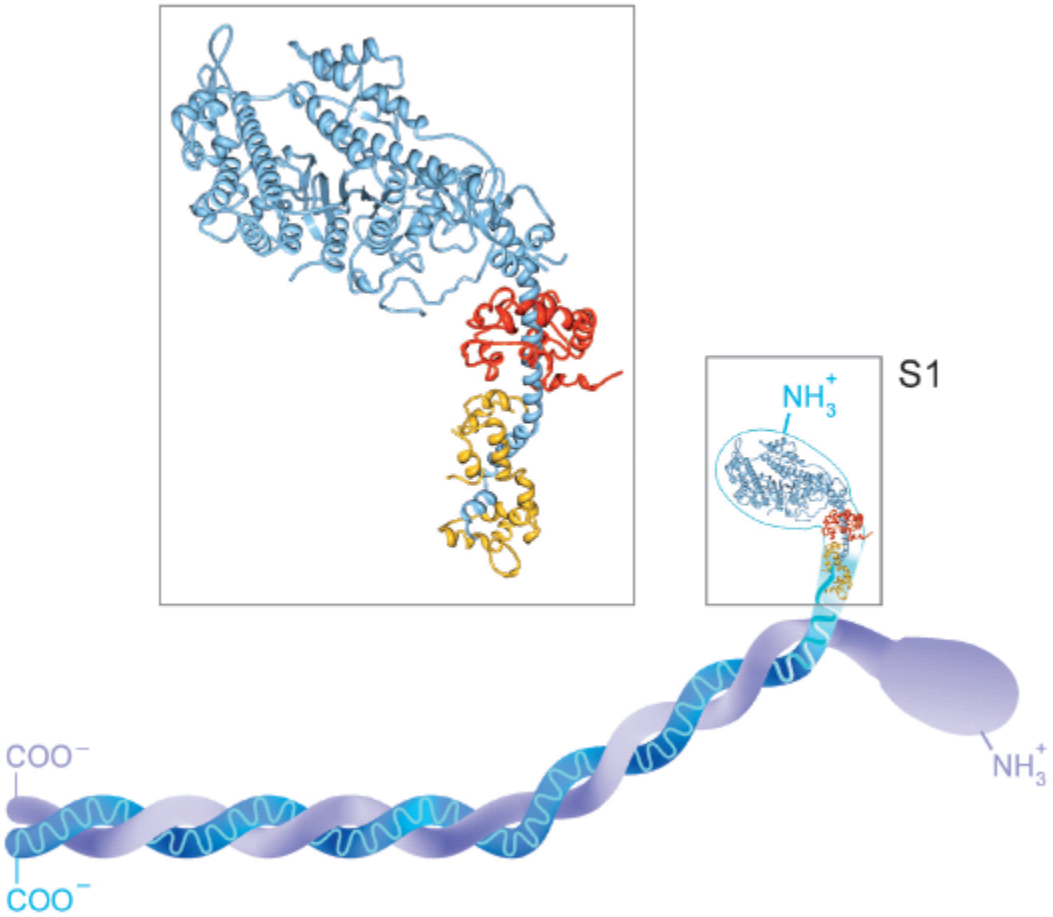


Figura 22.2 A molécula de miosina apresenta um segmento fibroso, a cauda, e duas porções globulares, as cabeças (S1). A cauda é formada pelo enrolamento das duas cadeias pesadas (MHC) em α-hélice; estas, na região aminoterminal, separam-se e cada uma se une a duas cadeias leves (MLC), originando S1. A estrutura de S1, detalhada no retângulo à esquerda, consta de uma extremidade esférica e um pedúnculo. A extremidade esférica resulta do dobramento da cadeia pesada (azul) e corresponde ao domínio catalítico, que inclui o centro ativo e o sítio de ligação aos filamentos finos, com forma de fenda; o pedúnculo é formado por um trecho da cadeia pesada em α-hélice simples, estabilizada pela associação de duas cadeias

leves (em amarelo e vermelho), e corresponde ao domínio mecânico (*lever arm*).

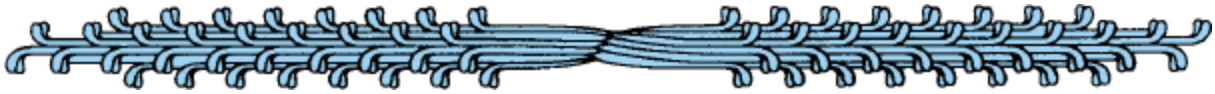


Figura 22.3 Esquema mostrando a disposição de moléculas de miosina compondo um filamento grosso. Adaptada de Voet D, Voet JG: *Biochemistry*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., 1995.

22.1.2 Filamentos finos: actina, tropomiosina e troponina

A principal proteína do filamento fino 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 duas hélices, que se entrelaçam originando uma longa molécula, a *actina F* (Figura 22.4). Cada filamento fino contém uma molécula de actina F associada a duas outras proteínas, a tropomiosina e a troponina. A molécula de *tropomiosina* é um dímero helicoidal, resultante do enrolamento de duas cadeias em α-hélice; ela se insere ao longo do sulco entre as duas hélices da actina F, cobrindo sete monômeros de actina. A união de várias moléculas de tropomiosina origina um filamento que se estende por toda a superfície da actina F. Cada molécula de tropomiosina está unida a uma molécula de troponina. A *troponina* é composta de três subunidades: *Tn**C***, capaz de ligar-se a ***C***a^{2+}; *Tn**I***, que ***i***nibe a ligação de S1 à actina; e *TnT*, que se liga à ***t***ropomiosina.

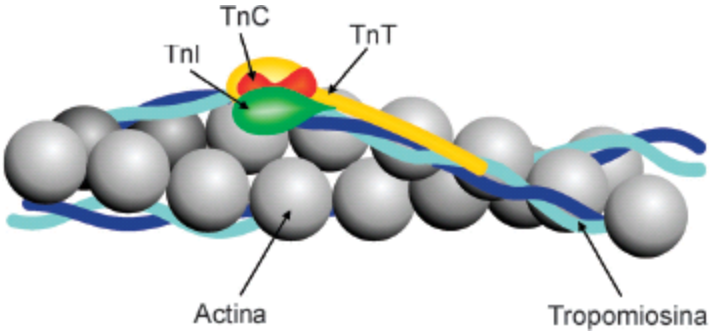


Figura 22.4 Organização das moléculas de troponina (Tn), tropomiosina e actina no filamento fino. As subunidades da troponina, TnC, TnT e TnI dispõem-se sobre as duas α-hélices da tropomiosina, que cobrem 7 monômeros de actina. TnT é uma molécula assimétrica: a extremidade filamentosa sobrepõe-se à tropomiosina e a esférica interage com TnC e TnI; TnI liga-se também à actina. Adaptada de Gordon *et al*., 2000.

22.1.3 Proteínas sarcoméricas acessórias

Além das principais proteínas componentes dos filamentos grossos e finos descritas, estão presentes no sarcômero muitas outras proteínas que asseguram a organização estrutural dos filamentos contráteis. Cada uma das duas estruturas transversais, os discos Z e M, é formada por diversas proteínas organizadas em complexos multiproteicos. O disco Z ancora os filamentos finos de sarcômeros adjacentes e o disco M, os filamentos grossos no centro dos sarcômeros. Os discos Z e M são conectados por filamentos longitudinais, que se prendem também aos filamentos grossos, formados por *titina*, uma proteína gigante, com cerca de 30.000 aminoácidos; sua molécula elástica funcionaria como uma mola, garantindo a integridade do sarcômero durante o ciclo de contração/relaxamento. Existem ainda filamentos proteicos externos ao sarcômero, que ligam os discos Z e M ao sarcolema (Figura 22.1).

22.2 Mecanismo da contração muscular

A contração de músculos esqueléticos ocorre por encurtamento do sarcômero (em até 65%), como resultado do deslizamento dos filamentos finos entre os grossos; não há mudança no comprimento dos próprios filamentos.

A movimentação dos filamentos dá-se à custa da hidrólise de ATP, catalisada pelas cabeças da miosina (S1). Em experimentos *in vitro*, demonstrou-se que miosina, ou mesmo S1, em solução é capaz de hidrolisar ATP, mas ADP e P_i são excluídos do sítio ativo muito lentamente. A adição de actina estimula de 100 a 200 vezes a atividade ATPásica da miosina

(*actin* deriva de *activate*), por aumentar a velocidade da liberação dos produtos, a etapa limitante da reação.

Para que as proteínas motoras produzam movimento, a hidrólise de ATP deve estar acoplada a mudanças de conformação. O mecanismo de transdução da energia química em energia mecânica pelas proteínas musculares é explicado pela hipótese do "braço-alavanca" (*lever arm*), que postula ser a rotação angular desta estrutura de S1, o componente mecânico primário da geração de força e movimento. De acordo com este modelo, a interação das cabeças da miosina com a actina, o estabelecimento das pontes cruzadas, ocorreria pela sequência de etapas esquematizadas na Figura 22.5. Na etapa 1, o ATP liga-se ao complexo actina·miosina, a actomiosina (AM), formando actomiosina·ATP (AM·ATP), que se separa rapidamente (etapa 2) em actina (A) e miosina·ATP (M·ATP). Na etapa 3, o ATP é prontamente hidrolisado na cabeça da miosina, resultando M·ADP·P_i. A dissociação de AM·ATP em A e M·ATP é tão rápida, que a hidrólise ocorre na miosina dissociada. Segue-se a reassociação, todavia por meio de ligações fracas, de actina e M·ADP·Pi, formando A–M·ADP·P_i (etapa 4). Este conjunto sofre isomerização, convertendo-se em um complexo fortemente ligado, AM*·ADP·P_i (etapa 5), apto a liberar os produtos; esta é a principal etapa controlada por íons Ca^{2+} (Seção 22.3). A liberação de P_i desencadeia a rotação do *lever arm* e a produção de força para a contração (etapa 6). A liberação de ADP (etapa 7) produz AM, que pode ligar-se a ATP, reiniciando o processo.

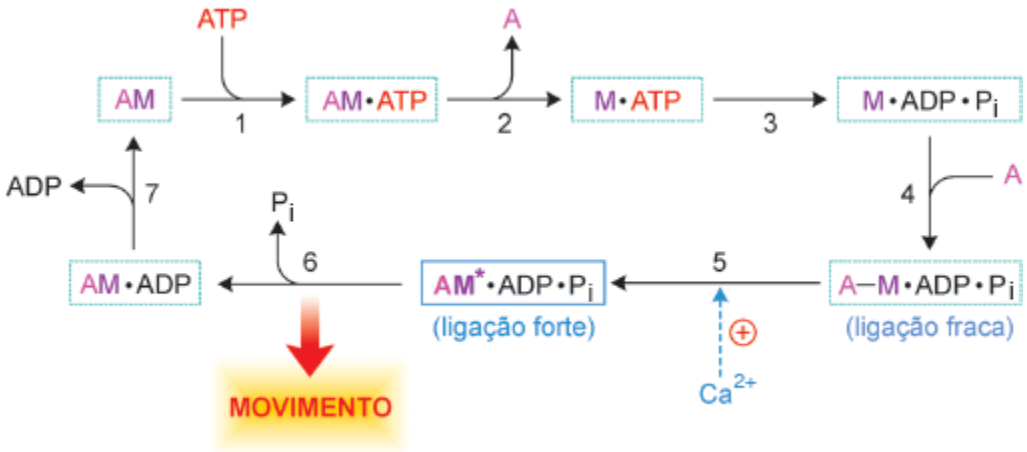


Figura 22.5 Etapas de interação entre actina (A) e miosina (M) e de geração de força para a contração, propostas pela hipótese do *lever arm* (“braço-alavanca”) para o mecanismo da conversão de energia química em mecânica. Na etapa 6, de liberação de P_i, a energia é utilizada para mudar a posição do *lever arm*, que desloca a actina. A etapa 5 é estimulada por íons Ca^{2+}. As etapas estão detalhadas no texto.

A hidrólise de ATP é muito rápida e o passo limitante da formação das pontes cruzadas é a liberação dos produtos — a dissociação de P_i do sistema AM*•ADP·P_i é acompanhada por grande queda de energia livre e corresponde à fase de geração de trabalho mecânico.

O *lever arm* atuaria como um amplificador de mudanças estruturais discretas de S1 e a velocidade de deslizamento dos filamentos deveria depender de seu tamanho; de fato, demonstrou-se que a extensão do deslocamento sofrido pelo filamento de actina por ciclo de contração é uma função direta do comprimento do *lever arm*. Uma representação simplificada da movimentação do *lever arm*, deslocando a actina, está mostrada na Figura 22.6. O *lever arm* muda de orientação em relação ao domínio catalítico e à cauda da miosina, enquanto a posição do domínio catalítico não muda significativamente.

Em resumo, o complexo actomiosina é desfeito por ATP e a propulsão mecânica depende da liberação de fosfato dos produtos, após a etapa de hidrólise de ATP: o *lever arm* sofre uma grande rotação angular e a miosina desloca o filamento de actina.

Como a miosina está fortemente ligada à actina somente durante o período de produção de movimento, as cabeças de miosina não podem mover-se ao longo da actina: cada uma delas repete o ciclo descrito muitas vezes durante um único evento de contração. A contração muscular consiste, portanto, em fixação e desligamento sucessivos das cabeças de miosina à actina, um fazer e desfazer de pontes cruzadas, à custa da energia de hidrólise de ATP.

O mecanismo que permite o acoplamento do ciclo da ATPase da miosina com a ligação da actina e o movimento do *lever arm* permanece inconcluso.

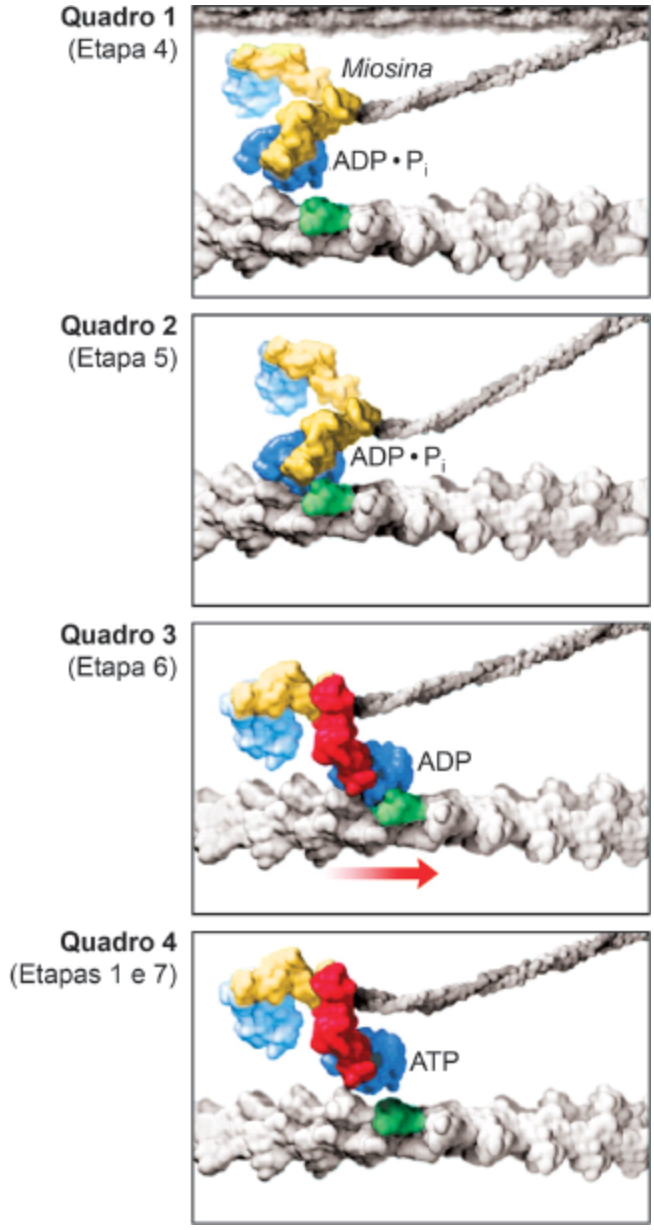


Figura 22.6 Modelo do deslocamento dos filamentos de actina e miosina de músculos esqueléticos. Uma molécula de miosina ancora-se ao filamento grosso (mostrado em cinza no limite superior do Quadro 1) pela cauda e uma de suas duas cabeças (S1) está próxima do filamento de actina (em cinza-claro, na parte inferior dos quadros). As duas cabeças da miosina atuam independentemente, unindo-se à actina uma por vez. O domínio catalítico de S1 está indicado em azul e o mecânico (*lever arm*), em amarelo ou vermelho, dependendo do estado em que se encontra. **Cada quadro é equiparado com uma etapa da Figura 22.5. Quadro 1**: O domínio mecânico está no estado pré-movimento (amarelo) e o domínio

catalítico, contendo ADP e P_i, liga-se fracamente à actina (**Etapa 4**). **Quadro 2**: S1 liga-se fortemente ao sítio de ligação (verde) na actina, ficando apto a mover-se (**Etapa 5**). **Quadro 3**: A associação apropriada com a actina causa a liberação de P_i do sítio ativo de S1 (**Etapa 6**); o *lever arm* (em vermelho) dá uma guinada, deslocando o filamento de actina (seta vermelha) por cerca de 100 Å. **Quadro 4**: Completado o movimento, o ADP dissocia-se (**Etapa 7**) e o ATP liga-se ao sítio ativo (**Etapa 1**). Adaptada de Vale RD, Milligan RA: The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288** (5463): 88-95, 2000.

22.3 Regulação da contração muscular

Em músculos esqueléticos, a interação da miosina com a actina e, por consequência, a atividade ATPásica de S1 e a contração, são moduladas pela atuação conjunta da troponina e da tropomiosina, mediada por íons Ca^{2+}. No músculo em estado de repouso (relaxado), essas proteínas bloqueiam regiões da molécula de actina onde se ancoram as cabeças da miosina — a ATPase de S1 não é ativada e a contração é inibida. O aumento da concentração de Ca^{2+}reverte a inibição: aquelas regiões da actina ficam descobertas, viabilizando a ligação miosina-actina, o que aumenta a atividade ATPásica em cerca de 100 vezes e a contração é estimulada.

A ligação de íons Ca^{2+} à subunidade TnC da troponina, análoga à calmodulina (Seção 19.4.2 — Figura 19.8), determina uma série de mudanças de conformação, alterando as interações entre troponina, tropomiosina e actina e, portanto, a posição dessas proteínas no filamento de actina. Os sítios de ligação fraca da miosina à actina, anteriormente bloqueados, são deixados descobertos. O resultado é a ligação da miosina à actina, que ativa a ATPase de S1 e causa translocações adicionais das proteínas do filamento de actina, permitindo o estabelecimento de ligações fortes; esta é a etapa que precede a liberação dos produtos e a produção de força, ativando a contração.

Ca^{2+} é o intermediário entre o impulso nervoso e a contração muscular

A contração de músculos esqueléticos 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 sarcoplasma (10^{-7} M), graças à ação da Ca^{2+}-ATPase, uma bomba de cálcio movida a ATP, presente na membrana do retículo. A chegada do impulso nervoso torna a membrana do retículo permeável a cálcio, e o vazamento deste íon para o sarcoplasma eleva a sua concentração até 10^{-5} M.

A liberação de Ca^{2+} no sarcoplasma inicia a contração. O Ca^{2+} liga-se a TnC e ficam expostos os sítios da actina aos quais as cabeças de miosina, contendo ATP no domínio catalítico, são capazes de ligarem-se. A atividade ATPásica é estimulada e a hidrólise de ATP, acompanhada pela saída de P_i e ADP, provê energia para que as cabeças empurrem o filamento fino, por meio da rotação angular do *lever arm*. Uma nova molécula de ATP liga-se a S_1, provocando a separação entre miosina e actina, começando um novo ciclo de contração. Enquanto isto 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. 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 de volta para o retículo sarcoplasmático, restabelecendo as concentrações características do estado de repouso. Na falta de cálcio, novas ligações de miosina à actina são impedidas; as cabeças de miosina, contendo ATP, desligam-se da actina: instala-se o relaxamento do músculo.

Um decréscimo na concentração de ATP da fibra muscular devido a, por exemplo, consumo excessivo no ciclo de contração/relaxamento ou síntese diminuída na isquemia, tem duas consequências: a Ca^{2+}-ATPase deixa de

manter baixa a concentração de Ca^{2+}no sarcoplasma e a associação da miosina com a actina é promovida; o desligamento das cabeças de miosina da actina não pode ocorrer, porque não há ATP para ligar-se a S_1. O complexo actina-miosina não se desfaz e o relaxamento é impedido, permanecendo o estado de contratura. Esta é a condição de *rigor mortis*, a rigidez muscular extrema verificada após a morte.

A modificação covalente da molécula de miosina regula a contração

A regulação da contração de músculos estriados de vertebrados pelo complexo Ca^{2+}-troponina é modulada por fosforilação das cadeias leves da miosina. Os íons Ca^{2+} também ligam-se à calmodulina e ativam a *quinase das cadeias leves da miosina* (*MLCK*, de ***M****yosin* ***L****ight-****C****hain****K****inase*), dependente do complexo Ca^{2+} • calmodulina. As cadeias leves da miosina são de dois tipos: *MLC1* ou *essencial*, e *MLC2* ou *regulatória* ou "*fosforilável*"; são estas cadeias, como o nome indica, que são fosforiladas pela MLCK. A fosforilação é revertida pela *fosfatase das cadeias leves da miosina*, que guarda semelhança estrutural com a fosfoproteína fosfatase 1 (PP1).

Uma família de MLCKs catalisa a fosforilação Ca^{2+} • calmodulina-dependente de miosinas homólogas, encontradas em músculos estriados, cardíacos e lisos. A fosforilação das cadeias leves pela isoenzima expressa em *músculos lisos* é necessária e suficiente para iniciar a contração (Seção 22.6). Nos músculos estriados e cardíacos, a modificação covalente não interfere na atividade ATPásica da miosina, mas aumenta o deslocamento das cabeças da miosina em direção à actina e a formação das pontes cruzadas. O entendimento sobre o papel da fosforilação das cadeias leves da miosina em músculos esqueléticos humanos é ainda limitado.

Os íons Ca^{2+} também induzem glicogenólise

Os íons Ca^{2+} liberados em resposta a um estímulo nervoso, além de desencadearem a contração muscular, estimulam a degradação de glicogênio e inibem a sua síntese (Seção 20.1). Estes íons ligam-se à fosforilase quinase, tornando-a ativa e desencadeando a glicogenólise, também induzida por adrenalina. No músculo em repouso, menos de 5% da

glicogênio fosforilase é funcional, 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 (Figura 22.7).

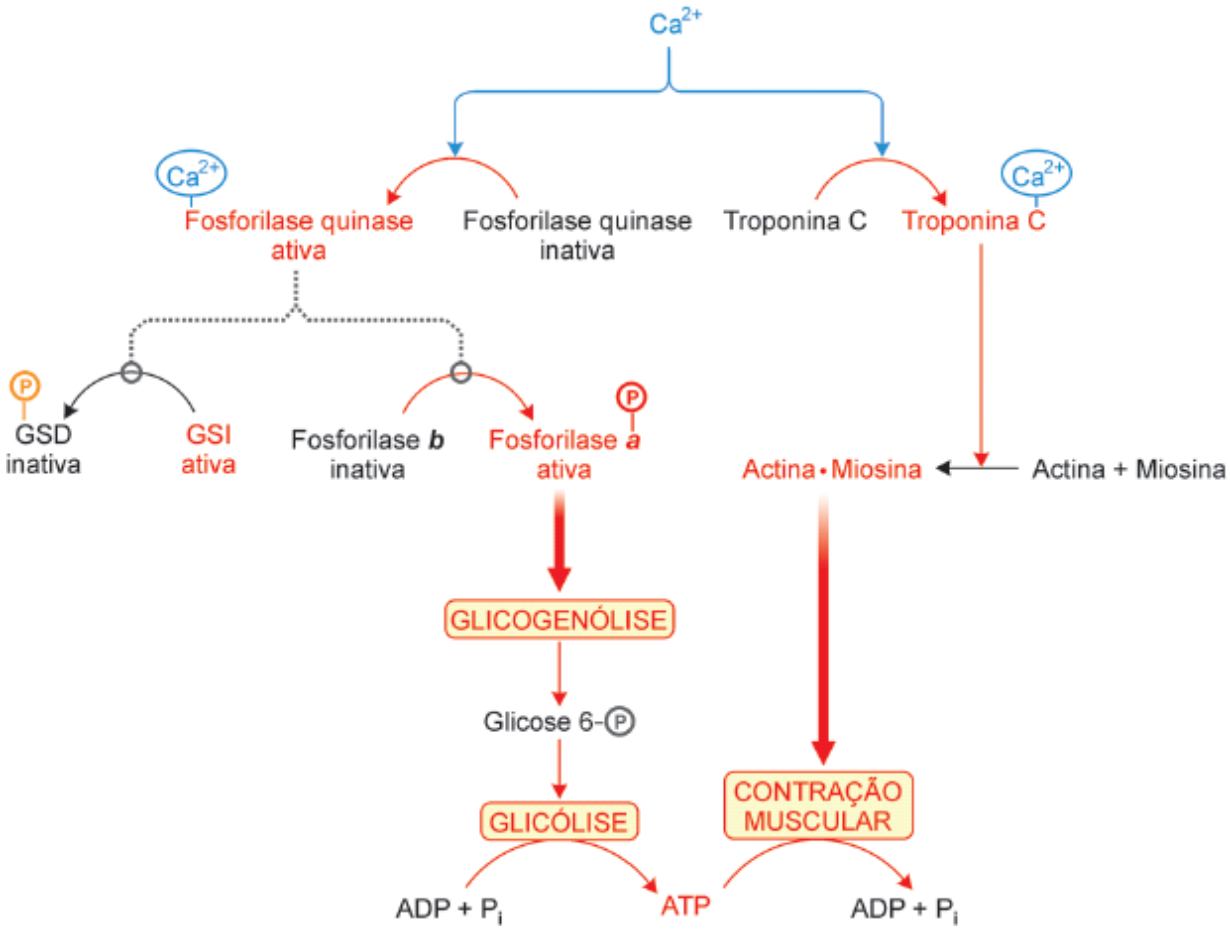


Figura 22.7 Atuação dos íons Ca^{2+}sobre dois aspectos da contração de músculos esqueléticos: o fornecimento de glicose, de cuja oxidação resulta a síntese de ATP e o mecânico, promovido por hidrólise de ATP.

22.4 Fontes de energia para o trabalho muscular: processos anaeróbios e aeróbios

A quantidade de ATP disponível em músculos esqueléticos só é capaz de sustentar 1 a 2 segundos de contração intensa. Um reservatório adicional de energia é constituído por *creatina fosfato*, presente em concentrações 3 a

5 vezes maiores do que as de ATP. A creatina fosfato é produzida nos períodos de repouso, por fosforilação de creatina à custa de ATP, catalisada pela creatina quinase (Figura 22.8). A reação é prontamente reversível e, durante a atividade muscular, processa-se no sentido da regeneração de ATP, para sustentar a contração.

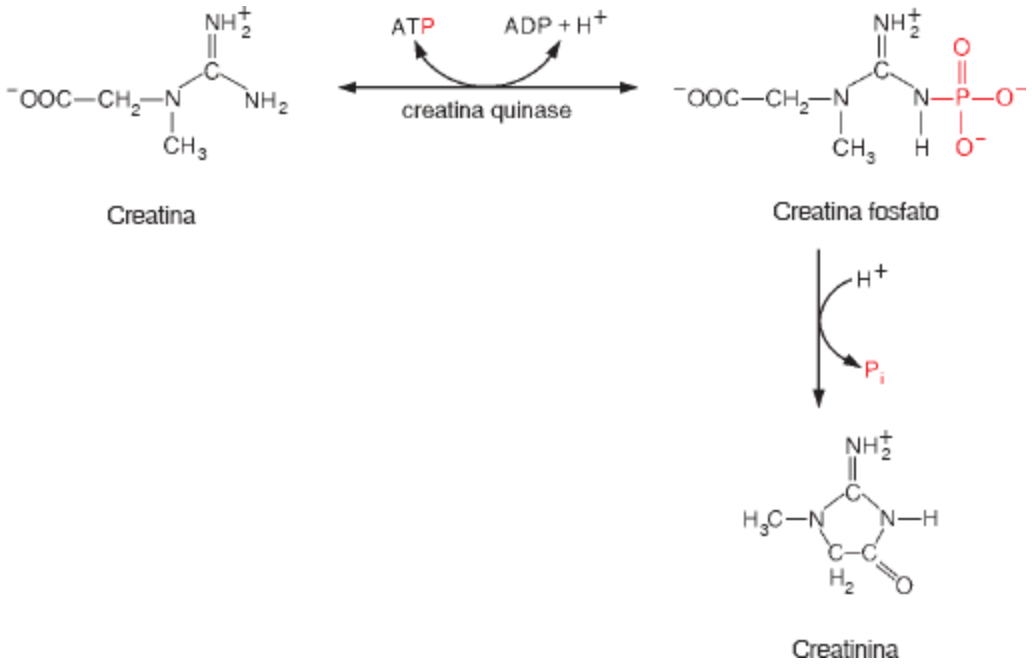


Figura 22.8 A creatina fosfato resulta da transferência de um grupo fosfato do ATP para a creatina. Durante a contração, a reação processa-se no sentido oposto. A creatina fosfato decompõe-se em creatinina, que é excretada na urina.

A creatina é sintetizada a partir de arginina, glicina e S-adenosilmetionina. A creatina fosfato, lenta e espontaneamente, é convertida a *creatinina*, que não tem nenhum destino metabólico, sendo liberada na circulação e eliminada na urina. Como a quantidade excretada por dia em um indivíduo hígido é constante, por ser proporcional à massa muscular, a dosagem de creatinina na urina constitui um indicador sensível da função renal. ATP e creatina fosfato constituem o suprimento imediato de energia para o trabalho muscular, suficiente para esforços máximos e pouco duradouros, de 5 a 8 segundos. Trata-se de 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 peso, 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 a glicose, proveniente da circulação e do glicogênio muscular. No exercício, a entrada do açúcar nas células musculares é promovida pela proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e a degradação do glicogênio, estimulada pela mesma liberação de Ca^{2+} que desencadeia a contração, e ainda por adrenalina e AMP, que têm seus níveis aumentados. A glicose 6-fosfato resultante de fosforilação da glicose sanguínea e da degradação do glicogênio é metabolizada pela glicólise, que também está ativada (Seção 20.2), produzindo ATP para sustentar a contração muscular.

A via glicolítica é inicialmente anaeróbia, com produção de lactato, já que a reserva muscular de oxigênio (ligado 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 um músculo passa do repouso para o exercício intenso, o aporte de oxigênio aumenta 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. A degradação anaeróbia da glicose constitui uma alternativa imediata para a hipóxia relativa no início de um esforço extenuante, mas não pode continuar indefinidamente, sendo capaz de sustentar exercícios intensos com duração de 1 a 2 min. É a fonte principal de energia para corridas de 200, 400 ou 1.000 m rasos, natação de 100 a 200 m, corridas intermitentes (arrancadas) no futebol etc.

À medida que os sistemas respiratório e circulatório são ativados e o suprimento de oxigênio cresce, 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 atividade física se prolonga e a reserva de glicogênio diminui. Acima de 2 a 3 min de esforço vigoroso, o trabalho muscular contínuo é feito, principalmente, à custa de ATP obtido por oxidação aeróbia dos substratos disponíveis (Figura 22.9). Incluem-se

aqui, as corridas de 1.500 m ou mais, ciclismo e esqui competitivos, maratona etc.

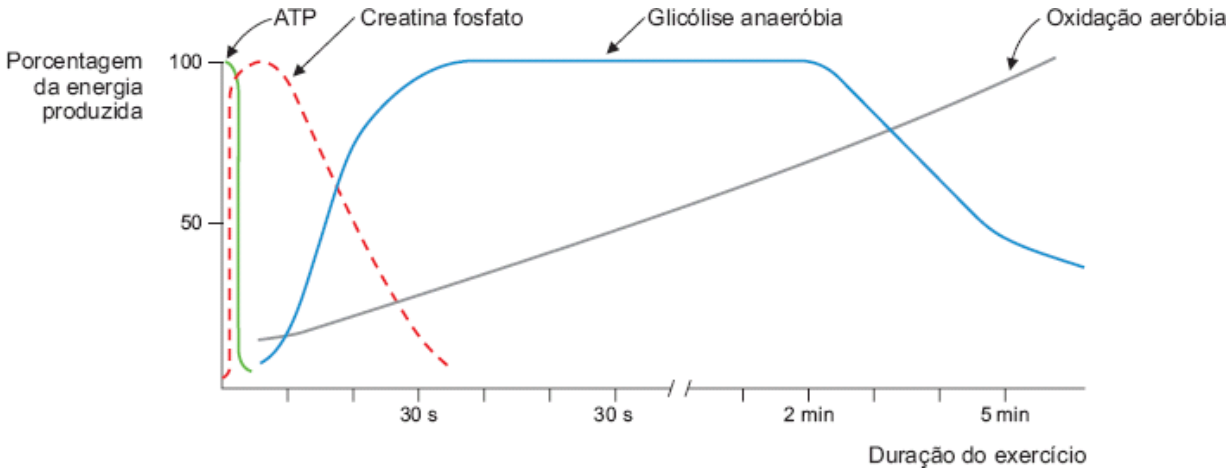


Figura 22.9 Fontes de energia para o trabalho muscular. O gráfico mostra o desempenho dos sistemas geradores de energia, expresso em porcentagem do total de energia que cada sistema é capaz de produzir, durante exercícios extenuantes. A curva de glicólise anaeróbia refere-se à degradação de glicose a lactato e a de oxidação aeróbia, à oxidação total de glicose e ácidos graxos.

Os processos geradores de ATP têm velocidades diferentes

Como a concentração de ATP nos músculos é pequena, o desempenho físico depende da velocidade dos diferentes processos de obtenção de ATP nas fibras musculares, que é proporcional à complexidade do processo acionado para produzi-lo.

O processo mais rápido, composto de uma única reação, é a fosforilação de ADP pela creatina fosfato (Tabela 22.1); a quantidade de ATP conseguido assim é limitada pela concentração pequena de creatina fosfato. A glicólise anaeróbica, apesar de apresentar baixo rendimento (quase 20 vezes menor do que a oxidação aeróbia da glicose), produz ATP com velocidade maior do que as vias aeróbias, por consistir em número muito menor de reações. A obtenção de ATP pela fosforilação oxidativa decorrente da oxidação de ácidos graxos é de todos o processo mais lento, por incluir a mobilização dos triacilgliceróis do tecido adiposo e seu

transporte para a musculatura em contração; por outro lado, o depósito de triacilgliceróis constitui a maior reserva energética do organismo (Tabela 21.2 — Seção 21.1).

Tabela 22.1 Fontes de energia para a contração muscular.

Fontes de ATP	Velocidade máxima de produção de ATP (mmol · s^{-1})
Creatina fosfato	73,3
Glicogênio muscular a lactato: glicólise anaeróbia	39,1
Glicogênio muscular a CO_2 e H_2O: oxidação aeróbia	16,7
Ácidos graxos a CO_2 e H_2O: oxidação aeróbia	6,7

A velocidade alcançada durante uma corrida é uma função direta do sistema gerador de energia acionado. A corrida de 100 metros rasos, percorridos em 10 segundos por atletas de elite, utiliza ATP, creatina fosfato e glicólise anaeróbia, ou seja, os processos anaeróbios, os mais velozes (Tabela 22.2). Essas fontes são insuficientes para corridas mais longas, como a de 1.500 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, o baixo consumo de glicose e a intensa degradação de ácidos graxos compõem um efeito poupador, de modo a manter a glicemia em níveis próximos do normal até o final da maratona. As alterações da concentração de lactato nos músculos de maratonistas são muito pequenas, evidenciando a baixa ocorrência de metabolismo anaeróbio.

Tabela 22.2 Parâmetros de corridas atléticas (valores aproximados).

Distância percorrida (m)	Tempo gasto	Velocidade da corrida (m · s^{-1})

100	10 s	10,0
800	1,7 min	7,9
1.000	2,2 min	7,6
42.200	2 h	5,9

É importante ressaltar que os três sistemas geradores de energia são solicitados na maioria das atividades físicas e o que varia é a contribuição relativa de cada sistema para o total de energia necessária, conforme a *intensidade* e a *duração* do exercício. Atividades de alta intensidade têm de depender da degradação anaeróbia de substratos, porque não há oxigênio suficiente para permitir o metabolismo aeróbio; ainda mais, somente carboidratos podem ser oxidados anaerobiamente. Em outras palavras, a energia para este tipo de exercício é proveniente da degradação anaeróbia de glicose. Por ter baixo rendimento em ATP e velocidade alta, esta via consome o glicogênio muscular, o que restringe a duração de atividades máximas a períodos curtos de tempo. Em exercícios de intensidade moderada, como corrida em baixa velocidade (*jogging*), dança, natação e ciclismo recreacionais etc., cerca de metade da energia origina-se de oxidação aeróbia do glicogênio muscular, e metade daquela de ácidos graxos. Nas atividades de intensidade de moderada a baixa, como o caminhar, as vias aeróbias são as fontes predominantes de energia, com maior proporção da utilização de ácidos graxos, um processo mais lento. A duração da atividade também determina o substrato a serconsumido: quanto maior o tempo despendido no exercício, maior a contribuição dos ácidos graxos para o fornecimento de ATP. Tendo em vista que ácidos graxos não podem ser oxidados na ausência de carboidratos, a preservação do glicogênio muscular é fundamental para o desempenho satisfatório mesmo em atividades prolongadas.

O fornecimento de energia é 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, antes de se exaurir o sistema ATP-creatina fosfato, o que resulta em velocidade menor do que a inicial nos últimos segundos de corrida.

22.5 Tipos de fibras musculares

Os músculos esqueléticos presentes no tronco e membros dos vertebrados são compostos por dois tipos principais de fibras: tipo I (lentas oxidativas) e tipo II (rápidas), que são subdivididas nos tipos IIA (rápidas oxidativas-glicolíticas), **2X** e IIB (rápidas glicolíticas). Existem outros tipos de fibras em grupos musculares da cabeça e do pescoço, com funções especializadas, como os músculos extraoculares e os músculos da mandíbula.

As *fibras tipo I* ou *lentas oxidativas* exibem cor vermelho-escuro devido à grande vascularização e ao alto conteúdo de mioglobina e citocromos, já que são especialmente ricas em mitocôndrias, além de terem diâmetros relativamente menores que maximizam a difusão do oxigênio até as mitocôndrias no interior da célula; naturalmente, têm alta capacidade de oxidar aerobiamente carboidratos e ácidos graxos para gerar ATP.

As *fibras tipo II* ou *rápidas* são mais claras por conterem níveis baixos de mioglobina e poucas mitocôndrias — a expressão de mioglobina e o número de mitocôndrias diminuem desde as fibras IIA, passando pelas IIX, até serem praticamente ausentes nas IIB; o mesmo acontece com o conteúdo de enzimas do metabolismo aeróbio e a resistência à fadiga. Por outro lado, a capacidade de obter energia por glicólise anaeróbia, usando glicose e glicogênio, e a velocidade de contração aumentam das fibras IIA, para as IIX, até as IIB.

Em resumo, como 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 é maior, as fibras tipo I têm contração mais lenta e mais prolongada e são mais resistentes à fadiga do que as do tipo II, que são de movimento mais potente e mais rápido, mas descontinuado, e entram em fadiga rapidamente.

O tipo de fibra muscular é determinado primariamente pela isoforma da *cadeia pesada da miosina* (*MHC*, de ***M**yosin **H**eavy **C**hain*) que é sintetizada. A atividade ATPásica da miosina aumenta da isoforma *MHC-I*, expressa pelas fibras lentas tipo I, para a *MHC-IIa*, presente nas fibras rápidas IIA, seguidas pela *MHC-IIx*, das fibras IIX, até a isoforma *MHC-IIb*, das rápidas IIB, que exibem a maior velocidade de hidrólise de ATP.

Além desses quatro tipos de fibras, ditos puros, existem fibras híbridas, que sintetizam mais de uma isoforma de MHC.

Os músculos esqueléticos dos vertebrados são *músculos mistos*, que expressam diferentes tipos de fibras. Esta heterogeneidade é a razão da flexibilidade dos músculos que permite que o mesmo músculo possa ser utilizado para atividades sustentadas ou rápidas, conforme mude a demanda: de atividades contínuas de baixa intensidade (manutenção da postura), para as repetitivas e de longa duração (locomoção) e as rápidas e de grande força (salto, chute). A maioria dos músculos contém uma mistura dos tipos de fibras em proporções variáveis. As fibras lentas são abundantes em músculos importantes para a manutenção da postura, como os músculos das costas que sustentam a coluna vertebral; as fibras rápidas predominam em músculos que movem pernas e braços. A composição de fibras dos músculos de pequenos mamíferos, como os roedores, é bastante semelhante; nos seres humanos e em outros mamíferos de porte maior, a isoforma MHC-IIb não é expressa.

O mesmo músculo pode apresentar composição variada em diferentes espécies animais, dependendo do modo de sua utilização. Os músculos do voo de aves migradoras, como patos e marrecos, que desempenham movimentos contínuos e prolongados, são constituídos principalmente por fibras lentas, que atribuem à carne do peito uma cor escura. Em aves terrestres, como galinha e peru, os mesmos músculos, utilizados apenas para movimentos breves e rápidos, são ricos em fibras rápidas e a carne do peito é clara. Em contraposição, nos músculos das pernas destas aves a distribuição é oposta: as migradoras têm fibras rápidas e as terrestres, fibras lentas.

O treinamento físico é o principal estímulo de transformação do fenótipo muscular. A adaptação mais evidente ao treinamento de força é a hipertrofia muscular, o aumento do tamanho individual das fibras, embora a hiperplasia também ocorra; o exercício pode converter um tipo de fibra em outro, por induzir alterações no perfil de isoformas de MHC sintetizadas nos músculos exercitados.

A distribuição de fibras lentas e rápidas em músculos esqueléticos de atletas praticantes de diversas modalidades esportivas ilustra com clareza a correlação entre a natureza do trabalho muscular (duração, velocidade e força da contração) e o tipo de fibra prevalecente (Tabela 22.3). Os

exemplos extremos são os músculos de corredores olímpicos de longa distância (maratonistas), com predominância de fibras lentas (60 a 90% de fibras tipo I) e os de corredores de curta distância (*sprinters*) ou de fisiculturistas, ricos em fibras rápidas (60 a 70% dos tipos IIA e IIX).

Tabela 22.3 Distribuição de fibras lentas (tipo I) e rápidas (tipo IIA+IIX) em atletas de diferentes modalidades esportivas.

	Porcentagem média de fibras[1]	
	Rápidas	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

[1]Determinada nos músculos das pernas: *gastrocnemius* (formador da panturrilha) e *vastus lateralis* (componente do *quadriceps femoris*, na porção anterior da coxa).

[2]Futebol, vôlei, basquete, handebol.

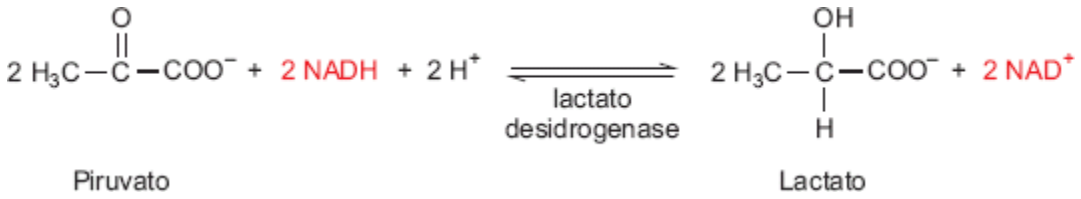
A fadiga muscular ainda não é totalmente compreendida

A fadiga muscular é a incapacidade de manter a contração e instala-se após estimulação repetida de um grupo muscular. As fibras lentas são mais resistentes à fadiga do que as fibras rápidas, provavelmente por conterem mais mitocôndrias e enzimas do metabolismo aeróbio mais eficientes.

Depois de 200 anos de pesquisa, não se conhecem as causas exatas da fadiga. A explicação costumeira de que o acúmulo intracelular de *ácido lático*, que se dissociaria em *lactato* e *prótons*, causaria a disfunção das proteínas contráteis, não se sustenta.

A reação da lactato desidrogenase (Seção 9.1.1) forma lactato e ***não*** ácido lático. Nesta reação:

1) o NADH é oxidado, permitindo que a glicólise possa prosseguir em condições de anaerobiose relativa, formando ATP;
2) o piruvato recebe dois elétrons e um próton do NADH, e um próton do meio, reduzindo-se a lactato:



O lactato é transportado através do sarcolema das fibras musculares pelo *transportador de monocarboxilatos* (*MCT* de ***M**onoc **arboxylates** **T**ransporter*), por cotransporte (simporte) com íons H^+. Os prótons, na vigência de atividade muscular extenuante, originam-se da intensa hidrólise de ATP:

$$ATP + H_2O \leftrightharpoons ADP + HPO_4^{2-} + H^+$$

A grande produção de lactato no exercício intenso é benéfica para o músculo porque regenera NAD^+, sustentando a síntese de ATP pela glicólise, e evita a acidose, já que consome prótons e participa de sua remoção do músculo.

*A conclusão é que a produção de lactato **não** causa acidose*. Todavia, livros de Bioquímica e Fisiologia, e artigos publicados em revistas internacionais de prestígio, continuam afirmando que o "ácido lático" causa a acidose, denominada "acidose lática".

Embora seja crença corrente que o lactato é o responsável pela cãibra e sensação de dor subsequentes a exercícios extremos, isto não é verdade. O lactato gerado na glicólise anaeróbia durante o exercício intenso é transportado rapidamente pelo transportador de monocarboxilatos (MCT), associado a prótons, dos músculos para a corrente sanguínea, sendo absorvido pelo fígado e outros tecidos. A concentração de lactato intramuscular volta ao nível basal muito antes (queda de cerca de 80%, 30 minutos após o exercício), que se instale a dor característica na musculatura exercitada em demasia.

Nas corridas de longa distância, as concentrações de lactato e H^+ aumentam muito pouco, já que a maior parte da energia é obtida a partir do metabolismo aeróbio — nos maratonistas, a fadiga instala-se quando há depleção dos estoques de glicogênio; na falta de carboidratos, a oxidação de ácidos graxos fica impossibilitada. Nas corridas atléticas de curta distância, a fadiga não está relacionada com o esgotamento do glicogênio muscular: apenas 35% do glicogênio dos músculos solicitados são consumidos na glicólise anaeróbia.

A atividade física regular induz adaptações fisiológicas importantes

A prática sistemática, mas não a esporádica, de exercícios moderados produz uma série de ajustes favoráveis à saúde e ao bem-estar da população não atlética. A expressão do transportador de monocarboxilatos (MCT) pode ser aumentada com o exercício, elevando a capacidade da extrusão de lactato e prótons dos músculos submetidos à atividade intensa, e o depósito de glicogênio torna-se maior. Há uma melhora importante na capacidade cardiorrespiratória, isto é, aumenta o débito cardíaco (volume de sangue bombeado por minuto), que propicia um fluxo sanguíneo mais eficiente, e a capacidade respiratória (maior eficiência da troca gasosa, por fortalecimento da musculatura torácica). A vascularização muscular aumenta, permitindo maior captação de oxigênio pelas fibras musculares. Nas hemácias, cresce a concentração de 2,3-bisfosfoglicerato, que diminui a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, facilitando sua liberação nos tecidos. Há aumento da síntese das enzimas musculares responsáveis por vias aeróbias degradativas, como as da β-oxidação e do ciclo de Krebs. O conjunto destas adaptações melhora a capacidade de oxidação aeróbia de substratos, principalmente ácidos graxos, contribuindo para a redução do peso corpóreo. A prática regular do exercício resulta em efeitos benéficos, não só para indivíduos obesos, como para portadores de síndrome metabólica, diabetes, doenças cardiovasculares etc.

As suplementações nutricionais não otimizam o desempenho físico

A ingestão 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 genético, treinamento e adequação psicológica. Mesmo para a musculação (a prática de exercícios de força para hipertrofia da massa muscular), uma dieta balanceada contendo 10 a 15% de proteínas de alta qualidade, as de origem animal, fornece a quantidade necessária de aminoácidos. Quanto aos efeitos benéficos da ingestão aumentada de carboidratos ou de lipídios sobre a *performance* atlética, os resultados obtidos são contraditórios. 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 a 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 (Seção 18.2.3). Outro fator a ser considerado no exercício prolongado é a perda de água e eletrólitos pela transpiração, que devem ser repostos adequadamente.

22.6 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 esqueléticos e cardíaco. Os filamentos finos contêm actina e tropomiosina, mas não troponina. Os filamentos grossos apresentam uma isoforma de miosina que exibe, em relação à miosina dos músculos esqueléticos, atividade ATPásica cerca de 10 vezes menor.

Ca^{2+} e cAMP regulam a contração de músculos lisos

A contração dos músculos lisos é desencadeada por íons Ca^{2+}, como acontece com os músculos esqueléticos (Seção 22.3), mas o mecanismo de ação deste íon difere nos dois tipos de músculos. Nos músculos lisos, a contração é iniciada por fosforilação das cadeias leves, dependente de Ca^{2+} · calmodulina; em músculos esqueléticos os íons Ca^{2+} determinam a contração por ligação com a troponina C. A troponina C pode ser considerada uma forma especializada de calmodulina, a qual, por já fazer parte dos filamentos finos, permite um estímulo mais rápido da contração.

A contração de músculos lisos inicia-se com o aumento da concentração de Ca^{2+}no sarcoplasma. Nestes músculos, o retículo sarcoplasmático é rudimentar e o Ca^{2+}tem origem extracelular. Ele entra nas células através de canais presentes no sarcolema, que podem ser abertos por estimulação elétrica, provocada pelo sistema nervoso autônomo, ou hormonal. Quando isto acontece, o Ca^{2+}associa-se à calmodulina, formando o complexo Ca^{2+}· calmodulina, que se liga à *quinase das cadeias leves da miosina* (*MLCK*) que é ativada; a enzima é estritamente dependente do complexo e presente em grandes quantidades. A fosforilação de um único resíduo de serina pela isoenzima expressa em músculos lisos determina a mudança de forma das moléculas de miosina, que passam de helicoidais a filamentosas, e a interação da miosina com a actina torna-se possível. Quando desfosforiladas, as cadeias leves bloqueiam os sítios da actina aos quais se liga a miosina, impedindo a ligação entre elas, desempenhando o mesmo papel que a subunidade TpI da troponina dos músculos esqueléticos, e o músculo permanece em estado de relaxamento. As cadeias leves, uma vez fosforiladas, deixam descobertos os sítios da actina, permitindo a interação miosina-actina: a ATPase da cabeça da miosina é ativada e a contração ocorre (Figura 22.10).

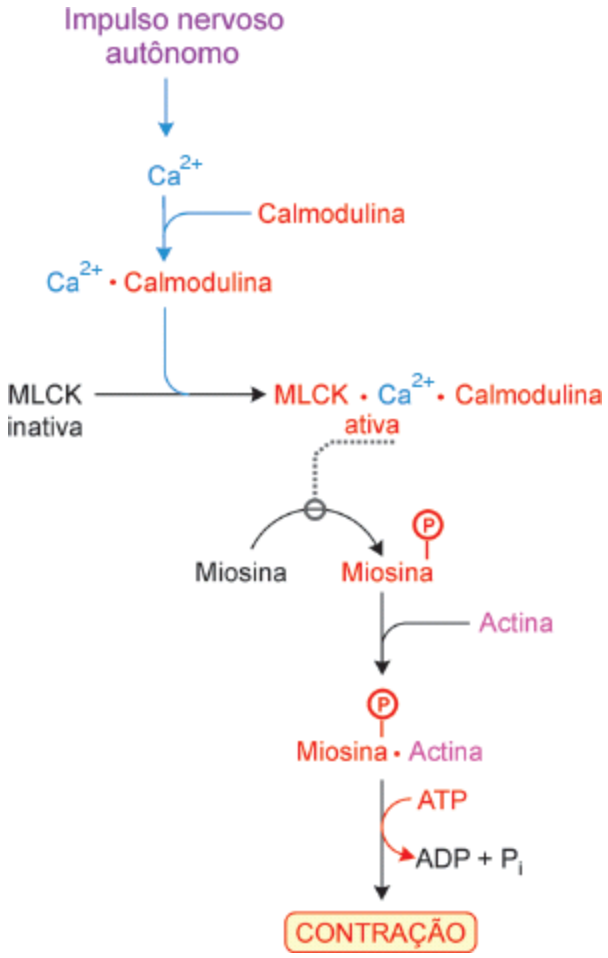


Figura 22.10 A contração de músculos lisos é desencadeada por cálcio, cuja concentração sarcoplasmática aumenta sob estímulo nervoso autônomo: a quinase das cadeias leves da miosina (MLCK) liga-se ao complexo Ca^{2+} · calmodulina e catalisa a fosforilação das cadeias leves da miosina (MLC); a miosina pode, então, interagir com a actina, provocando a contração muscular.

Os níveis basais de cálcio são restabelecidos pela exportação do íon, promovida pela Ca^{2+}-ATPase do sarcolema; o Ca^{2+} dissocia-se da calmodulina, não havendo mais complexo Ca^{2+} · calmodulina para ativar a miosina quinase; a *fosfatase das cadeias leves da miosina* remove os grupos fosfato das cadeias leves, que voltam a inibir a ligação da miosina à actina e a atividade ATPásica; na presença de ATP, as pontes cruzadas são desfeitas e o músculo relaxa.

A contração de músculos lisos também é sujeita a controle hormonal. A adrenalina liga-se a receptores β presentes nas células musculares lisas, induzindo estímulo da adenilato ciclase, aumento da concentração de cAMP e ativação da proteína quinase dependente de cAMP (PKA). Um dos substratos da PKA é a própria quinase das cadeias leves da miosina (MLCK), que, quando fosforilada, tem afinidade muito menor por Ca^{2+} · calmodulina, permanecendo, portanto, inativa (Figura 22.11). A fosforilação das cadeias leves da miosina é interrompida e, consequentemente, a contração, resultando o relaxamento dos músculos lisos.

A inativação da miosina quinase de músculos lisos provocada 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 dispneia. 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 da *nitroglicerina*, utilizada como vasodilatador coronariano na terapia da *angina*, a dor intensa provocada por isquemia do miocárdio. O real agente mediador do relaxamento das fibras musculares lisas da parede dos vasos é o óxido nítrico, um produto do metabolismo da nitroglicerina.

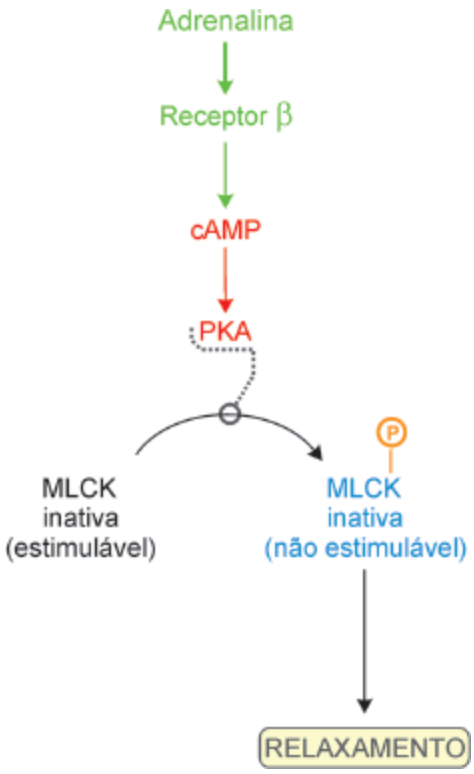


Figura 22.11 A contração de músculos lisos é inibida por adrenalina: a proteína quinase dependente de cAMP (PKA) fosforila a quinase das cadeias leves da miosina (MLCK), que não pode mais ser estimulada pelo complexo Ca^{2+} • calmodulina e permanece inativa. As cadeias leves da miosina (MLC) não são fosforiladas e os músculos lisos relaxam.

O *óxido nítrico* (*NO*) é um radical livre gasoso, com meia-vida de poucos segundos, que atua como mensageiro em vias de transdução de sinal de células de vertebrados e de muitos outros organismos. Apesar de ter sido descrito no final da década de 1980, só recentemente foram identificadas as suas diversas atividades fisiológicas, das quais se destaca a regulação do tônus dos vasos sanguíneos. É sintetizado a partir de arginina no endotélio vascular, em músculos lisos e cardíaco, no sistema nervoso central etc. No caso das células endoteliais, o NO produzido difunde-se até as fibras musculares lisas da parede dos vasos, promovendo o relaxamento muscular e agindo como vasodilatador potente. O mecanismo básico da hipotensão arterial e do estado de choque, frequentemente observados na septicemia, é a indução da síntese de NO provocada por toxinas bacterianas. A hemoglobina exerce uma função adicional àquelas já descritas, que é o

transporte de óxido nítrico: ao ser liberado na circulação periférica, causa vasodilatação, facilitando a transferência de gases entre as células teciduais e o sangue.

Bibliografia

Agarkova I, Perriard JC: The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol* **15** (9): 477-485, 2005.

Allen DG *et al*.: Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. *Physiol Rev* **88**: 287-332, 2008.

Brown GA: Teaching skeletal muscle adaptations to aerobic exercise using an American Physiological Society classic paper by Dr. Philip Gollnick and colleagues. *Advan Physiol Educ* **30** (3): 113-118, 2006.

Casey JR *et al*.: Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11** (1): 50-61, 2010.

Cooke R: The sliding filament model 1972-2004. *J Gen Physiol* **123** (6): 643-656, 2004.

Gordon AM *et al*.: Regulation of contraction in striated muscle. *Physiol Rev* **80** (2): 853-924, 2000.

Huxley HE: Fifty years of muscle and the sliding filament hypothesis. *Eur J Biochem* **271** (8): 1403-1415, 2004.

Kamm KE, Stull JT: Signaling to myosin regulatory light chain in sarcomeres. *J Biol Chem* **286** (12): 9941-9947, 2011.

Metaxas TI *et al*.: Muscle fiber characteristics, satellite cells and soccer performance in young athletes. *J Sports Sci Med* **13** (3): 493-501, 2014.

Schiaffino S, Reggiani C: Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* **91** (4): 1447-1531, 2011.

Sweeney LJ *et al*.: Teaching in the Laboratory. An introductory biology lab that uses enzyme histochemistry to teach students about skeletal muscle fiber types. *Advan Physiol Edu* **28**: 23-28, 2004.

Szent-Gyorgyi AG: The early history of the biochemistry of muscle contraction. *J Gen Physiol* **123** (6): 631-641, 2004.

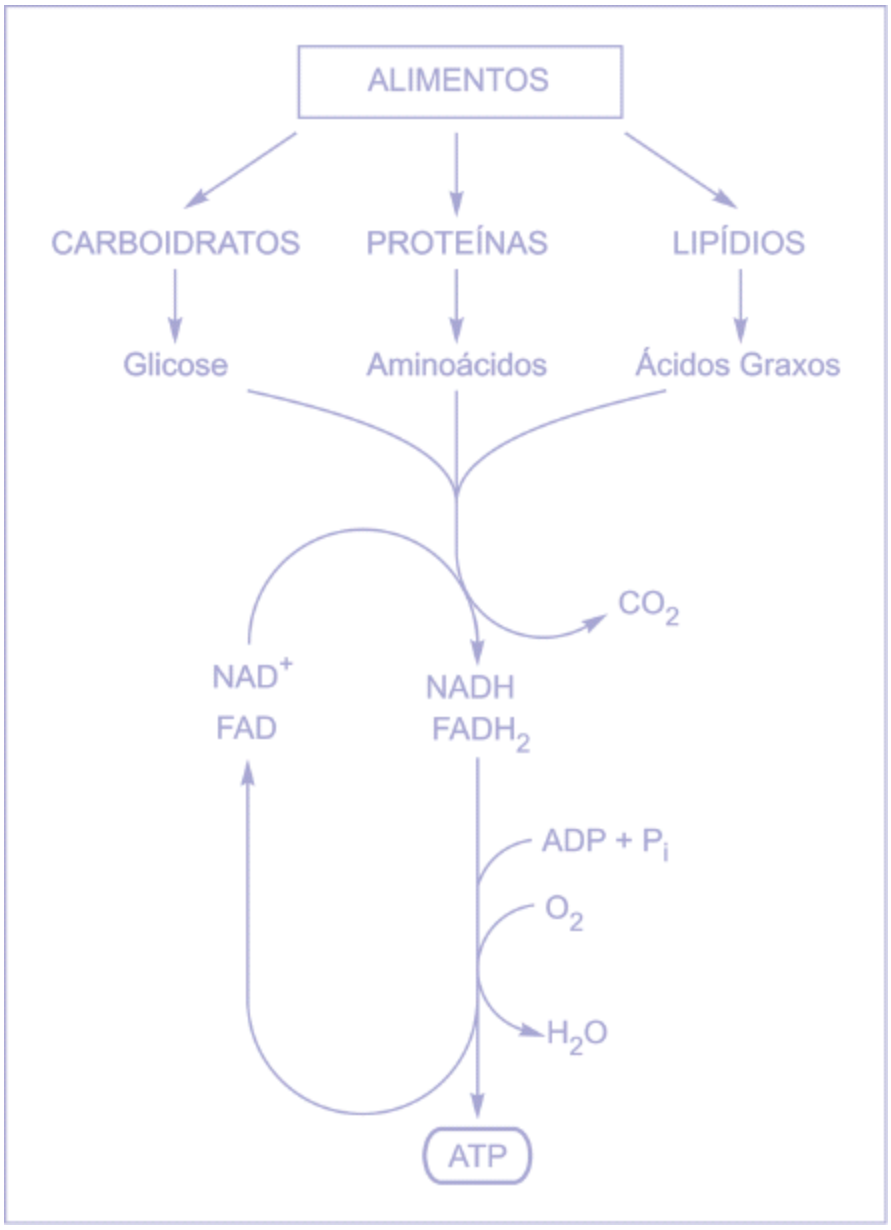
Várkuti BH *et al*.: A novel actin binding site of myosin required for effective muscle contraction. *Nat Struct Mol Biol* **19** (3): 299-306, 2012.

OceanofPDF.com

Parte 5

Estudo do Conteúdo

Objetivos para Estudo
Exercícios e Problemas



OceanofPDF.com

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 seguem uma metodologia participativa, da qual foram abolidas as aulas expositivas, e beneficiam-se muito da subdivisão do conteúdo a ser aprendido em itens, balizando o estudo e contribuindo para o desenvolvimento da sua autonomia de aprendizagem. Os ***Objetivos para Estudo*** 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. Os Objetivos 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 frequente o emprego de termos como: ***definir, caracterizar, descrever, esquematizar, indicar*** etc. Desta 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, 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.

Acreditamos que estes itens possam ser úteis também para os professores que utilizam metodologias convencionais, auxiliando-os na organização de suas aulas.

Capítulo 1 | Sistema-Tampão

1. Definir ácido e base segundo Brönsted.
2. Caracterizar um sistema-tampão e indicar os fatores que determinam a 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 avaliação 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.

Capítulo 2 | Aminoácidos e Proteínas

1. Escrever a fórmula de um aminoácido. Dar exemplos de aminoácidos que apresentam:
   a) um grupo amino e dois grupos carboxílicos;
   b) um grupo carboxílico e dois grupos aminos.
2. Definir ponto isoelétrico (pI) de um aminoácido.
3. Escrever as formas iônicas predominantes da glicina e suas cargas líquidas em pH 1; pH 2,35; pH 7,0; pH 9,78 e pH 12. Calcular o pI.
4. Analisando as cadeias laterais, classificar os aminoácidos em polares e apolares. Entre os polares, citar aqueles que, em pH 7, apresentam o grupo R 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

podem participar dessas ligações. Definir domínios e motivos da estrutura terciária.

10. Definir estrutura quaternária de proteínas globulares. Citar exemplos de proteínas com estrutura quaternária.
11. Indicar como se distribuem os grupos polares e apolares na molécula de uma proteína globular, quando 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 o efeito do pH e da temperatura sobre a estrutura das proteínas.
14. Citar quatro exemplos de proteínas com função não enzimática.

Capítulo 3 | 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 oxigênio.
2. Citar as alterações estruturais provocadas pela ligação do oxigênio à hemoglobina.
3. Definir cooperatividade e indicar o tipo de proteína que exibe 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. Das quatro formas possíveis de hemoglobina — HHb, Hb, $HHbO_2$ e HbO_2 — indicar a que prevalece nas hemácias do sangue que deixa (a) os pulmões e (b) os tecidos. Mostrar o efeito do pH e da pO_2 sobre a conversão de cada uma das formas nas outras, levando em conta a influência da oxigenação e desoxigenação da hemoglobina sobre os valores de pK_a de determinados aminoácidos e o equilíbrio seguinte:

$$HHb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2 + H^+$$

7. Descrever o processo de manutenção do pH do sangue por meio da interação dos sistemas HHb/HbO_2 e CO_2/HCO_3^- nos tecidos e pulmões. Considerar o efeito Bohr e as alterações de pK_a de cadeias laterais da hemoglobina provocadas pela ligação com oxigênio.
8. Comparar a hemoglobina principal de adultos (HbA) e a fetal (HbF) quanto à estrutura e à afinidade por oxigênio.
9. Dar exemplos de hemoglobinas anormais, indicando a alteração que apresentam.

Capítulo 4 | O Sentido das Reações

1. Citar exemplos de processos exergônicos e endergônicos.
2. Os seres vivos podem interferir na termodinâmica de uma transformação ou na velocidade com que ocorre?
3. Definir variação de energia livre (ΔG e $\Delta G'$) e variação de energia livre padrão (ΔG^o e $\Delta G^{o\prime}$).
4. Que convenções são adotadas para relacionar o sentido da reação e o sinal de ΔG?
5. Relacionar o valor de $\Delta G^{o\prime}$ com a constante de equilíbrio da reação.
6. O sentido das reações é indicado pelo sinal de ΔG, $\Delta G'$, ΔG^o ou $\Delta G^{o\prime}$?
7. Definir compostos ricos em energia.
8. Indicar a utilidade do mecanismo de acoplamento de reações.
9. Dar exemplos de reações de oxidação-redução.
10. Definir potencial de redução (E e E′) e potencial de redução padrão (E^oe $E^{o\prime}$).
11. Que convenções são adotadas para atribuir o sinal (+) ou o sinal (–) a um par redox?
12. Indicar o sentido da migração dos elétrons quando se misturam dois pares redox com $E^{\circ\prime}$ diferentes.
13. Nas reações de oxidação-redução, $\Delta G^{o\prime}$ pode ser determinado a partir do $\Delta E^{o\prime}$?

Capítulo 5 | Enzimas

1. Considerando a reação A → B, não catalisada:
   a) fazer o gráfico da concentração de produto formado em função do tempo ([P] × t);
   b) definir velocidade de reação;
   c) fazer o gráfico da velocidade da reação em função do tempo (V × t);
   d) definir tempo inicial de reação;
   e) assinalar nos gráficos de (a) e (c), os tempos iniciais e finais de reação;
   f) 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?
   g) como obter os dados experimentais para fazer o gráfico da velocidade da reação em função da concentração de A?
2. Escrever as reações de formação do produto a partir de enzima (E) e substrato (S). Escrever a equação de velocidade da formação de produto (P).
3. Comparar o efeito da presença de uma enzima e do aumento da temperatura sobre os parâmetros da reação.
4. Alistar as vantagens das enzimas em relação a catalisadores não enzimáticos.
5. Citar exemplos de diferentes graus de especificidade das enzimas.
6. Definir atividade específica de uma enzima e quais as condições adotadas para medi-la.
7. Descrever os procedimentos experimentais que levariam à obtenção dos dados para fazer o gráfico da velocidade da reação S → P, catalisada enzimaticamente, em função da concentração de S.
8. No gráfico do item 7, analisar, em cada trecho da curva, as concentrações de enzima livre, substrato e complexo ES.
9. Definir constante de Michaelis-Menten (K_M) e mostrar a relação entre o seu valor e a afinidade da enzima pelo seu substrato.
10. Descrever a transformação de Lineweaver e Burk e apontar sua utilidade.

11. Fazer o gráfico da velocidade de uma reação enzimática em função de:
    a) concentração de enzima;
    b) temperatura;
    c) pH.

    Justificar a forma dos gráficos. Descrever os procedimentos experimentais que levariam à obtenção desses gráficos.
12. Fazer o gráfico $v_o \times [S]$ para concentrações de enzima [E] e [2E].
13. Definir inibidor competitivo e não competitivo e dar exemplos.
14. Citar exemplos de inibidores competitivos utilizados como agentes terapêuticos.
15. Caracterizar análogos de substratos (antimetabólitos) e indicar os que são empregados como quimioterápicos.
16. Fazer o gráfico $v_o \times [S]$ sem inibidor, na presença de inibidor competitivo e na presença de inibidor não competitivo.
17. Definir k_{cat}. Citar enzimas com valores altos de k_{cat}.
18. Definir cofator. Dar exemplos de cofatores inorgânicos (ativadores metálicos) e orgânicos (coenzimas).
19. Representar o grupo ativo de NAD^+ e de FAD nas formas reduzida e oxidada.
20. Definir vitaminas, relacionando sua função com atividade enzimática.
21. Definir isoenzimas e indicar sua aplicação no diagnóstico de moléstias.

Capítulo 6 | Estrutura de Carboidratos e Lipídios

1. Definir carboidrato, açúcar, monossacarídio e oligossacarídio e dar exemplos.
2. Definir polissacarídio. Citar exemplos de polissacarídios estruturais e de reserva.
3. Descrever as estruturas do amido e do glicogênio.
4. Indicar a extremidade da molécula glicogênio que sofre alongamento ou encurtamento.
5. Quais são os carboidratos mais abundantes da dieta humana?

6. Alistar as funções dos carboidratos.
7. Descrever as seguintes categorias de lipídios: ácidos graxos, triacilgliceróis, glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteroides. Quais dessas categorias podem ser agrupadas como fosfolipídios? E como glicolipídios?
8. Como são identificados os carbonos dos ácidos graxos?
9. Descrever os sistemas de representação da posição das duplas ligações na cadeia carbônica dos ácidos graxos: delta (Δ), ômega (ω), ene (*n*). Mostrar as abreviações utilizadas para o ácido linoleico nos três sistemas.
10. Qual é a configuração geométrica das duplas ligações dos ácidos graxos encontrados na natureza? Definir ácidos graxos *trans* e indicar a sua origem.
11. Descrever as vantagens para os seres vivos do armazenamento de triacilgliceróis em comparação com carboidratos.
12. Correlacionar a consistência das gorduras animais e dos óleos vegetais com a estrutura e as propriedades físicas dos ácidos graxos que contêm.
13. Citar as funções do colesterol.
14. Indicar a porção hidrofílica e a hidrofóbica dos diferentes tipos de lipídios anfipáticos. Mostrar em que fração celular são comumente encontrados os lipídios anfipáticos.
15. Caracterizar as classes principais de lipoproteínas plasmáticas, indicando a sua função.

Capítulo 7 | Membranas

1. Definir micela, bicamada lipídica e lipossomo.
2. Citar os componentes principais das membranas celulares.
3. Analisar a variação de permeabilidade das membranas biológicas.
4. Indicar os fatores que interferem na fluidez das membranas.
5. Descrever o modelo do mosaico fluido, definindo proteínas integradas e proteínas periféricas.
6. Alistar as funções de glicoproteínas e glicolipídios de membrana.
7. Descrever a atuação das permeases.

8. Caracterizar transporte passivo e transporte ativo.
9. Descrever o processo de endocitose adsortiva.

Capítulo 9 | Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA

Os objetivos de números 1 a 10 devem ser respondidos utilizando apenas o mapa da glicólise (Figura 9.5 — Seção 9.1).

1. Quais são os passos irreversíveis da glicólise?
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 oxidação-redução.
5. Verificar os compostos que apresentam ligações do tipo: anidrido fosfórico, anidrido carboxílico-fosfórico, fosfoenol e éster fosfórico.
6. Indicar os compostos ricos em energia.
7. Identificar as reações catalisadas por cada um dos seguintes tipos de enzimas: quinase, mutase, isomerase, aldolase e desidrogenase.
8. 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.
9. Citar os compostos que devem ser fornecidos à via glicolítica para:
   a) iniciá-la;
   b) mantê-la em funcionamento.
10. Indicar a função da via glicolítica.
11. A resposta ao objetivo nº 9 pode ser conseguida a partir da equação geral da glicólise (conversão de glicose a piruvato)? Por quê?
12. Citar as enzimas que catalisam a fosforilação da glicose no fígado e nos tecidos extra-hepáticos.
13. Definir glicólise anaeróbia.
14. Esquematizar as reações da fermentação alcoólica e da fermentação lática que possibilitam a obtenção de NAD^+. Citar exemplos de tecidos ou organismos onde ocorre fermentação lática ou alcoólica.
15. Na reação de formação de acetil-CoA a partir de piruvato, indicar:

a) as 5 coenzimas necessárias;
b) as vitaminas envolvidas;
c) a localização celular.

Capítulo 10 | Ciclo de Krebs

1. Indicar a localização celular do ciclo de Krebs.
2. Na oxidação de acetil-CoA no ciclo de Krebs, indicar as enzimas que catalisam reações onde há produção ou consumo de: CO_2, GTP ou ATP, NADH, $FADH_2$, H_2O.
3. Quais vitaminas participam do ciclo de Krebs?
4. Indicar o composto rico em energia intermediário do ciclo de Krebs e a reação que o produz.
5. 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.
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 efetuador alostérico. Qual a relação desta enzima com a regulação do ciclo de Krebs?
9. Alistar as funções do ciclo de Krebs.
10. Qual é a conversão viabilizada pelo ciclo do glioxilato?
11. Citar os organismos que dispõem do ciclo do glioxilato.
12. Relacionar os objetivos 10 e 11 com a questão levantada na Seção 8.2 sobre quais seriam os macronutrientes imprescindíveis na dieta dos seres humanos.

Capítulo 11 | Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

1. Definir potencial de redução (E) e potencial de redução padrão (E^0).

2. Esquematizar a sequência dos compostos da cadeia de transporte de elétrons, indicando os transportadores de elétrons e os transportadores de prótons e elétrons.
3. Indicar a localização celular da cadeia de transporte de elétrons.
4. Citar três inibidores da cadeia de transporte de elétrons, indicando os transportadores sobre os quais atuam.
5. Verificar se é possível a oxidação de malato e de succinato em presença de rotenona.
6. Qual seria o estado de oxidação (oxidado/reduzido) dos componentes da cadeia de transporte de elétrons em presença de malato e de antimicina A?
7. Definir fosforilação oxidativa.
8. Descrever a hipótese do acoplamento quimiosmótico para a fosforilação oxidativa.
9. Indicar o número de ATP sintetizados para cada NADH e $FADH_2$ oxidados.
10. Definir desacoplador e citar um exemplo.
11. Definir inibidor de fosforilação oxidativa e citar um exemplo.
12. Definir controle respiratório.
13. Descrever os mecanismos de controle respiratório e as condições em que atuam.
14. Citar os fatores que reduzem a eficiência da fosforilação oxidativa.
15. Definir fosforilação no nível do substrato e citar as reações onde ocorre.
16. A membrana interna da mitocôndria é impermeável a ATP e NADH. Mostrar como o:
    a) NADH produzido na via glicolítica pode ser oxidado na cadeia respiratória;
    b) ATP produzido na mitocôndria pode ser utilizado no citosol.

Capítulo 12 | Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato

1. Esquematizar as reações de oxidação-redução da via das pentoses fosfato, citando as enzimas e as coenzimas envolvidas.

2. Qual é o inibidor competitivo das desidrogenases da via das pentoses fosfato?
3. Citar os tipos de enzimas que convertem ribulose em xilulose ou ribose.
4. Definir transaldolase e transcetolase, mostrando a coenzima envolvida. Dar exemplos de reações catalisadas por estas enzimas.
5. Em relação à via das pentoses fosfato, indicar:
   a) a localização celular;
   b) os tecidos onde sua atividade é intensa;
   c) as vitaminas participantes.
6. Descrever a atividade da via das pentoses fosfato em função das relações ATP/ADP e NADPH/$NADP^+$.
7. Mostrar a importância biológica da via das pentoses.
8. Dar exemplos de compostos que apresentam ribose na sua molécula.
9. Descrever o sistema antioxidante que envolve a participação de NADPH e glutationa.
10. Citar a(s) consequência(s) da deficiência hereditária de glicose 6-fosfato desidrogenase.

Capítulo 13 | Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose

1. Esquematizar a reação de degradação do glicogênio a glicose 1-fosfato, indicando a enzima participante.
2. Esquematizar a reação responsável pela desramificação do glicogênio e citar a enzima envolvida.
3. Esquematizar as reações de conversão de glicose 1-fosfato a glicose. Citar o órgão onde essas reações ocorrem.
4. Esquematizar as reações de síntese de glicogênio a partir de glicose. Analisar o consumo de energia do processo.
5. Definir glicogenina e indicar o seu papel na síntese de glicogênio.
6. Comparar a via de síntese do amido com a do glicogênio.
7. Quais são os monossacarídios derivados da hidrólise de sacarose e lactose no intestino delgado? Como eles são metabolizados?

Capítulo 14 | Gliconeogênese

1. Definir gliconeogênese e citar exemplos de compostos gliconeogênicos; citar os tecidos onde a via ocorre. Analisar o balanço energético da gliconeogênese.
2. Indicar a localização celular das enzimas da via glicolítica e da gliconeogênese.
3. Comparar as três reações irreversíveis da glicólise com as reações da gliconeogênese que as substituem, quanto a reagentes, produtos, enzimas e coenzimas.
4. Citar as vitaminas necessárias para as seguintes conversões:
   a) Glicose → Lactato
   b) Lactato → Glicose
5. Escrever a equação geral da conversão lactato → glicose.

Capítulo 15 | Fotossíntese

1. Diferenciar seres fototróficos, quimiotróficos, autotróficos e organotróficos.
2. Definir fotossíntese e compará-la com a oxidação aeróbia da glicose.
3. Descrever a estrutura do cloroplasto.
4. Citar os principais tipos de pigmentos fotossintéticos.
5. Definir fotossistema e indicar os componentes que absorvem e propagam a energia luminosa.
6. Caracterizar o fotossistema I (PSI) e o fotossistema II (PSII).
7. Citar os compostos que ficam reduzidos ou oxidados como consequência da absorção de luz por PSI e PSII.
8. Mostrar o caminho dos elétrons emitidos por PSI e PSII.
9. Citar o composto que reduz P680 e indicar um produto importante da sua oxidação.
10. Escrever a equação geral de oxidação-redução da fase clara da fotossíntese.
11. Comparar o transporte de elétrons na membrana tilacoide com o transporte de elétrons na membrana interna da mitocôndria quanto:
    a) à orientação dos transportadores de elétrons;

b) à permeabilidade das membranas a prótons;
c) ao destino da energia de oxidação-redução derivada do transporte de elétrons;
d) ao sentido do bombeamento de prótons;
e) ao mecanismo de síntese de ATP.

12. Definir fotofosforilação e fotofosforilação cíclica; indicar as condições celulares em que cada um destes processos ocorre.
13. Mostrar as diferenças genéricas entre a fotossíntese bacteriana e a fotossíntese de algas e plantas.
14. Esquematizar a reação de carboxilação catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco).
15. Escrever as reações que convertem 3-fosfoglicerato a gliceraldeído 3-fosfato.
16. Além das enzimas típicas do ciclo de Calvin, enzimas comuns a que outras vias participam do ciclo?
17. Escrever a equação geral do ciclo de Calvin.
18. Descrever a regulação do ciclo de Calvin.
19. Escrever a reação catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase quando a enzima exibe atividade de oxigenase.
20. Citar os fatores que determinam a predominância de uma das atividades da ribulose 1,5- bisfosfato carboxilase/oxigenase.
21. Definir fotorrespiração e analisar o significado biológico desta via.
22. Distinguir plantas C_3 de plantas C_4.
23. Esquematizar as reações que permitem manter altas concentrações de CO_2 nos cloroplastos de plantas C_4.
24. Comparar a afinidade por CO_2 das enzimas: fosfoenolpiruvato carboxilase e rubisco.
25. Indicar as vantagens adaptativas decorrentes do esquema de fixação de CO_2 das plantas C_4.

Capítulo 16 | Metabolismo de Lipídios

1. Esquematizar as reações de hidrólise de triacilgliceróis nos adipócitos e indicar as enzimas envolvidas.

2. Esquematizar as reações de conversão de glicerol a compostos intermediários da via glicolítica.
3. Esquematizar a primeira reação necessária para a degradação de um ácido graxo (ativação).
4. Citar a localização celular do ciclo de Lynen e mostrar o papel da carnitina.
5. Citar os compostos formados no final de cada volta do ciclo de Lynen.
6. Indicar o número de moléculas de ATP necessárias para degradar uma molécula de ácido graxo.
7. Listar as vitaminas que participam da β-oxidação.
8. Escrever a equação geral da oxidação de ácido esteárico (18 carbonos) a acetil-CoA.
9. Resumir as transformações adicionais às do ciclo de Lynen que permitem oxidar ácidos graxos de número ímpar de carbonos, insaturados, ramificados e hidroxilados.
10. Comparar a β-oxidação mitocondrial com a β-oxidação peroxissômica; indicar em que organismos esta última via ocorre.
11. Quais são as alterações metabólicas características de doenças hereditárias peroxissômicas?
12. Indicar os tecidos que não oxidam ácidos graxos.
13. Alistar os corpos cetônicos e indicar o órgão onde são sintetizados.
14. Esquematizar as reações que levam à produção de corpos cetônicos.
15. Esquematizar as reações que permitem o aproveitamento dos corpos cetônicos. Citar os tecidos onde ocorrem essas reações.
16. Quais são as adaptações metabólicas que ocorrem no cérebro e permitem a oxidação de corpos cetônicos?
17. Citar as consequências da produção excessiva de corpos cetônicos.
18. Esquematizar as reações que permitem a oxidação de etanol a acetil-CoA.
19. Fazer um resumo da via minoritária de oxidação de etanol induzida pelo alcoolismo crônico.
20. Listar os compostos que têm seu nível aumentado com o consumo de etanol e as consequências metabólicas dessas alterações.
21. Quais são os principais precursores de ácidos graxos nos seres humanos?

22. Indicar a localização celular da biossíntese de ácidos graxos e os principais tecidos onde essa via ocorre.
23. Relacionar o nível de citrato com o nível de ATP na mitocôndria e citar os efeitos do citrato no citosol.
24. Esquematizar as reações que permitem a transferência de acetil-CoA da mitocôndria para o citosol, mostrando a regeneração do oxaloacetato mitocondrial.
25. Escrever a reação catalisada pela acetil-CoA carboxilase e citar as coenzimas envolvidas.
26. Caracterizar a sintase de ácidos graxos, alistando as proteínas dela componentes.
27. Definir ACP e comparar sua função com a da coenzima A.
28. Indicar as reações que levam à formação de um ácido graxo a partir de acetil-CoA e malonil-CoA pela sintase de ácidos graxos.
29. Citar o agente redutor na biossíntese de ácidos graxos e as suas fontes.
30. Comparar a estrutura da sintase de ácidos graxos presente em bactérias, plantas e animais.
31. Indicar as reações que levam à síntese de triacilgliceróis.
32. Esquematizar a via de síntese de glicerol 3-fosfato, precursor de triacilgliceróis.
33. As dessaturases de mamíferos não catalisam a síntese de insaturações em determinadas posições. Quais são?
34. Definir ácido graxo essencial. Indicar os ácidos graxos essenciais para os mamíferos; citar os ácidos graxos de cadeia longa das famílias ω-3 e/ou ω-6 sintetizados a partir dos essenciais.
35. Definir eicosanoides; indicar quatro grupos de eicosanoides.
36. Citar os principais ácidos graxos precursores de eicosanoides.
37. Mostrar o mecanismo de ação de agentes anti-inflamatórios esteroídicos e não esteroídicos.
38. Indicar as fontes de colesterol para o organismo humano.
39. Citar o precursor básico e as coenzimas necessárias para a síntese de colesterol.
40. Esquematizar a reação catalisada pela HMG-CoA redutase.
41. Dar exemplos de compostos derivados do colesterol.
42. Qual é a via de excreção de colesterol?

Capítulo 17 | Metabolismo de Aminoácidos

1. Definir meia-vida de uma proteína.
2. Em relação ao conjunto de aminoácidos presentes nas células dos mamíferos, indicar:
   a) suas procedências;
   b) seus destinos metabólicos;
   c) se existe uma reserva de aminoácidos ou proteínas.
3. Descrever os principais processos de degradação intracelular de proteínas.
4. Esquematizar as reações catalisadas pelas enzimas: aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Citar a coenzima que participa das reações e a vitamina presente na sua estrutura.
5. Esquematizar a reação catalisada pela glutamato desidrogenase.
6. Mostrar a importância da atuação conjunta das aminotransferases e da glutamato desidrogenase na degradação dos aminoácidos.
7. Citar o principal produto de excreção de nitrogênio no homem.
8. Esquematizar a reação de formação de carbamoil-fosfato catalisada por carbamoil-fosfato sintetase.
9. No ciclo da ureia indicar:
   a) a procedência dos átomos de nitrogênio da molécula de ureia;
   b) o saldo de ATP considerando a regeneração de aspartato a partir de fumarato;
   c) o aminoácido proteico sintetizado.
10. Citar o órgão responsável pela produção de ureia.
11. Indicar as condições em que há aumento da quantidade de ureia excretada por um indivíduo sadio.
12. A amônia é um composto tóxico para o organismo animal. Mostrar como a amônia produzida nos tecidos extra-hepáticos é transportada para o fígado.
13. Verificar o destino dos esqueletos de carbono dos aminoácidos em seu catabolismo e indicar aqueles que podem originar glicose.
14. Citar as doenças genéticas provenientes de alterações do metabolismo da tirosina e fenilalanina.
15. Descrever o caminho do nitrogênio desde a atmosfera até ser incorporado nos aminoácidos das células animais.

16. Definir fixação de nitrogênio e indicar os organismos em que ocorre.
17. Definir aminoácido essencial e citar os aminoácidos essenciais para o organismo humano.

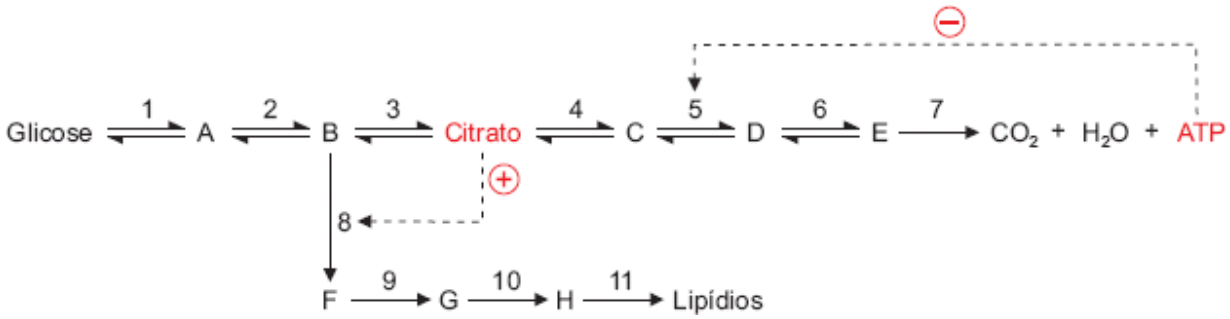
Capítulo 18 | Nutrição — Os Substratos das Vias Metabólicas

1. Listar as razões que tornam obrigatória a ingestão de proteínas.
2. Definir balanço de nitrogênio. Citar as condições que levam a um balanço positivo ou negativo de nitrogênio.
3. Indicar as propriedades de uma proteína que determinam o seu valor nutricional.
4. Comparar a qualidade nutricional de proteínas de origem animal com a de origem vegetal.
5. Indicar as doses mínimas de proteína recomendadas para indivíduos adultos de países em desenvolvimento. Por que são maiores do que aquelas de países desenvolvidos?
6. Qual deve ser a proporção de carboidratos, lipídios e proteínas em uma dieta adequada?
7. Citar o principal fator que interfere no teor das necessidades energéticas.
8. Definir fibra dietética, indicando os tipos principais. Avaliar os efeitos benéficos e adversos da sua ingestão.
9. Descrever as consequências de um balanço energético negativo e de um balanço energético positivo.
10. Definir Índice de Massa Corporal (IMC).
11. Indicar as doenças associadas à obesidade.
12. Quais são as causas da obesidade? Quais componentes da dieta devem ter sua ingestão reduzida para o tratamento da obesidade?
13. Definir leptina e indicar o seu modo de ação.
14. Justificar a necessidade de ingerir uma quantidade mínima de carboidratos.
15. Citar o tipo de lipídio mais abundante dos alimentos.
16. Comparar o valor nutricional de lipídios de origem vegetal com o valor daqueles de origem animal.

17. Alistar alimentos ricos em ácidos graxos das famílias ω-3 ou ω-6.
18. Mostrar as deficiências do conteúdo proteico, lipídico e vitamínico de dietas vegetarianas. Como os ruminantes conseguem sobreviver ingerindo apenas vegetais?
19. Citar a principal fonte dietética de ácidos graxos *trans*. Por que sua ingestão não é recomendada?
20. Mostrar a relação entre os lipídios presentes na dieta e os níveis plasmáticos de LDL-colesterol e HDL-colesterol.
21. Resumir as funções das vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis.
22. Descrever algumas funções dos nutrientes minerais.
23. Caracterizar as síndromes de desnutrição mais comuns. Qual é a causa primária da ocorrência de desnutrição?

Capítulo 19 | Estratégias de Regulação do Metabolismo

1. Listar os mecanismos principais de regulação da atividade enzimática.
2. Caracterizar enzima alostérica. Definir centro alostérico e efetuador alostérico, positivo e negativo.
3. Fazer o gráfico $v_o \times [S]$ de uma reação catalisada por uma enzima alostérica, sem efetuador, na presença de efetuador positivo e de efetuador negativo.
4. A fosfofrutoquinase pode ser inibida alostericamente por ATP, que é a própria coenzima da reação. Explicar este aparente paradoxo.
5. Definir regulação enzimática por modificação covalente. Esquematizar as reações catalisadas por proteína quinases e proteína fosfatases.
6. A glicose pode ser utilizada como fonte de energia (ATP) ou ser convertida em lipídios, como mostra o esquema seguinte, no qual as enzimas 5 e 8 são alostéricas.



Indicar qual é a via metabólica preferencial do composto B quando a disponibilidade de glicose é:

a) pequena.
b) grande.
c) Identificar as enzimas 5 e 8.

7. Definir transdução de sinal.
8. Descrever os receptores hepta-helicoidais.
9. Definir hormônios e células-alvo.
10. Indicar os principais modos pelos quais os hormônios modulam a velocidade das reações metabólicas.
11. Alistar os diferentes tipos de receptores hormonais.
12. Definir via de transdução de sinal hormonal.
13. Definir proteínas G e segundo mensageiro. Citar exemplos de segundos mensageiros.
14. Esquematizar as reações catalisadas por adenilato ciclase e fosfodiesterase de cAMP.
15. Descrever a via de transdução de sinal de hormônios que estimulam a adenilato ciclase. Comparar com a via de sinalização de hormônios que inibem a enzima.
16. Citar o mecanismo de ação da toxina da cólera, cafeína e teofilina.
17. Mostrar como a proteína quinase dependente de cAMP ou proteína quinase A (PKA) é ativada por cAMP.
18. Quais as consequências da ação da PKA sobre a atividade de seus substratos?
19. Citar exemplos de hormônios que estimulam a via da PKA.
20. Indicar os substratos e os produtos da reação catalisada pela proteína quinase A (PKA) e pela fosfoproteína fosfatase (PP1).
21. Descrever a regulação da PP1, mostrando o envolvimento da PKA.

22. Resumir os efeitos da adrenalina, glucagon e insulina sobre a atividade da PKA e PP1.
23. Descrever a via do fosfatidilinositol bisfosfato (via da fosfolipase C) e citar exemplos de hormônios que a estimulam.
24. Definir calmodulina e dar exemplos de enzimas reguladas pelo complexo Ca^{2+} · calmodulina.
25. Descrever as vias de transdução de sinais externos (visão e olfato).
26. Citar as situações que desencadeiam a liberação de adrenalina e resumir os seus efeitos principais.
27. Diferenciar os receptores de adrenalina e as vias de transdução de sinal acionadas por sua ligação com o hormônio. Citar o mecanismo de ação da toxina da coqueluche.
28. Indicar as ações metabólicas do cortisol.
29. Citar as situações que desencadeiam a liberação de glucagon ou de insulina. Comparar os efeitos metabólicos dos dois hormônios.
30. Descrever o receptor de insulina e mostrar suas alterações após a ligação com insulina.
31. Caracterizar os principais transportadores de glicose (GLUT).
32. Mostrar a atuação da insulina sobre o transporte de glicose e os tecidos em que ocorre.
33. Descrever a via da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Quais são os principais processos modulados pela proteína quinase B (PKB ou Akt)?
34. Resumir as ações da insulina que determinam a desfosforilação de proteínas.
35. Qual o efeito da insulina no cérebro?
36. Indicar os processos regulados pela proteína quinase dependente de AMP (AMPK) e em que condições ela é estimulada.

Capítulo 20 | Regulação das Vias Metabólicas Principais

1. Indicar os substratos e os produtos da reação catalisada pela glicogênio fosforilase quinase.
2. Mostrar a relação de cAMP (AMP cíclico) e de íons Ca^{2+} com a degradação do glicogênio.

3. Citar os hormônios que estimulam ou inibem a degradação de glicogênio no fígado e no músculo e mostrar seu modo de ação.
4. Descrever a ação da insulina no fígado e músculo quanto à:
   a) permeabilidade da célula à glicose;
   b) síntese de glicogênio;
   c) síntese de glicoquinase.
5. Citar as funções do glicogênio hepático e do glicogênio muscular.
6. Esquematizar as reações catalisadas pela 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase, a enzima bifuncional.
7. Comparar a regulação da enzima bifuncional de fígado com a de músculo cardíaco.
8. Resumir as regulações alostéricas e por modificação covalente, mediada por hormônios, que incidem sobre os três principais sítios de controle da glicólise e gliconeogênese. Indicar as vias de transdução de sinal hormonal acionadas nos eventos de fosforilação/desfosforilação das enzimas.
9. Citar as enzimas da glicólise e gliconeogênese que têm sua concentração alterada por ação hormonal, indicando o hormônio que atua em cada caso.
10. Descrever a regulação alostérica e por modificação covalente, mediada por hormônios, do complexo piruvato desidrogenase. Analisar sua atividade no jejum, exercício, período pós-prandial e no estado diabético.
11. Descrever o controle da β-oxidação.
12. Qual o papel regulador da malonil-CoA na degradação de ácidos graxos?
13. Descrever a regulação alostérica e por modificação covalente, mediada por ação hormonal, da síntese de ácidos graxos.
14. Descrever as ações de glucagon, adrenalina e insulina no metabolismo de triacilgliceróis.
15. Descrever a atuação dos diferentes tipos de lipoproteínas plasmáticas no transporte de colesterol.
16. Descrever os mecanismos de controle da concentração do colesterol.
17. Definir aterosclerose.
18. Mostrar a influência da composição de lipídios da dieta sobre os níveis plasmáticos de colesterol.

19. Citar as etapas do metabolismo do colesterol que constituem alvos para intervenções farmacológicas e citar exemplos.
20. Descrever a regulação alostérica da carbamoil-fosfato sintetase.
21. Descrever a atuação de glucagon, cortisol e insulina sobre o metabolismo de aminoácidos e proteínas.
22. Citar as vias de produção e de utilização de acetil-CoA pela célula.

Capítulo 21 | Regulação Integrada do Metabolismo

1. Mostrar como a oferta de nutrientes interfere na concentração e na atividade das enzimas.
2. Citar as vias de produção e de utilização de acetil-CoA pela célula.
3. Fazer um resumo do controle alostérico e hormonal (efeitos de glucagon, adrenalina e insulina) no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas no fígado, músculos esqueléticos e tecido adiposo nos períodos absortivo, pós-absortivo e no jejum prolongado.
4. Definir *diabetes mellitus* e caracterizar diabetes tipo 1 e 2.
5. Definir *Síndrome Metabólica* ou *Síndrome X*.
6. Descrever as alterações do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas verificadas no jejum prolongado e no diabetes tipo 1 não tratado.
7. Qual a utilidade da dosagem plasmática de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})?
8. Listar os diferentes tipos de insulina disponíveis.
9. Citar os procedimentos terapêuticos empregados para o controle do diabetes tipo 1 e tipo 2.

Capítulo 22 | Contração Muscular

Os objetivos de números 1 a 15 referem-se a músculos esqueléticos.

1. Mostrar a disposição dos filamentos grossos e dos filamentos finos nas miofibrilas.
2. Definir sarcômero. Qual a função dos discos Z e M?
3. Em relação aos filamentos grossos:

a) descrever a estrutura da molécula de miosina;
b) mostrar o modo de associação das moléculas de miosina;
c) definir pontes cruzadas.

4. Descrever a estrutura dos filamentos finos e indicar a que se liga cada uma das subunidades da troponina.
5. Fazer um resumo das etapas de formação/dissociação do complexo actina · miosina, previstas pela hipótese do “braço-alavanca” (*lever arm*). Indicar a etapa em que ocorre o evento de geração de força (deslocamento) e a etapa regulada por íons Ca^{2+}.
6. Descrever as alterações intracelulares determinadas pela chegada do impulso nervoso.
7. Descrever o evento que inicia a contração da miofibrila e as etapas subsequentes (ciclo de contração). Comparar a posição relativa das proteínas reguladoras na molécula de actina no músculo relaxado com sua posição após ligação de íons Ca^{2+} à subunidade TnC da troponina. Quais as consequências da nova conformação?
8. Mostrar a mudança da posição relativa dos filamentos grossos e finos durante a contração e o efeito sobre o comprimento dos sarcômeros e, portanto, da fibra muscular.
9. Citar a sequência de eventos que restabelecem as condições do músculo em repouso. Em que condições o relaxamento do músculo não ocorre?
10. Caracterizar os processos anaeróbios e aeróbios de síntese de ATP para a contração muscular, comparando as suas velocidades. Dar exemplos de atividades físicas sustentadas principalmente por cada um destes sistemas.
11. Mostrar como os íons Ca^{2+} aumentam a disponibilidade de ATP para as fibras musculares.
12. Definir fadiga muscular e citar suas causas prováveis em exercícios extenuantes de curta duração (*sprint*) e em exercícios prolongados (maratona).
13. Diferenciar fibras rápidas de fibras lentas, estrutural e funcionalmente; indicar os fatores que determinam o tipo de fibra muscular.
14. Analisar a distribuição de fibras lentas e rápidas em músculos de atletas praticantes de modalidades esportivas diferentes.

15. Resumir os benefícios da prática sistemática de atividade física moderada para a população não atlética.
16. Comparar a estrutura de músculos lisos com a estrutura de músculos estriados.
17. Indicar as diferenças entre as isoformas de miosina dos dois tipos de músculos.
18. Citar os estímulos que desencadeiam a liberação de íons Ca^{2+} e a contração de músculos lisos; comparar a origem dos íons Ca^{2+} em músculos lisos e estriados.
19. Citar os substratos e produtos da reação catalisada pela quinase das cadeias leves da miosina (MLCK).
20. Descrever a regulação da atividade da MLCK por cálcio; comparar o papel do cálcio na contração de músculos lisos e estriados.
21. Resumir o efeito da adrenalina sobre a contração de músculos lisos. Este efeito constitui a base terapêutica de que distúrbios?
22. Definir óxido nítrico (NO) e citar suas atividades fisiológicas.

OceanofPDF.com

Exercícios e Problemas

Capítulo 1 | Sistema-tampão

Os valores de pK_a necessários à resolução dos problemas estão na Tabela 1.1

1. 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 estão apresentados nas tabelas seguintes.

	pH inicial	pH final
H_2O	2	7,5
NaCl	2	7,5
Ácido acético	2	4,5
Metilamina	2	7,5

	pH inicial	pH final
H_2O	9	11,5
NaCl	9	11,5
Ácido acético	9	11,5

Metilamina	9	9,5

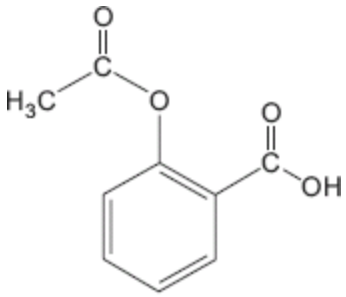
a) Comparar o comportamento das soluções frente à adição de álcali.
b) Qual seria a variação de pH esperada no caso de ser adicionado HCl às mesmas soluções?

2. Determinar o pH de uma solução 0,1 M de um ácido fraco ($K_a = 10^{-5}$M) quando em:
   a) solução aquosa;
   b) 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).
3. 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.
4. 1 mL de soluções 1 M de três ácidos — HA, HB e HC — foi adicionado a 99 mL de água destilada; o pH das soluções resultantes foi, respectivamente, 3, 5 e 6. A seguir, adicionou-se a cada uma das três soluções um mesmo volume de NaOH e mediu-se novamente o pH, tendo sido encontrado pH = 9 em todas. Explicar a diferença de valores de pH observada depois da:
   a) diluição dos ácidos em água;
   b) adição de NaOH.
5. A pepsina é uma protease que tem atividade maior em valores de pH entre 1 e 2; ela ocorre no estômago, onde os baixos valores de pH são mantidos à custa da secreção de HCl pela mucosa gástrica. Um indivíduo ingeriu, junto com a refeição, um volume significativo de uma solução de bicarbonato, base conjugada do ácido carbônico. A ação digestiva da pepsina será alterada pela ingestão do bicarbonato?
6. Uma solução de ácido acético foi ajustada a pH = 3 por adição de HCl e, a seguir, titulada com NaOH até pH = 12. Uma solução de metilamina foi submetida ao mesmo procedimento.
   a) Construir as curvas aproximadas destas titulações, estabelecendo valores de pH em ordenadas e volumes adicionados de NaOH em abscissas.

b) Que forma molecular do ácido acético predomina em cada região da curva? E da metilamina?

c) Construir uma curva aproximada da titulação de uma mistura de ácido acético e metilamina.

7. A aspirina (ácido acetilsalicílico) tem pK_a3,5. A velocidade de sua absorção através da membrana plasmática é dependente da polaridade da molécula. A aspirina é mais bem absorvida no estômago (pH do suco gástrico = 1,5) ou no intestino delgado (pH = 6)?



Aspirina

8. Uma reação produz 0,01 mol de H^+. Calcular o pH final da solução quando esta reação se processa em 1 L de

a) H_2O;

b) uma solução 0,11 M de histidina com pH 7,04.

9. Comparar a eficiência dos seguintes tampões:

a) acetato 0,2 M pH 4,7;

b) acetato 0,2 M pH 5,7;

c) acetato 0,02 M pH 4,7.

Calcular as concentrações de acetato e ácido acético nos três tampões.

10. 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 lático (pK_a 3,9), ácido propiônico (pK_a 4,8) e ácido fosfórico (pK_a 2,14; 6,86; 12,4).

a) Qual o melhor tampão que pode ser preparado?

b) Quais das soluções disponíveis seriam utilizadas para prepará-lo, e em que proporções?

c) Se 1 L deste tampão, de concentração 0,22 M, for utilizado em uma experiência em que há produção de 0,09 mols de H^+, qual será o pH final da solução?

11. O pH inicial do meio de cultura para uma bactéria, contendo KH_2PO_4 e Na_2HPO_4, era 7,0. Após o crescimento do microrganismo, o pH final era igual a 5,8. Para impedir uma queda tão acentuada de pH foram sugeridas duas alterações do meio de cultura:

a) dobrar a concentração dos sais de fosfato;

b) substituir os fosfatos de sódio e potássio por acetato dos mesmos cátions.

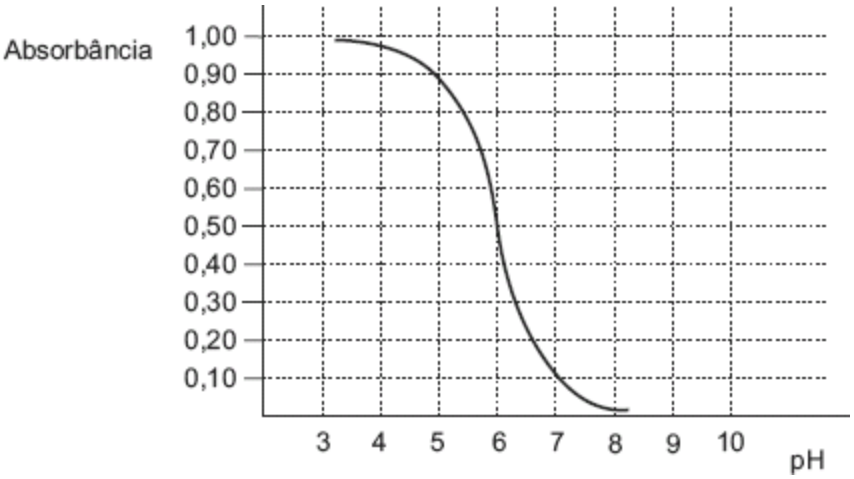
Qual é a sua opinião sobre as duas alterações propostas?

12. Pretende-se cultivar uma espécie bacteriana que cresce 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, K_2HPO_4, HCl e acetato de sódio com concentração igual a 1 M; NaOH e ácido acético com concentração igual a 2M.

a) Qual o melhor tampão a ser preparado? Por quê?

b) Quais das soluções acima deveriam ser usadas e em que proporções?

13. Mediu-se a absorbância de uma solução 0,1 M de um composto A em diferentes valores de pH. O composto A, cujo pK_a é 6,0, só absorve no comprimento de onda utilizado quando protonado. O resultado obtido está apresentado no gráfico a seguir.



a) Comparando-se a absorbância em três valores de pH com aquela medida em pH igual a 3, tem-se:

pH	% da absorbância em pH 3
6	50
5	90
7	10

Justificar esses resultados.

b) Fazer no gráfico anterior a curva que seria obtida para a absorbância de uma solução 0,1 M de um composto B, cujo pK_a também é 6,0, mas que só absorve no comprimento de onda utilizado quando desprotonado.

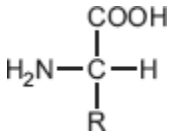
c) Uma mistura contendo 0,05 M de A e 0,05 M de B teve sua absorbância medida em condições idênticas às dos experimentos anteriores. Traçar a curva resultante.

Capítulo 2 | Aminoácidos e Proteínas

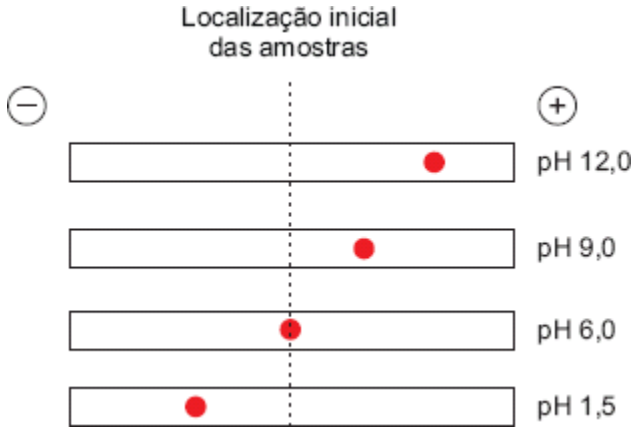
Os valores de pK_a necessários à resolução dos problemas estão na Tabela 2.1 e as abreviações dos nomes dos aminoácidos, na Figura 2.1

1. A estrutura a seguir aparece em muitos textos como fórmula geral de aminoácidos. Ela é de fato representativa? Em que valores de

pH?



2. Os peptídios Lys-Asp-Glu e Leu-Ala-Phe foram adicionados a uma mistura de água e óleo com posterior agitação. Prever a distribuição dos peptídios entre as duas fases.
3. Fazer a curva de titulação de serina a partir de pH 1 e de pH 12.
4. Escrever as formas iônicas predominantes do glutamato em pH igual a: 1; 4,07; 7 e 12. Calcular o pI.
5. Escrever as formas iônicas predominantes da lisina em pH igual a: 1; 4; 9,06 e 13. Calcular o pI.
6. Quatro amostras da solução de um aminoácido foram submetidas à eletroforese em diferentes valores de pH, com a mesma voltagem e durante o mesmo tempo. O esquema seguinte mostra a localização do aminoácido no início (linha pontilhada) e ao final (círculos vermelhos) da eletroforese.



   a) O aminoácido utilizado foi alanina, aspartato ou lisina?
   b) Fazer um esquema do resultado que seria obtido se o experimento houvesse sido feito com os outros dois aminoácidos.
7. Submeteu-se à eletroforese em pH 3,08 uma mistura composta de glutamato, lisina, leucina, leucil-leucina e lisil-histidina.

Representar no esquema seguinte as posições relativas em que deveriam ser encontrados os aminoácidos e os dipeptídios ao final da eletroforese.

8. Qual seria o resultado da eletroforese de uma solução de glicina feita em pH 9,78? Comparar a velocidade de migração do aminoácido nesta eletroforese com a obtida em eletroforese a pH 11,78.
9. Para o tripeptídio Ala-Lys-Ser,
   a) classificar os aminoácidos segundo o grupo R;
   b) esquematizar as ligações que estes aminoácidos poderiam formar na estrutura terciária de uma proteína;
   c) calcular o pI.

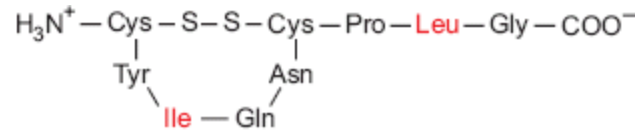
   Comparar a capacidade tamponante de uma solução 0,1 M deste tripeptídio com a de uma solução 0,2 M de glicina.
10. Seja o peptídio Glu-His-Leu-Lys.
    a) Considerando os grupos ionizáveis do peptídio, indicar na tabela seguinte: o nome do de cada grupo, o valor do seu pK_a e a carga (+, –, 0, 0/– ou +/0) que as formas predominantes do peptídio apresentam nos valores de pH indicados.

		Carga em pH igual a				
Grupo ionizável	pK_a	1,0	4,2	6,0	9,7	12

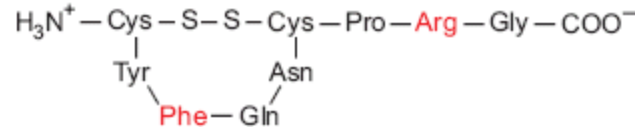
b) Determinar o pI do peptídio.

11. Oxitocina e vasopressina, dois peptídios com função hormonal, estão representados a seguir.

Oxitocina



Vasopressina



A tabela seguinte mostra as atidades dos dois peptídios quanto à lactação e à antidiurese, assumidas como 100%. Mostra também a atividade (relativa às atividades de oxitocina e vasopressina) de peptídios sintéticos, que diferem da oxitocina por substituição da leucina por outros aminoácidos.

Atividade de lactação e antidiurese (em porcentagem)

Oxitocina	Vasopressina		"Oxitocina" com troca de Leu por:			
			Ile	Val	Arg	Lys
Lactação	100	–	80	70	46	40
Antidiurese	–	100	–	–	56	6

a) De que depende a atividade biológica de oxitocina e vasopressina?

b) O tratamento de ambos os peptídios com agentes redutores acarreta sua inativação. Por quê?

12. Três proteínas, Pr1, Pr2 e Pr3, apresentam as seguintes propriedades:

- Pr1 tem um grupo α-carboxila, Pr2 tem dois e Pr3 tem três;
- Pr1 e Pr2 desnaturam-se com pequenas variações de pH, enquanto Pr3 mantém-se estável em uma faixa grande de pH;
- pI de Pr1 > pI de Pr2 > pI de Pr3.

Que hipóteses podem ser feitas sobre

a) a estrutura quaternária das três proteínas?
b) as ligações que mantêm sua estrutura terciária?
c) sua composição em aminoácidos?

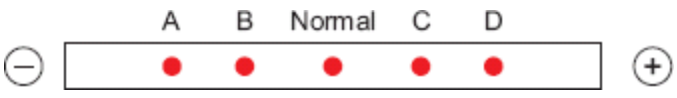
13. Já foram descritos nos seres humanos mais de 700 tipos de hemoglobinas diferentes da forma predominante em adultos saudáveis (HbA). Essas hemoglobinas são anormais por apresentarem substituição de um aminoácido, como mostra a tabela a seguir. Todas causam doenças, de gravidade variável, com exceção da última, que não tem manifestações clínicas.

Hemoglobina anormal	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) O que se pode presumir sobre a importância do glutamato na estrutura terciária da HbA?

14. Uma mistura de 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.

15. 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 à hemoglobina que tem:

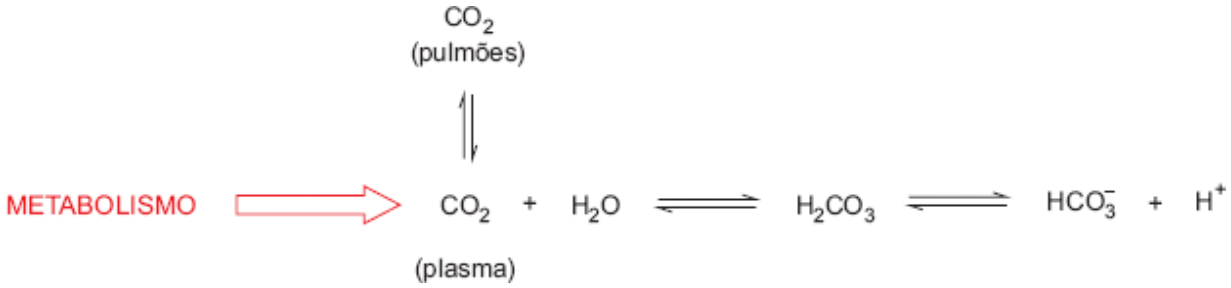
– valina em lugar de glutamato (HbS);
– aspartato em lugar de glicina (HbJ);
– glutamato em lugar de lisina (HbN);
– lisina em lugar de glutamato (HbC).

16. Verificar a veracidade das afirmações seguintes:

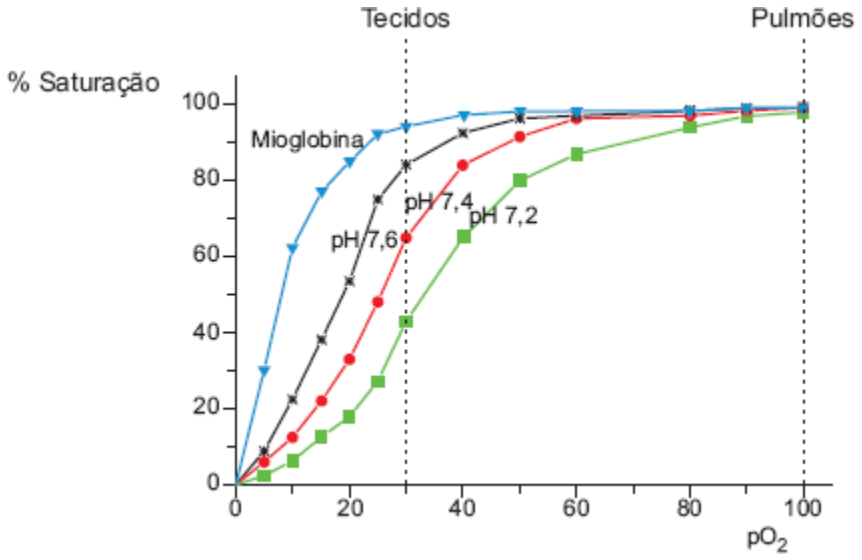
a) Em valores extremos de pH, uma proteína apresenta menor número de grupos com carga elétrica do que em pH 7.
b) Uma proteína que apresenta menor solubilidade em pH 9 é rica em aminoácidos básicos.
c) Quanto maior a porcentagem de aminoácidos hidrofóbicos presentes em uma proteína, tanto maior será 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 com três pK_a participam de interações hidrofóbicas na estrutura terciária das proteínas.
f) As ligações de hidrogênio da estrutura em folha β-pregueada de uma proteína são estabelecidas entre os grupos R dos aminoácidos.
g) Excluindo as cadeias laterais dos aminoácidos, as regiões em α-hélice de proteínas diferentes são idênticas.
h) Proteínas diferentes podem ser separadas por eletroforese, ainda que esta seja feita em pH diferente dos valores de pI das proteínas da mistura.
i) A hemoglobina anormal que tem um glutamato da cadeia β substituído por lisina apresenta pI maior que o da hemoglobina normal.
j) Uma proteína contendo três grupos α-carboxila tem estrutura quaternária.
k) O ponto isoelétrico da leucil-leucina é igual ao da leucina.

Capítulo 3 | 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 as curvas de saturação por oxigênio da mioglobina em pH 7,4 e da hemoglobina em diferentes valores de pH.



   a) Uma solução de hemoglobina, mantida sob pO_2 de 30 mmHg, 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 O_2 pela hemoglobina?

b) Uma solução de hemoglobina a pH 7,4 estava submetida a pO_2 de 100 mmHg. Que fenômeno deve ocorrer com a hemoglobina se a pO_2 baixar para 40 mmHg? E com a mioglobina?

c) O pH plasmático nos alvéolos pulmonares (pO_2 = 100 mmHg) é 7,4 e nos tecidos (pO_2 = 40 mmHg), 7,2. Que fenômeno deve ocorrer com a hemoglobina nos pulmões e nos tecidos?

d) A mioglobina doa ou recebe oxigênio da hemoglobina?

e) O que aconteceria se houvesse mioglobina nas hemácias e hemoglobina no músculo?

f) Esquematizar no gráfico a curva de saturação por oxigênio da hemoglobina fetal em pH 7,4.

3. O pH plasmático, cujo valor normal é 7,4, pode chegar a valores próximos de 7,0 nas proximidades de grupos musculares em exercício intenso.

a) O que explica esta diminuição?

b) Este valor de pH plasmático interfere na oxigenação do tecido muscular?

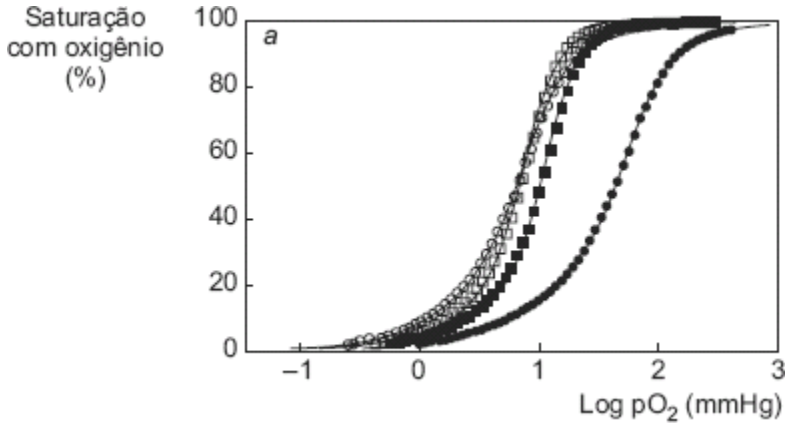
4. O composto 2,3-bisfosfoglicerato (BPG), presente nas hemácias, diminui acentuadamente a afinidade da hemoglobina por oxigênio em pO_2 = 40 mmHg, mas não tem efeito quando a pO_2 é 100 mmHg. Comparar a concentração de BPG das hemácias de um indivíduo de vida sedentária que vive ao nível do mar, com aquela de um indivíduo

a) sedentário, vivendo em La Paz (3.660 m de altitude);

b) esportista, vivendo ao nível do mar.

5. Os crocodilos podem permanecer mais de uma hora submersos, apesar de terem uma concentração de mioglobina cerca de 100 vezes menor do que a de mamíferos que mergulham, como as baleias. O gráfico a seguir foi obtido com experimentos *in vitro,* usando hemoglobina de crocodilos (círculos) e humana (quadrados) em duas situações: na ausência (símbolos vazios) e presença

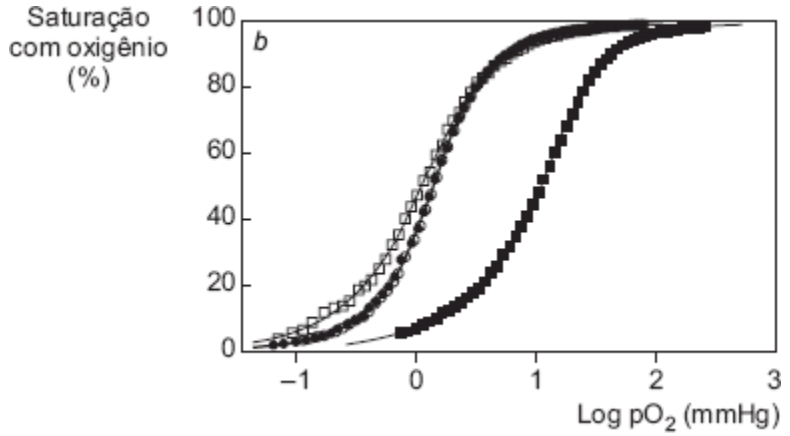
(símbolos cheios) de CO_2[1]. Estes experimentos foram feitos com o pH mantido em 7.



a) Qual é a diferença entre o efeito do CO_2 sobre as hemoglobinas humana e de crocodilo?

b) Proponha uma hipótese para explicar a capacidade de submersão dos crocodilos, sabendo que suas hemácias não têm 2,3 bisfosfoglicerato (2,3 BPG).

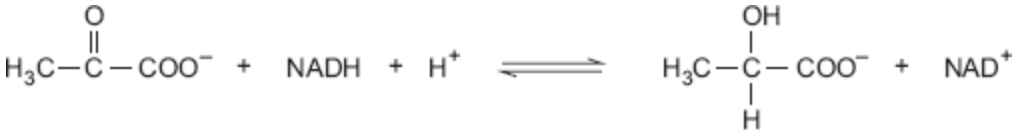
6. Experimentos semelhantes ao da questão anterior foram feitos usando uma hemoglobina híbrida [cadeias α de crocodilos + cadeias β humanas] (círculos) e uma hemoglobina híbrida modificada [cadeias α de crocodilos + cadeias β humanas portando várias substituições de aminoácidos] (quadrados) em duas situações: na ausência (símbolos vazios) e presença (símbolos cheios) de CO_2.



a) A cadeia polipeptídica responsável pela diferença de comportamento entre a hemoglobina de crocodilos e a humana é α ou β?
b) Fazer uma hipótese para explicar o comportamento da hemoglobina híbrida modificada.

Capítulo 4 | O Sentido das Reações

1. A uma solução com concentrações iguais de piruvato, NADH, lactato e NAD^+ adicionou-se lactato desidrogenase, a enzima que catalisa a seguinte reação:



Piruvato Lactato

A tendência das espécies oxidadas de ganharem elétrons, comparadas com a vitamina C (ácido ascórbico), está expressa na tabela seguinte:

Piruvato	NAD^+	Vitamina C
++	+	+++

a) Que alteração deve ser encontrada na concentração das espécies presentes?
b) Adicionando-se vitamina C oxidada em excesso à solução, qual(quais) espécie(s) será(serão) encontrada(s) em solução?

2. A uma solução com concentração 1 M de NAD^+, NADH, piruvato e lactato, adicionou-se lactato desidrogenase. O potencial de redução padrão ($E^{o\prime}$) dos sistemas NAD^+/NADH e piruvato/lactato é igual a – 0,32 V e – 0,19 V, respectivamente.
a) Em que sentido a reação ocorrerá?
b) Como variam os potenciais de redução dos dois sistemas à medida que a reação ocorre?

Em que condições a reação atingirá o equilíbrio? Qual o valor

c) do potencial de redução dos dois sistemas nesta situação?

d) Qual o valor de $\Delta G^{o\prime}$ da reação?

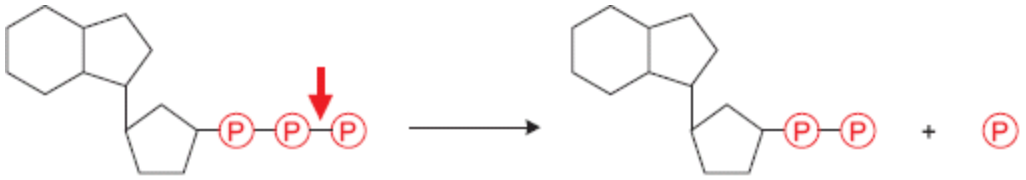
3. Verificar se são falsas ou verdadeiras as afirmações:

a) O rompimento de uma ligação química libera energia.

b) Reações não espontâneas em determinadas situações são espontâneas em outras situações.

c) Reações que não ocorrem espontaneamente podem ocorrer com a participação do ATP.

d) A energia liberada pelo ATP resulta da quebra da ligação anidrido fosfórico, indicada pela seta vermelha:



ATP ADP Grupo fosfato

e) A energia liberada pela conversão de ATP em ADP + P_i é utilizada para promover diversas reações celulares.

f) A formação de glicose 6-fosfato pode ser obtida se for associada à hidrólise do ATP:

$$\text{Glicose} + \text{fosfato } (P_i) \longrightarrow \text{glicose 6-fosfato} \qquad \Delta G^{o\prime} = +15\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \qquad (1)$$

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i \qquad \Delta G^{o\prime} = -31\ \text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \qquad (2)$$

g) As reações não espontâneas convertem-se em reações espontâneas quando associadas à hidrólise do ATP.

h) Os processos celulares que requerem energia (síntese de polímeros, transferência de íons e moléculas contra gradiente etc.) utilizam a energia derivada da hidrólise do ATP.

i) Os processos celulares que requerem energia utilizam a energia térmica proveniente da hidrólise do ATP.

4. Assinale o item correto:
   A energia liberada na reação de hidrólise do ATP
   a) é derivada da quebra de ligações;
   b) é consequência da formação de ligações novas;
   c) é o saldo das energias liberadas e consumidas nas quebras e formações de ligações dos componentes da reação;
   d) é a soma das energias liberadas nas quebras e formações de ligações.
5. Com relação às reações:

$$A + B \longrightarrow A - B \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +15\ kJ \cdot mol^{-1} \qquad (1)$$

$$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + P_i \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -31\ kJ \cdot mol^{-1} \qquad (2)$$

$$A + B + ATP + H_2O \longrightarrow A - B + ADP + P_i \qquad (3)$$

   pode-se afirmar que apenas
   a) a reação (1) ocorre;
   b) a reação (2) ocorre;
   c) a reação (3) ocorre;
   d) as reações (2) e (3) ocorrem;
   e) as reações (1) e (2) ocorrem.

Capítulo 5 | Enzimas

Os dados de velocidade da reação enzimática referem-se à velocidade inicial de reação (v_0)

1. Foram medidas as velocidades em condições diferentes de temperatura e pH, mantidas constantes as concentrações de enzima e de substrato. Os resultados dos experimentos estão apresentados na tabela a seguir. Com base nas interações que estabelecem a conformação espacial da enzima, explicar a diferença de resultados dos tubos:
   a) 4, 5 e 6;

b) 1, 4 e 7.

Prever resultados aproximados para a velocidade de reação dos tubos 6, 8 e 9, compatíveis com os demais resultados apresentados.

Tubo	pH	Temperatura (°C)	Velocidade da reação(mmols de produto/min)
1	3,4	10	10
2	7,4	10	3
3	9,4	10	2
4	3,4	30	80
5	7,4	30	9
6	9,4	30	?
7	3,4	70	8
8	7,4	70	?
9	9,4	70	?

2. Sabendo que a urease catalisa a decomposição da ureia em CO_2 e NH_3, um estudante preparou uma série de tubos, incubou-os a 30°C por 10 minutos e dosou amônia nos tubos. A composição dos tubos (com volume final de 1 mL) e os resultados das dosagens estão na tabela seguinte.

Tubo	Ureia(mM)	Urease(µg)	NH_3(µmols)
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

a) Por que não houve formação de NH_3 no tubo 9? Por que foi preparado um tubo sem enzima?
b) Qual foi a velocidade de reação nos tubos 5 a 8?
c) De que dependeu a velocidade de reação neste experimento?
d) Quais seriam os resultados se as dosagens de amônia fossem feitas após 48 h de incubação?
e) Que modificações poderiam ser feitas na composição dos tubos para conseguir velocidades maiores do que as que foram medidas?

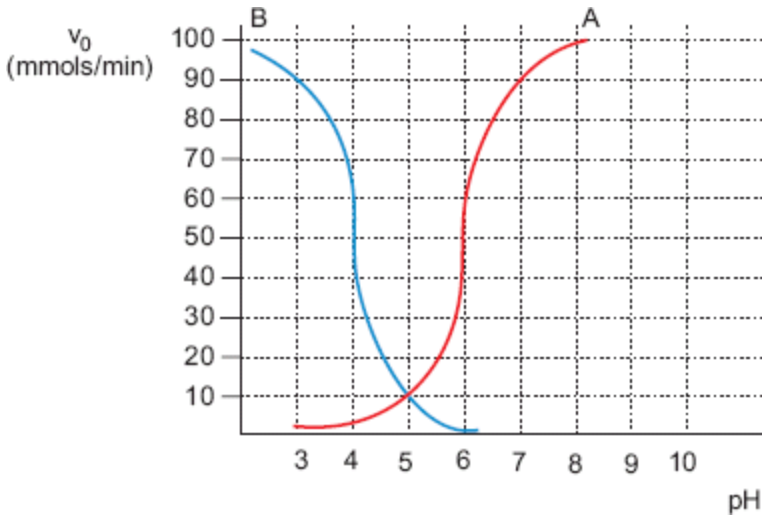
3. Classificar as afirmações seguintes como verdadeiras ou falsas.
a) Quando o número de moléculas de substrato é 10 vezes maior do que o número de moléculas de enzimas, só é possível encontrar enzimas livres no final da reação.
b) Uma reação irreversível só termina quando todo o substrato for transformado em produto, independente da quantidade de enzima presente.
c) Ao incubar uma determinada concentração de enzima com uma dada concentração de substrato por 20 e 30 minutos, obtiveram-se 4 e 6 mmols de produto, respectivamente. É possível afirmar que, após 10 minutos de reação, tenham sido formados 2 mmols de produto?
d) Um inibidor competitivo reduz mais a velocidade da reação do que um inibidor não competitivo.
e) Um inibidor não competitivo reduz mais a velocidade da reação do que um inibidor competitivo.
f) Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação enzimática.
g) Supondo uma concentração de substrato infinitamente grande, a velocidade da reação enzimática é diretamente proporcional à

concentração de enzima.

h) Ao final da reação enzimática, todas as moléculas de enzima encontram-se exatamente na forma em que estavam antes do início da reação.

4. A sequência de aminoácidos de uma enzima isolada de um indivíduo apresenta uma diferença em relação à sequência normalmente encontrada: a lisina na posição 145 é substituída por glutamato. Que hipótese(s) pode(m) ser feita(s) sobre a atividade da enzima alterada?

5. O gráfico a seguir apresenta o resultado de experimentos feitos com duas enzimas, A e B.



a) O grupo essencial para a catálise da enzima A é aspartato protonado, aspartato desprotonado, histidina protonada, histidina desprotonada, lisina protonada ou lisina desprotonada? E da enzima B?

b) Desenhar um gráfico aproximado (com quaisquer valores de velocidades) para uma enzima C que tenha como grupos essenciais para a catálise um resíduo de aspartato desprotonado e uma lisina protonada.

6. Um bioquímico desastrado fez experimentos com uma enzima, variando a concentração do substrato, na presença ou ausência de inibidores. Outras variáveis (quantidade de enzima, temperatura, tempo de reação etc.) foram mantidas fixas. Foram utilizados dois

tipos de inibidores e duas concentrações de substrato (S) iguais a 5 mM e 50 mM. Por acidente, foram perdidos os rótulos dos tubos de ensaio. Sabia, porém, que os tubos com a mesma marca (* ou ** ou ***) eram de mesma composição, isto é, ou não tinham inibidor ou tinham o mesmo tipo de inibidor. Os resultados encontrados estão na tabela a seguir, expressos como velocidade inicial de reação (v_0) O bioquímico pede auxílio para verificar se, com estes resultados, é possível descobrir:

a) os tubos (* ou ** ou ***) que continham inibidor;
b) o tipo de cada inibidor (competitivo ou não competitivo).

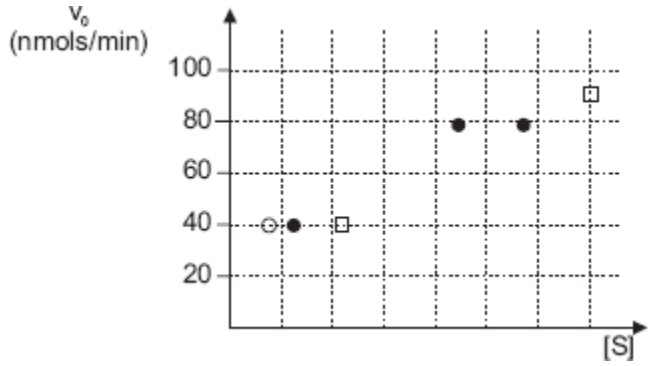
	v_0 (µmols de produto/min)	
Tubos	[S] = 5 mM	[S] = 50 mM
*	4	630
**	20	700
***	10	350

Para cada inibidor, compare a porcentagem de inibição obtida com a concentração 5 mM de substrato com a obtida com a concentração 50 mM. Justificar os valores encontrados.

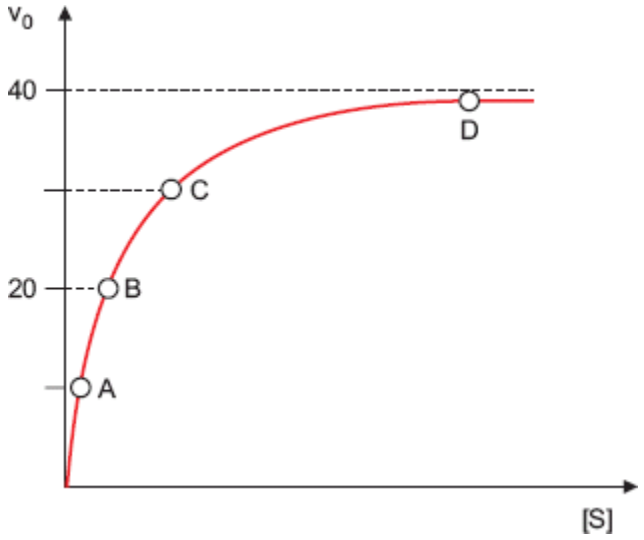
7. Um bioquímico azarado fez experimentos para testar dois inibidores, usando a mesma quantidade de enzima. Por acidente, perdeu muitos dos tubos de ensaio que havia utilizado, restando apenas aqueles cujas velocidades de reação estão apresentadas no gráfico seguinte. Sabia, porém, que os tubos com a mesma marca (∘ ou • ou □) eram do mesmo tipo, isto é, ou não tinham inibidor ou tinham o mesmo inibidor. O bioquímico quer saber se é possível descobrir

a) que tubos (∘ ou • ou □) estavam sem inibidor;
b) se um dos dois inibidores é não competitivo;
c) se um dos dois inibidores é competitivo.

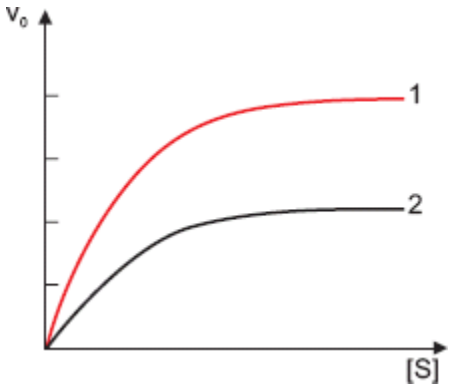
Ajudar o cientista, apresentando os argumentos necessários para convencê-lo.



8. 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 ($[E_{livre}] \times t$);
   e) concentração de enzima livre em função da concentração de substrato ($[E_{livre}] \times [S]$);
   f) velocidade máxima em função da concentração de inibidor não competitivo ($V_{máx.} \times [I_{NC}]$);
   g) velocidade máxima em função da concentração de inibidor competitivo ($V_{máx} \times [I_C]$).
9. Indicar a porcentagem de enzima livre (em relação à concentração total de enzima) e de substrato livre (em relação à sua concentração inicial) nos pontos A, B, C e D do seguinte gráfico:



10. 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 nmols 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.
11. 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 representada pela curva 1, de modo a obter os resultados expressos pela curva 2 do gráfico a seguir?



12. 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_{-1} e k_2 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, compatíveis com as suas características.

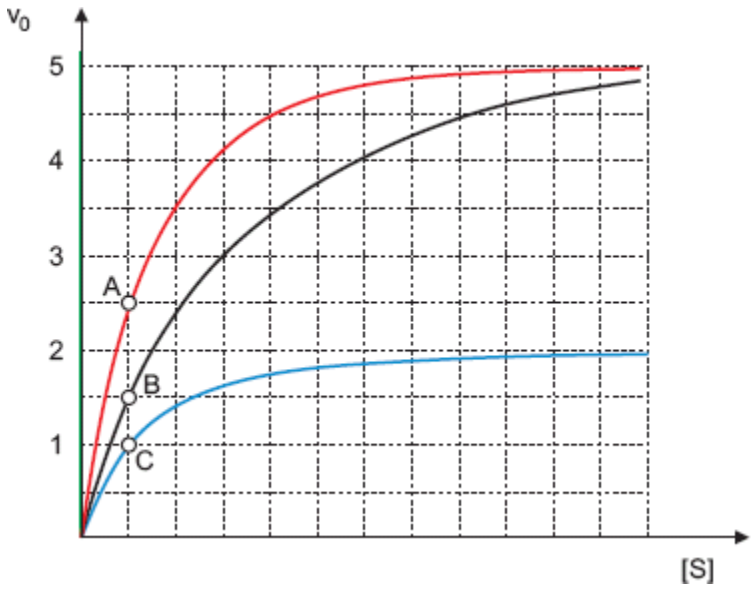
13. A reação [Glicose + ATP → Glicose 6-fosfato + ADP] pode ser catalisada por duas isoenzimas: hexoquinase e glicoquinase. A partir dos resultados apresentados na tabela a seguir:
    a) indicar a enzima que tem maior afinidade pela glicose;
    b) justificar a diferença das velocidades de reação.

Hexoquinase			Glicoquinase		
Tubo	Glicose (mM)	Velocidade de reação(µmols/min)	Tubo	Glicose (mM)	Velocidade de reação(µmols/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

14. Orlistate, comercializado como Xenical®, inibe a lipase digestiva, diminuindo a absorção de lipídios, sem afetar a digestão de proteínas e carboidratos. Que hipótese(s) poderia(m) explicar a ação diferencial do fármaco?

15. O gráfico a seguir representa a cinética de uma reação enzimática na presença de um inibidor competitivo, um inibidor não competitivo e sem inibidores. Os pontos A, B e C das curvas mostram os resultados obtidos com três tubos contendo a mesma concentração de substrato e de enzima. Para que pontos — A e/ou B e/ou C — são válidas as seguintes afirmações:

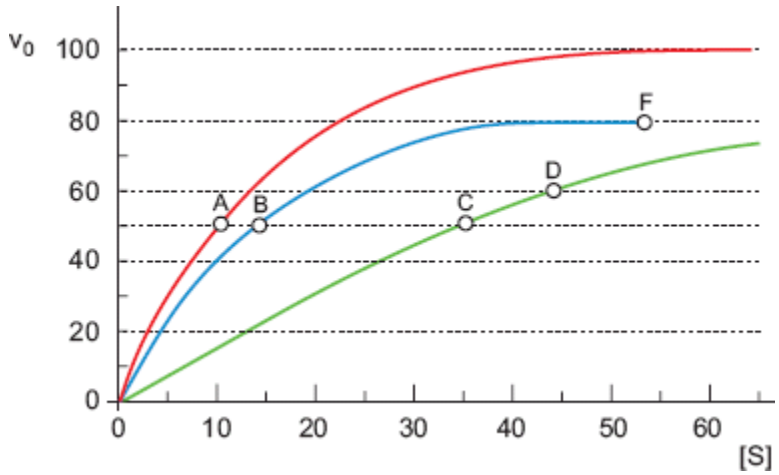
a) $v_0 = k_2 [ES]$
b) $[S] = K_M$
c) $[ES] > [E_{livre}]$
d) [S] limitante
e) $v_0 = V_{máx.}$
f) $v_0 = k [E_{total}]$
g) $[E_{total}] > [ES] + [E_{livre}]$
h) $[ES] < [E_{total}]$
i) $[ES] = [E_{livre}]$



16. 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:

a) complexo enzima-substrato (ES) correspondentes aos pontos A, B, C, D e F;

b) enzima livre nos pontos A, B e F.



17. Uma enzima, cuja conformação espacial é estável entre pH 3 e 9, somente é ativa quando um determinado resíduo de histidina (pK_a = 6,0) de sua estrutura encontra-se protonado. Faça no mesmo gráfico as curvas aproximadas da velocidade inicial de reação (v_0) em função da concentração do substrato para a reação em:
    a) pH 3;
    b) pH 6;
    c) pH 3, em presença de concentração de inibidor não competitivo tal que 25% das enzimas encontrem-se na forma EI.

18. Mediu-se a velocidade de uma reação em tubos preparados segundo a tabela seguinte, contendo a mesma concentração da enzima e volume de 100 mL.

Tubos	Substrato(mM)	Tempo(minutos)	Inibidor não competitivo	Velocidade(µmols/min)
1	3	100	–	1,0
2	30	100	–	1,5
3	3	10	–	1,5
4	6	10	–	1,5
5	3	10	1	0,7

6	8	10	1	
7			1	

a) Justificar a diferença das velocidades medidas nos tubos 1 e 3 com base na quantidade de produto formado. Qual das duas medidas refere-se a velocidade inicial?
b) Justificar a diferença das velocidades medidas nos tubos 1 e 2 com base na quantidade de produto formado. Qual das duas medidas refere-se à velocidade inicial?
c) Qual a velocidade da reação no tubo 6?
d) A um tubo 7, contendo a mesma concentração de enzima e de inibidor não competitivo usada no tubo 5, foi adicionada uma certa quantidade de inibidor competitivo. Qual a maior velocidade que pode ser obtida neste tubo? Como fazer para obtê-la?
e) Ao final da reação, qual será razão entre as concentrações de produto nos tubos 3 e 4?

19. A tabela a seguir refere-se a uma experiência utilizando a mesma concentração de enzima.

Tubo	Substrato(mM)	Inibidor(mM)	Velocidade da reação(nmols/min)	% de ES
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	

a) Completar a última coluna com os valores do percentual de enzima presente como complexo ES durante os tempos em que a velocidade da reação foi medida.
b) Sob que forma(s) apresenta-se a fração de enzima restante?

20. A tabela a seguir mostra os valores de velocidade de uma reação enzimática em presença e ausência de um inibidor. Planejar a composição do tubo 5, de modo que a velocidade obtida indique o tipo de inibição provocada.

Tubo	Enzima(µg)	Substrato(mM)	Inibidor(µg)	Velocidade(nmols/min)
1	1	1	–	18
2	1	2	–	20
3	1	3	–	20
4	1	3	1	15
5				

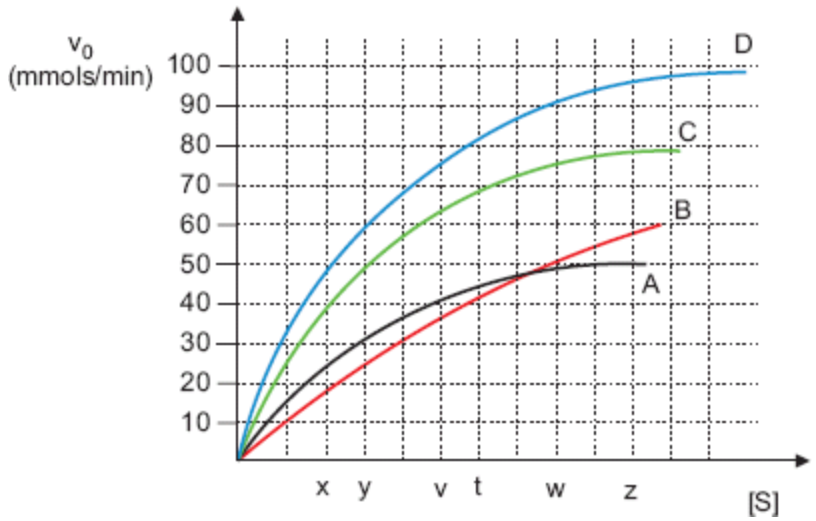
21. A tabela a seguir apresenta valores de velocidade de reação (µmols/min) para as enzimas A, B e C.
    a) Completá-la, admitindo que as enzimas são estáveis de pH 3 a 11, seus substratos não têm grupos ionizáveis e outras variáveis (concentração de enzima e de substrato etc.) são mantidas fixas.
    b) Fazer gráficos 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 ($pK_a = 9$) protonado						80			

22. Experimentos de cinética enzimática foram feitos de acordo com a tabela seguinte, usando a mesma concentração de enzima.

	Experimentos			
	A	**B**	**C**	**D**
Substrato	S_1	S_1	S_2	S_1
Inibidor	I_1	I_2	–	–

Os resultados obtidos são apresentados no gráfico:



a) Os inibidores I_1 e I_2 são competitivos ou não competitivos?

b) O que pode ser deduzido sobre as constantes de velocidade k_2 pelos resultados dos experimentos C e D?

c) Preencher a tabela seguinte, indicando as porcentagens em relação ao total de enzimas utilizadas nos ensaios.

S = Substrato; $\mathbf{E_L}$ = Enzima livre; **ES** = Complexo enzima-substrato; **EI** = Complexo enzima-inibidor; **ESI** = Complexo enzima-substrato-inibidor.

Experimento	[S]	$[E_L]$*	[ES]	[EI + ESI]*
A	x			
B	y			
C	w			

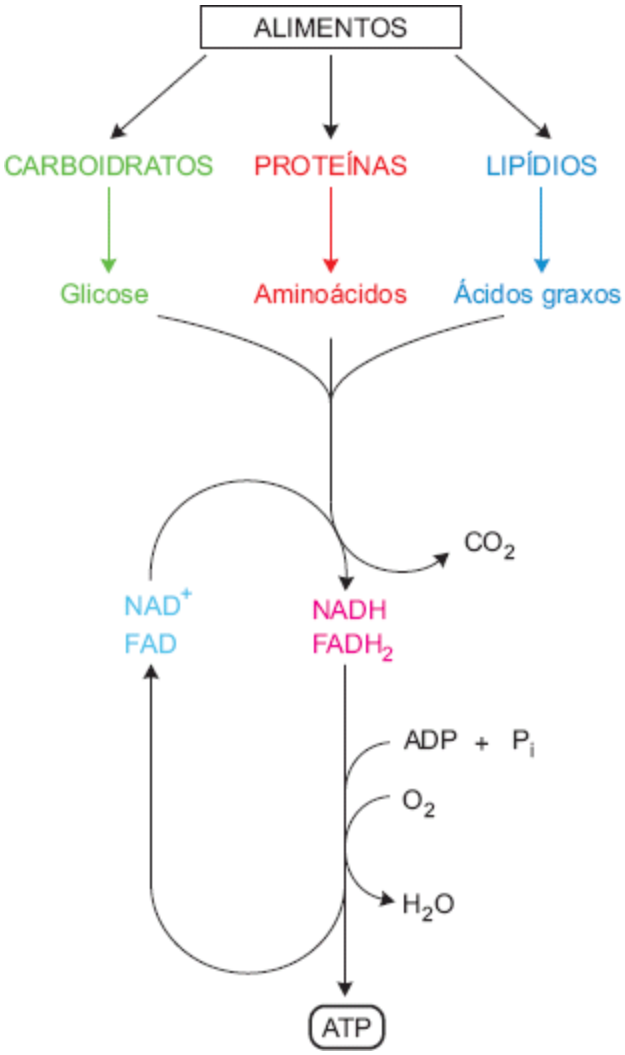
D	z			
C	x			
A	v			
B	t			

* Nos casos em que é possível calcular.

23. 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.
24. O metanol, por ação da álcool desidrogenase, é convertido a formaldeído, extremamente tóxico. A intoxicação por metanol é tratada por ingestão de doses elevadas de etanol. Como se justifica esta terapia? O metanol pode ser classificado como inibidor competitivo da álcool desidrogenase?

Capítulo 8 | Introdução ao Metabolismo

1. Uma via metabólica hipotética com três etapas, catalisadas pelas enzimas A, B, e C, apresenta os intermediários W, X, Y e Z. Deduzir a ordem das etapas enzimáticas, com base nas informações:
   a) Um inibidor da enzima B provoca um acúmulo de Z.
   b) Um mutante desprovido da enzima A necessita da presença de Y no meio de cultura para o seu crescimento.
   c) Um inibidor da enzima C provoca o acúmulo de W, Y e Z.
2. Responder as questões relativas ao mapa metabólico seguinte sobre o catabolismo de nutrientes:
   a) Qual a finalidade 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.

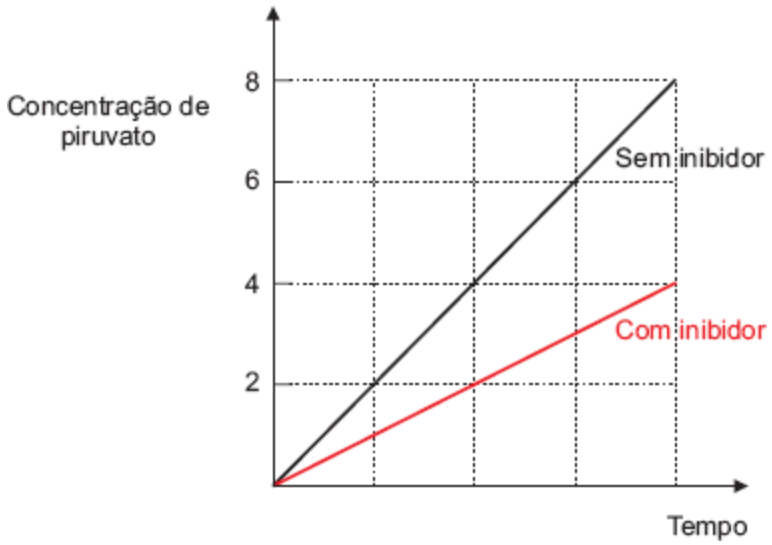


3. Verificar se são corretas as seguintes afirmações:
   a) A energia dos nutrientes é obtida por oxidação.
   b) A oxidação biológica consiste na retirada de hidrogênio (H_2) do substrato.
   c) A única função dos alimentos é fornecer energia.
   d) Os compostos característicos de um dado organismo devem ser supridos pela dieta.

Capítulo 9 | Metabolismo de Carboidratos: Glicólise e Formação de Acetil-CoA

1. Escrever a equação geral da conversão de glicose a lactato.

2. 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?
3. Dispondo de uma solução contendo glicose e todas as enzimas da glicólise anaeróbia, listar os compostos que devem ser adicionados para a conversão do açúcar a lactato.
4. Incubando uma suspensão de hemácias com glicose e fosfato inorgânico radioativo, é possível obter frutose 1,6-bisfosfato com os dois átomos de fósforo radioativos?
5. Duas preparações de hepatócitos foram incubadas com glicose e a uma delas adicionou-se um inibidor enzimático em tal excesso que a enzima afetada foi totalmente inibida. Mediu-se a concentração de piruvato ao longo do tempo e foram obtidos os resultados apresentados no gráfico a seguir. Que enzima foi inibida?



6. 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.

7. Por que os mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* desprovidos de mitocôndrias são incapazes de crescer em um meio contendo apenas glicerol ou etanol como fonte de carbono?
8. A uma solução contendo todas as enzimas da glicólise foram adicionados 100 mmols de glicose, 20 mmols de ATP, 20 mmols de ADP, 1 mmol de NAD^+ e 10 mmols de fosfato. Qual é a quantidade máxima de lactato que pode ser produzida nestas condições? Que outros compostos e em que quantidades apareceriam ao final da reação?
9. Quantidades não limitantes de frutose 6-fosfato foram incubadas com fosfofrutoquinase 1 e com concentrações variadas de ATP. Fazer um gráfico relacionando a velocidade inicial da reação com a concentração de ATP.
10. 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. Quais as consequências deste tratamento?

Capítulo 10 | Ciclo de Krebs

1. 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, que adição fará aumentar a concentração de oxaloacetato?
2. 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). Justificar estes resultados.

3. Uma suspensão de hepatócitos contendo quantidades saturantes de malonato foi dividida em três tubos e a cada um foi adicionado: a) citrato; b) piruvato; c) fumarato. Escrever a equação balanceada para a conversão de cada composto a succinato.
4. Em 2004, houve casos de morte de animais no Zoológico de São Paulo, que apresentavam sinais neurotóxicos semelhantes aos resultantes de intoxicação por fluorcitrato. O laudo toxicológico, entretanto, registrou envenenamento por monofluoracetato de sódio.
   a) Como a ingestão de monofluoracetato de sódio levou à produção de fluorcitrato?
   b) Que enzima deve ser inibida por fluorcitrato?
   c) A inibição deve ser competitiva ou não competitiva?
   d) Afinal, por que morreram os animais?
5. Supor que em alguns organismos primitivos, o ciclo de Krebs funcionava em sentido inverso ao atual. Qual seria o estado de oxidação-redução das coenzimas com o funcionamento do ciclo? Comparar o papel do CO_2 nos organismos primitivos com os atuais. Aqueles organismos poderiam viver em anaerobiose?
6. Uma espécie A de bactéria não sintetiza succinato desidrogenase, nem o complexo α-cetoglutarato desidrogenase. Esta bactéria foi inoculada em anaerobiose, em um meio de cultura contendo excesso de piruvato e outro composto, a partir do qual pode ser obtido ATP por vias que não devem ser levadas em consideração. Depois de algum tempo de incubação, verificou-se que as células excretaram fumarato e α-cetoglutarato no meio de cultura, na proporção de 2:1. O experimento foi repetido com uma espécie B de bactéria, desprovida apenas de succinato desidrogenase. Verificou-se que as células excretavam fumarato e succinato na proporção de 3:1. Justificar estes dados.
7. A síntese de porfirinas inicia-se com a condensação de succinil-CoA e glicina. Como pode ser mantido o nível dos intermediários do ciclo de Krebs quando esta síntese ocorre?
8. Escrever a equação da síntese de α-cetoglutarato a partir de piruvato.

9. 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?
10. Por que plantas e bactérias são capazes de converter ácidos graxos em glicose e mamíferos não?

Capítulo 11 | Cadeia de Transporte de Elétrons e Fosforilação Oxidativa

1. A cadeia de transporte de elétrons de uma bactéria é constituída por 5 compostos, designados ***m***, ***n***, ***o***, ***p***, e ***q***, que transportam elétrons do NADH ao oxigênio. A cadeia de transporte de elétrons foi suprida com NADH e tratada com os inibidores A, B, C, D. O estado de oxidação de cada transportador foi determinado, chegando-se ao resultado apresentado a seguir, em que (-) significa o transportador completamente reduzido e (+), completamente oxidado. Os inibidores só se ligam aos transportadores quando estes estão no estado reduzido.

	Estado de oxidação do transportador					
Inibidor	**NAD^+/NADH**	***m***	***n***	***o***	***p***	***q***
nenhum	+	+	+	+	+	+
A	–	–	–	+	–	–
B	–	–	+	+	+	–
C	–	+	+	+	+	–
D	–	–	–	+	+	–

   a) Indicar a ordem dos transportadores de elétrons na cadeia e a direção do fluxo de elétrons.

b) Indicar o transportador ao qual se liga cada inibidor.

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. Foram determinados, em cada caso, os componentes da cadeia que se encontravam reduzidos ou oxidados. Com base nos resultados, mostrados na tabela a seguir, indicar a sequência dos 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 tabela seguinte, em que (+) indica que houve produção de NAD^+ ou ATP e consumo de O_2 e (–), que não houve.

Tubo	Condição	NAD^+	Consumo de O_2	Produção de ATP	ΔpH
1	com NADH	+	+	+	1,4
2	com NADH e droga X	+	+	–	0
3	sem NADH	–	–	–	0
4	com NADH e pH externo mantido constante	+	+	–	0
5	sem NADH, com DpH	–	–	+	1,4

a) Verificar se é possível:

a_1) oxidação de NADH sem síntese de ATP;
a_2) oxidação de NADH sem consumo de oxigênio;
a_3) consumo de oxigênio sem síntese de ATP;
a_4) consumo de oxigênio sem formação de gradiente de H^+;
a_5) consumo de oxigênio sem oxidação de NADH.

b) Quais dos parâmetros medidos apresentam vinculação indissociável?

4. Citar as consequências dos seguintes fatores para o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa:
   a) presença de cianeto ou monóxido de carbono;
   b) carência de fosfato (P_i);
   c) carência de ADP;
   d) presença de dinitrofenol (DNP);
   e) carência de P_i e/ou ADP em presença de DNP;
   f) presença de oligomicina;
   g) presença de oligomicina e DNP.
5. 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?
6. Uma suspensão de células hepáticas foi incubada com glicose e butilmalonato (inibidor da lançadeira do malato-aspartato) em presença de oxigênio. Indicar, nestas células:
   a) o destino dos carbonos da glicose;
   b) a produção de ATP por glicose consumida;
   c) a alteração no consumo de oxigênio;
   d) a atividade do ciclo de Krebs.
7. Calcular o número de mols 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:
   a) malonato;
   b) dinitrofenol;
   c) oligomicina;
   d) malonato + dinitrofenol;
   e) malonato + oligomicina.

8. Uma suspensão de mitocôndrias foi dialisada e incubada com 100 mmols de acetil-CoA, 2 mmols de oxaloacetato, 6 mmols de NAD^+, 50 mmols de GDP, 20 mmols 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.

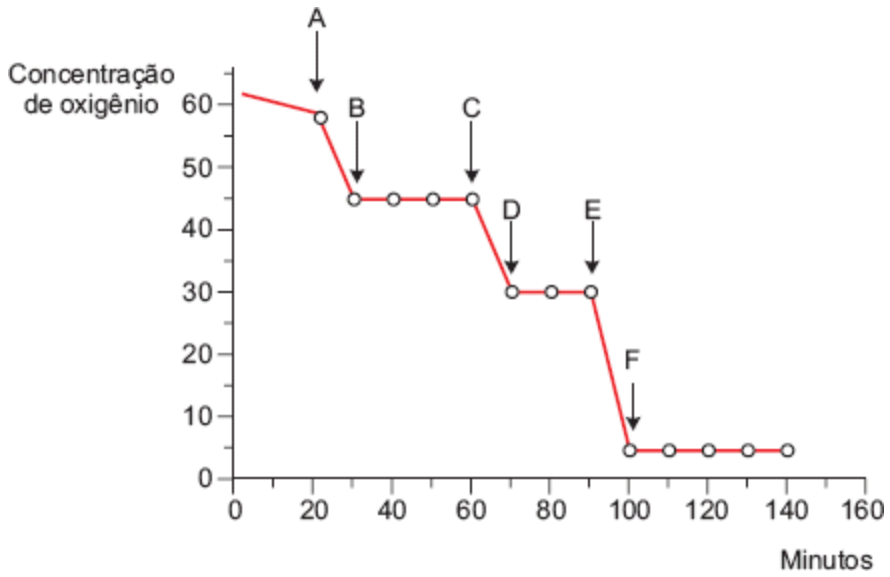
9. Calcular o saldo de ATP da oxidação total de:
   a) glicose;
   b) ácido palmítico (16C).

   Quais seriam os resultados na presença de dinitrofenol? Qual o destino da energia não armazenada sob a forma de ATP?

10. Discutir o funcionamento do ciclo de Krebs, β-oxidação e via glicolítica em uma suspensão de células hepáticas na presença dos seguintes compostos:
    a) antimicina;
    b) oligomicina;
    c) dinitrofenol;
    d) antimicina + dinitrofenol;
    e) oligomicina + dinitrofenol.

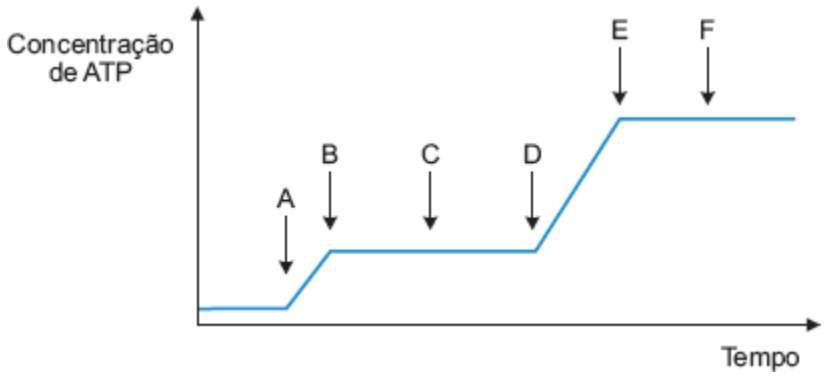
11. Uma suspensão de células hepáticas foi incubada com glicose e ácidos graxos; à metade da suspensão adicionou-se DNP (1) e à outra, oligomicina (2). Indicar qual(quais) das ocorrências seguintes seria(m) verificada(s) nas preparações 1 e 2 em comparação com a preparação antes das adições.
    a) Aumento do consumo de oxigênio.
    b) Componentes da cadeia de transporte de elétrons no estado reduzido.
    c) Formação de lactato a partir de glicose.
    d) Estímulo da β-oxidação.
    e) Formação de GTP, a partir de GDP e Pi.
    f) Aumento da concentração mitocondrial de ADP.
    g) Aumento da concentração de NADH.
    h) Estímulo da conversão de isocitrato a α-cetoglutarato.
    i) Inibição da fosfofrutoquinase 1.
    j) Estímulo da oxidação de glicose a CO_2 e H_2O.

12. Uma suspensão de mitocôndrias foi incubada em um meio apropriado e mediu-se a concentração de oxigênio no meio em função do tempo. Nos tempos indicados pelas setas no gráfico seguinte foram adicionados os compostos A, B, C, D, E e F, em excesso e sucessivamente. Os compostos adicionados foram: rotenona, succinato, dinitrofenol, malato, oligomicina e antimicina A.



a) Quais são os compostos A, B, C, D, E e F?
b) Em experimento semelhante ao anterior, após incubar as mitocôndrias com malato foram adicionados: 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.

13. Uma suspensão de mitocôndrias foi incubada em um meio apropriado e com excesso de ADP e Pi. Ao longo do tempo, foram feitas adições sequenciais, também em excesso, dos compostos A, B, C, D, E e F. Os valores de concentração de ATP no meio estão apresentados no gráfico a seguir. Os compostos adicionados foram: isocitrato, dinitrofenol, cianeto, malonato, glicose e succinato. Que compostos correspondem a A, B, C, D, E e F?



Capítulo 12 | Metabolismo de Carboidratos: Via das Pentoses Fosfato

1. Hemácias, adipócitos, hepatócitos e fibras musculares foram incubados com glicose marcada com carbono ^{14}C, na presença e ausência de altas concentrações de fluoreto (F^-), um potente inibidor da enolase. Os resultados da formação de $^{14}CO_2$ encontram-se na tabela seguinte, onde o número de sinais (+) indica a intensidade da produção de $^{14}CO_2$ e o sinal (–), a ausência de produção.

	Produção de $^{14}CO^2$	
	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 $^{14}CO_2$?

2. Esquematizar as reações que levam à síntese de ribose 5-fosfato a partir de glicose em fibras musculares.

3. Indicar as partes da via das pentoses fosfato — oxidativa e/ou não oxidativa — utilizadas quando da síntese de:
   a) nucleotídios;
   b) ácidos graxos;
   c) nucleotídios e ácidos graxos.
4. Considerar 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 porcentagem de portadores de um defeito genético caracterizado pela deficiência parcial de glicose 6-fosfato desidrogenase é muito alta.
   c) A administração de primaquina, um fármaco usado contra a malária, a estes indivíduos resulta em anemia hemolítica grave.
   d) Agentes como a primaquina estimulam a produção de peróxidos.
   e) Os peróxidos causam a lise de hemácias, por formarem o radical hidroxila que reage com ácidos graxos insaturados da membrana plasmática, cuja estrutura é rompida.

   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.

Capítulo 13 | Metabolismo de Carboidratos: Glicogênio, Amido, Sacarose e Lactose

1. A degradação de glicogênio e amido é catalisada por dois tipos de enzimas: (1) a glicogênio fosforilase e a amido fosforilase, que atuam sobre as ligações glicosídicas α-1,4, originando glicose 1-fosfato e reduzindo a cadeia dos polissacarídios de uma unidade, e (2) a α-1,6 glicosidase, que hidrolisa o resíduo de α-1,6 glicose na

região da ramificação da cadeia dos dois polissacarídios, liberando uma molécula de glicose.

Em um experimento, a mesma massa de glicogênio (tubo I) e de amido (tubo II) foi incubada com a mistura das três enzimas. Ao término da reação espera-se encontrar:

a) a mesma quantidade de glicose 1-fosfato e de glicose nos tubos I e II;
b) maior quantidade de glicose no tubo I do que no tubo II;
c) menor quantidade de glicose 1-fosfato no tubo II do que no tubo I;
d) iguais quantidades de glicose 1-fosfato nos dois tubos e quantidades diferentes de glicose;
e) iguais quantidades de glicose nos dois tubos e quantidades diferentes de glicose 1-fosfato.

2. Amostras de glicogênio hepático provenientes de um indivíduo normal (N) e de um paciente (D) e uma solução de amido (A) foram incubadas em meio apropriado para a completa degradação dos polímeros. Ao final da incubação, foram medidas as concentrações de glicose 1-fosfato e de glicose. As razões glicose 1-fosfato/glicose encontradas foram:

	Glicose 1-fosfato/Glicose
N	10/1
D	100/1
A	27/1

a) Qual foi a composição mínima (enzimas e reagentes) qualitativa do meio de incubação para que fosse obtida a degradação completa do polímero?
b) Que deficiência enzimática deve apresentar o paciente doador da amostra D?

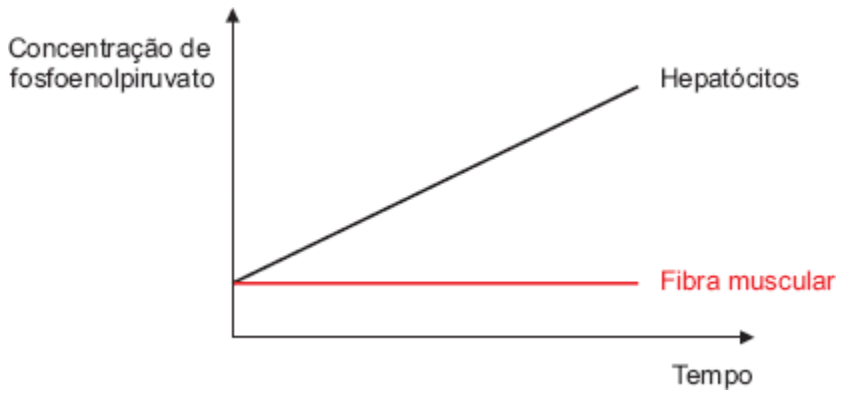
3. Indicar as consequências para o metabolismo de carboidratos decorrentes da deficiência de:

a) glicose 6-fosfatase;

b) glicogênio fosforilase muscular;
c) glicogênio fosforilase hepática;
d) fosfofrutoquinase muscular.

Capítulo 14 | Gliconeogênese

1. O lactato produzido pelo músculo pode ser convertido a glicose pelo fígado.
   a) Em que condições o músculo produz lactato?
   b) Além do músculo, que outros tecidos ou células produzem lactato?
   c) Por que esta conversão não é feita no músculo?
2. A conversão de glicose a lactato tem $\Delta G^{o\prime} = -197$ kJ/mol. Como pode ser explicada termodinamicamente a gliconeogênese feita a partir de lactato?
3. Preparações de hepatócitos e de fibras musculares foram incubadas com lactato e fluoreto, um inibidor da enolase, e a concentração de fosfoenolpiruvato foi medida ao longo do tempo. Como podem ser interpretados os resultados expressos no gráfico a seguir?



4. Descrever as consequências metabólicas, em fígado, músculo e hemácias, da falta de atividade de:
   a) triose fosfato isomerase;
   b) frutose 1,6-bisfosfatase.
5. Uma suspensão de hepatócitos foi incubada em meio de cultura contendo lactato marcado com carbono ^{14}C e frutose 2,6-bisfosfato. Em um experimento paralelo, a frutose 2,6 bisfosfato foi omitida.

Quais os compostos radioativos encontrados no meio de cultura em cada caso?

6. Animais de laboratório foram alimentados com dietas diferentes, cada uma contendo um dos seguintes compostos marcado com C^{14}:
   a) oxaloacetato;
   b) acetato;
   c) palmitato;
   d) piruvato;
   e) etanol;
   f) glicerol;
   g) citrato.

   Indicar os casos em que seria possível encontrar glicose radioativa nos animais.

Capítulo 15 | Fotossíntese

1. Analisar as seguintes afirmações:
   a) A fotossíntese é o processo pelo qual a energia luminosa é utilizada para sintetizar glicose a partir do CO_2 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?

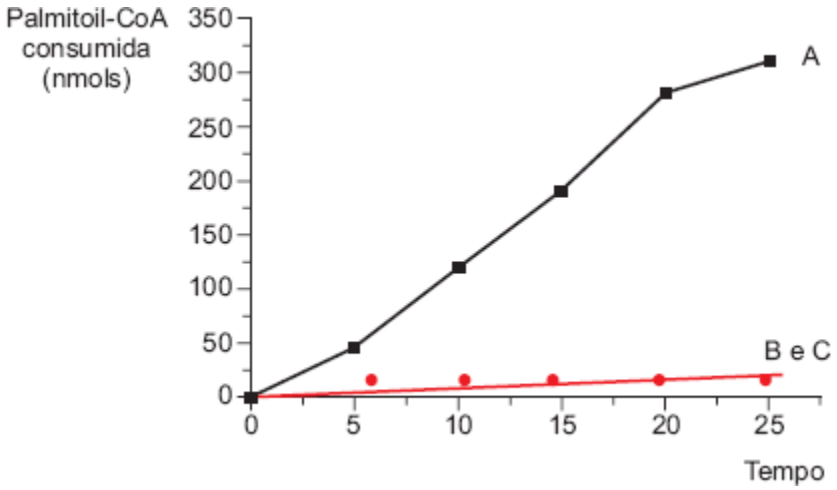
Capítulo 16 | Metabolismo de Lipídios

1. Experimentos semelhantes aos realizados por Franz Knoop no início do século XX consistiram em alimentar cães com derivados de ácidos graxos saturados, sem ramificações, substituídos no carbono ω 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
Fenilpropiônico	3	Benzoico
Fenilbutírico	4	Fenilacético
Fenilvalérico	5	Benzoico
Fenilpalmítico	16	Fenilacético
Fenilesteárico	18	Fenilacético
Fenil-lignocérico	24	Fenilacético

a) Por que os mamíferos excretam os ácidos benzoico e fenilacético?
b) O que têm em comum os ácidos graxos que originaram ácido benzoico? 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 fenilpropiônico no sistema, mas nunca ácido fenilbutírico. Por quê?

2. Uma suspensão de células hepáticas foi incubada com palmitoil-CoA em diferentes condições:
a) na presença de oxigênio;
b) na ausência de oxigênio;
c) na presença de oxigênio + excesso de malonil-CoA.
Os resultados obtidos estão no gráfico a seguir. Identificar a que condições (a, b ou c) correspondem as curvas A, B e C.



3. Uma doença genética que afeta o metabolismo de ácidos graxos provoca desde cãibra muscular leve até fraqueza muscular grave e morte. No citosol 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.
4. Escrever a equação de conversão de glicerol a glicose. O glicerol pode ser oxidado no hepatócito?
5. Comparar a oxidação de dois mols de glicose a acetil-CoA com a oxidação de um mol de ácido láurico (12 carbonos, cadeia linear, saturada) a acetil-CoA quanto a:
   a) número de mols de acetil-CoA produzidos;
   b) saldo de ATP;
   c) número de mols de NADH ou $FADH_2$ formados;
   d) vitaminas envolvidas;
   e) localização celular dos processos.
6. A tabela a seguir apresenta medidas de concentração de um composto radioativo no plasma de um animal, cujos triacilgliceróis estavam marcados com carbono ^{14}C. As dosagens foram feitas após a ingestão da última refeição, considerada como tempo zero. Qual foi o composto dosado?

Tempo	Concentração (mM)

0 h	0,010
12 h	0,013
3 dias	0,4
5 semanas	1,3

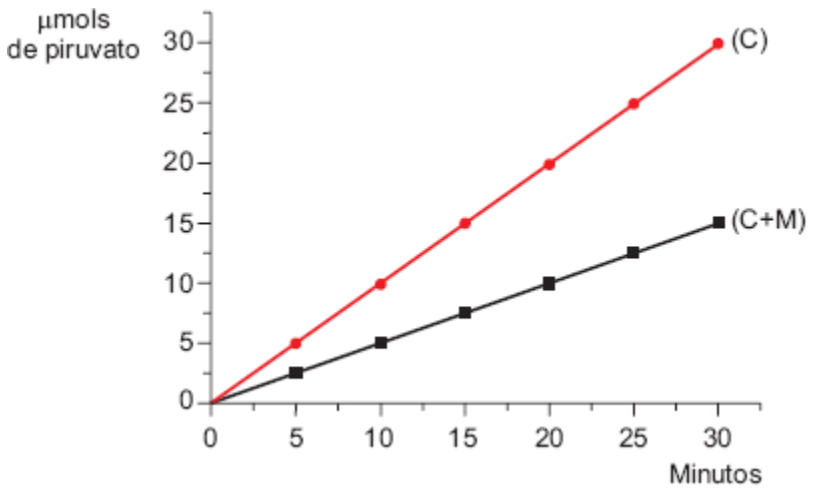
7. Considerar, durante um período de jejum, que uma molécula de tripalmitoilglicerol tenha sido hidrolisada no tecido adiposo. Os ácidos graxos resultantes foram captados pelo fígado e totalmente convertidos a β-hidroxibutirato, que sofreu oxidação completa no músculo. Qual foi o saldo de ATP resultante de todas as transformações?
8. Dois indivíduos normais, A e B, ingeriram dietas diferentes, sendo a dieta A balanceada e a dieta B muito rica em lipídios. Em seguida, ambos passaram por um período de jejum de 12 h. Comparar o nível de corpos cetônicos nos indivíduos após a refeição e no final do jejum.
9. Indicar em que condições fisiológicas o cérebro passa a oxidar, além de glicose, corpo cetônicos, e que enzimas devem ser sintetizadas pelo cérebro nesta adaptação metabólica.
10. Explicar por que a ingestão de doses elevadas de etanol pode provocar hipoglicemia.
11. 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 tem estrutura quaternária e a subunidade β pode ser de dois tipos: β_1 e β_2. O pH ótimo da enzima com β_1 é 10 e da enzima com β_2 é 8.
    c) Há duas acetaldeído desidrogenases: a mitocondrial tem baixo K_M; a citosólica 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.

12. Em 1940, Ritenberg e Bloch alimentaram ratos com acetato marcado com ^{13}C e deutério e encontraram ambos os isótopos incorporados em ácidos graxos. Quando os cientistas fracionaram o conteúdo celular, verificaram que a fração que oxidava ácidos graxos era incapaz de sintetizá-los. No final da década de 1950, Wakil verificou que a síntese de ácidos graxos só era possível com adição de bicarbonato; entretanto, quando foi utilizado bicarbonato marcado com ^{14}C, não apareceu radioatividade nos ácidos graxos formados. Justificar esses resultados.
13. Citar os efeitos do citrato no citosol.
14. Escrever a equação de síntese de ácido palmítico (16 carbonos) a partir de acetil-CoA citoplasmática e de acetil-CoA mitocondrial.
15. 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.
16. Como é possível a obtenção de glicerol 3-fosfato, necessário à síntese de triacilgliceróis, em condições fisiológicas que acarretam a inibição da fosfofrutoquinase 1?

Capítulo 17 | Metabolismo de Aminoácidos

1. Esquematizar as reações necessárias para que o grupo amino da alanina seja liberado como NH_4^+.
2. Esquematizar as reações necessárias para incorporar NH_4^+ como grupo amino do aspartato.
3. 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 estes dados.
4. Escrever as reações que levam à síntese de aspartato a partir de CO_2, piruvato e NH_4^+.

5. A partir de fígado de rato foram feitas duas preparações, uma contendo apenas o citosol (C) e outra, contendo o citosol 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 seguinte:



a) Como podem ser interpretados esses resultados?
b) Quais seriam os resultados esperados se a ambas as preparações houvesse sido adicionado:
   b_1) dinitrofenol (desacoplador)?
   b_2) cianeto (inibidor da cadeia de transporte de elétrons)?

6. Verificar a veracidade da seguinte afirmação: Quanto mais proteína for ingerida, maior é a quantidade de ureia que um indivíduo elimina.

7. 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.

Capítulos 18, 19 e 20 | Vias Metabólicas: Substratos e Regulação

1. Citar as enzimas envolvidas no metabolismo do glicogênio que são substrato da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA). Descrever as consequências da fosforilação dessas enzimas.
2. 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 a outra (B), um lisado de células, com todos os componentes celulares, exceto a membrana plasmática. Os resultados encontram-se na tabela a seguir, onde a intensidade de degradação do glicogênio está indicada pelo número de sinais (+) e a ausência de degradação por (–).

Tubo	Adições	A	B
1	–	–	–
2	Glucagon	++	–
3	X	–	++
4	Cafeína	–	–
5	Glucagon e cafeína	+++	–
6	X e 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) Qual seria o composto X?
   c) Qual é o modo de ação da cafeína?
3. Com a finalidade de determinar o modo de ação de um antibiótico, um pesquisador tratou uma suspensão de células hepáticas de modo a torná-las permeáveis a ATP e P_i. Usando ATP marcado com ^{32}P

nos três grupos fosfato e fosfato inorgânico também marcado, incubou as células em diferentes condições. Determinou a presença de alguns compostos e enzimas radioativos na preparação. As condições do experimento e os resultados obtidos estão apresentados na tabela a seguir, onde o sinal (+) significa a detecção do composto e o sinal (–), a sua ausência.

Tubo	Adições	Compostos e enzimas radioativos medidos			
		Glicose 1-fosfato	cAMP	Glicogênio fosforilase quinase	Glicogênio sintase
1	ATP	–	–	–	–
2	ATP e glucagon	–	+	+	+
3	Fosfato	–	–	–	–
4	Fosfato e glucagon	+	–	–	–
5	ATP e antibiótico	–	–	–	–
6	ATP, glucagon e antibiótico	–	+	–	–

a) Como se explicam os resultados dos tubos 1, 2, 3 e 4?
b) Que hipótese é possível fazer sobre o modo de ação do antibiótico?

4. Calcular:
   a) o rendimento em ATP da conversão de um resíduo de glicose do glicogênio a lactato;
   b) o número de moléculas de ATP necessárias para ativar uma molécula de glicogênio fosforilase, considerando o consumo ocorrido desde a ligação do glucagon ao seu receptor.

   Comparando os resultados dos itens (a) e (b), explicar por que o processo de degradação do glicogênio é vantajoso para a fibra muscular em contração intensa.
5. Descrever o metabolismo do glicogênio hepático e muscular ao longo do período de jejum noturno e após uma refeição, analisando os mecanismos reguladores envolvidos.

6. Descrever o metabolismo do glicogênio muscular em condições de exercício intenso e indicar as regulações envolvidas.
7. Uma suspensão de células hepáticas e outra de fibras musculares foram tratadas *in vitro* com dibutiril-cAMP. Este composto pode substituir o cAMP em todas as reações e, ao contrário dele, passa facilmente pela membrana celular. Comentar as alterações ocorridas em cada uma das preparações com relação a:
   a) proteína G, subunidades da PKA e proteína inibidora (Inibidor-1) da fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1);
   b) frutose 1,6-bisfosfatase, fosfofrutoquinase 1, glicogênio fosforilase, glicogênio sintase e concentração de frutose 2,6-bisfosfato.

   Quais seriam os efeitos do dibutiril-cAMP se, simultaneamente, fosse adicionada cafeína? E insulina?
8. Mostrar as consequências metabólicas da ativação da piruvato carboxilase por acetil-CoA.
9. Relacionar a velocidade da via glicolítica com a atividade da isocitrato desidrogenase.
10. Mostrar as consequências metabólicas da ativação da piruvato carboxilase por acetil-CoA.
11. Descrever a regulação do ciclo de Krebs em função das razões ATP/ADP e NAD^+/NADH e da concentração de acetil-CoA.
12. Analisar a velocidade da cadeia de transporte de elétrons em função da razão ATP/ADP e do potencial de membrana.
13. Mediu-se o consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas, após a adição de efetuadores alostéricos (A, B, C, D, E e F). Em experimento semelhante, com os mesmos efetuadores, as mitocôndrias foram substituídas por citosol e determinou-se a produção de lactato. O efeito observado está registrado na tabela seguinte, em que o número de sinais (+) indica a intensidade do parâmetro medido, em relação ao controle. Identificar os efetuadores.

Fração celular	Substrato	Parâmetro medido	Sem efetuadores	A	B	C	D	E	F

Mitocôndria	Piruvato	Consumo de O_2	++	+	+++	+	+++	++	++
Citosol	Glicose	Lactato	++	+	++	++	++	+	+++

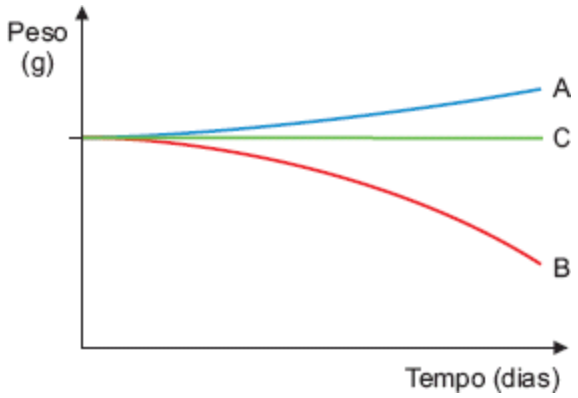
14. Considerar dois feixes musculares semelhantes (pertencentes ao braço esquerdo e direito, por exemplo). Um deles (A) está em repouso e o outro (B), em exercício. Comparar a velocidade da cadeia de transporte de elétrons em A e B, descrevendo como esta velocidade é regulada.
15. Na oxidação completa de glicose, indicar as reações onde há formação de CO_2.
16. Discutir as condições em que haverá predomínio de uma das vias de metabolismo da glicose: glicólise e via das pentoses fosfato.
17. Quais são as condições fisiológicas que determinam a ativação da lipase do tecido adiposo? Nestas situações, descrever, em hepatócitos, a atividade da glicólise, gliconeogênese, via das pentoses-fosfato, ciclo de Krebs, síntese e degradação do glicogênio e ciclo de Lynen, considerando os mecanismos de regulação vigentes. Nestas mesmas condições, quais são as principais fontes de energia para o tecido muscular?
18. Verificar em quais das situações seguintes haverá estímulo da formação de corpos cetônicos:
    a) dieta rica em carboidratos e normal em lipídios e proteínas;
    b) jejum;
    c) dieta rica em lipídios e normal em carboidratos e proteínas;
    d) diabetes.
19. Alistar seis eventos de regulação alostérica e/ou hormonal que impedem a síntese de ácidos graxos no fígado em situação de jejum.
20. Indicar a atuação da malonil-CoA na degradação de ácidos graxos.
21. Avaliar a eficácia da redução do teor de colesterol na dieta como uma conduta para diminuir o nível plasmático desse composto. Levar em conta os mecanismos de controle da síntese de colesterol no fígado.

Capítulos 18 e 21 | Nutrição e Regulação Integrada do Metabolismo

1. 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.
2. Analisar a atividade do complexo piruvato desidrogenase no jejum, exercício, período pós-prandial e no estado diabético.
3. Por que dietas ricas em carboidratos e/ou proteínas levam a um acúmulo de citrato?
4. Um experimento foi feito com ratos obesos, divididos em um grupo controle e um grupo experimental. Inicialmente, o grupo experimental recebeu uma ração, composta apenas de fibras, e, em seguida, uma ração padrão foi dada em quantidades iguais para os dois grupos. Na tabela a seguir, indicar com um X o(s) resultado(s) de número 1 a 5 que cada grupo apresentou.

Resultado	Grupo controle	Grupo experimental
1. Diminuição do nível plasmático de colesterol		
2. Controle da glicemia		
3. Absorção inalterada de cálcio		
4. Aumento do volume das fezes		
5. Peso final maior que o do outro grupo		

5. Ratos de laboratório foram submetidos a dietas diferentes (A) e (B), mas contendo a mesma concentração de vitaminas e sais minerais. A variação de peso desses animais e a do grupo controle (C) está representada no gráfico seguinte:



Formular uma hipótese explicativa para os resultados do experimento, que leve em conta mecanismos de regulação metabólica.

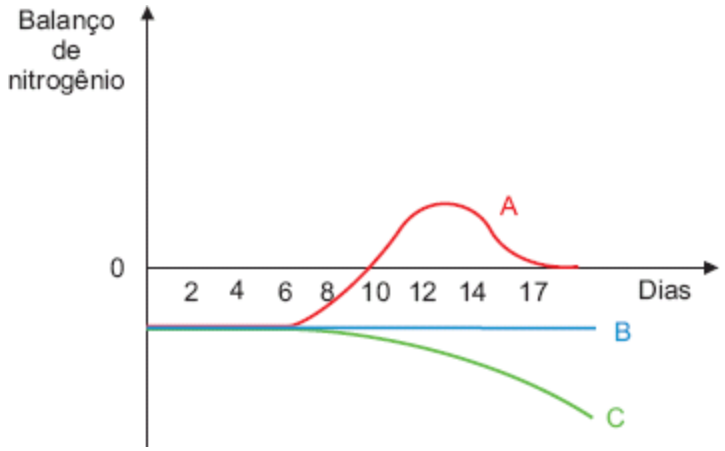
6. As afirmações a seguir referem-se a um portador de diabetes tipo 1, não tratado. Indicar as afirmações verdadeiras e as falsas e criticar a justificativa de cada uma.
   a) O tecido muscular realiza β-oxidação *porque* o nível de triacilglicerol plasmático está elevado.
   b) O nível de triacilglicerol plasmático está elevado *porque* a lipase dos adipócitos está na forma ativa.
   c) O paciente vai ganhar peso *porque* sua glicemia permanece alta.
   d) Haverá intensificação do ciclo de Krebs no tecido muscular *porque* a glicemia está elevada.
   e) A produção de corpos cetônicos intensifica-se nos períodos de jejum prolongado *porque* há necessidade de fornecer estes compostos para o cérebro.
7. Defeitos metabólicos hereditários hipotéticos 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 di-hidroxiacetona a partir de lactato.

   Escolher, entre as enzimas listadas a seguir, aquela cuja perda de atividade seria responsável por cada um daqueles defeitos:
   a) fosfofrutoquinase 1;
   b) β-hidroxiacil-CoA desidrogenase;

c) isocitrato desidrogenase;
d) fosfoenolpiruvato carboxiquinase;
e) glicose 6-fosfatase;
f) fosfoglicomutase.

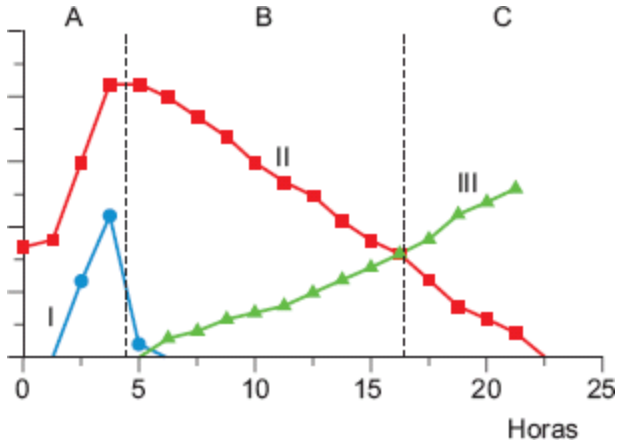
8. Descrever, com base em regulações alostérica e hormonal, os processos que levam ao acúmulo de lipídios a partir de uma dieta rica em carboidratos.
9. Um indivíduo adulto e normal, com uma dieta rica em carboidratos e lipídios, tem necessidade de ingestão proteica? Por quê?
10. As dietas vegetarianas são recomendáveis? Por quê?
11. Sabe-se que:
    – o cérebro consome cerca de 120 g de glicose por dia;
    – 100 g de proteína produzem 60 g de glicose;
    – um homem adulto, com 70 kg de peso, 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 1 mês de jejum?
12. Animais de laboratório foram alimentados durante 6 dias com uma determinada ração. Depois disto, foram divididos em três grupos, A, B e C, que receberam rações diferentes. Ao longo do tempo do experimento, foi medido o balanço de nitrogênio. Os resultados estão expressos no gráfico seguinte, como média das dosagens feitas em 10 animais de cada grupo.
    a) Propor hipóteses explicativas para o resultado obtido até o dia 6.
    b) Analisar o estado nutricional dos grupos nos dias 12 e 17.
    c) Que tipos de ração teriam sido oferecidos aos grupos A, B e C entre os dias 6 e 17?
    d) Sugerir os resultados, para cada grupo, do prosseguimento do consumo da ração presumida no item (c).



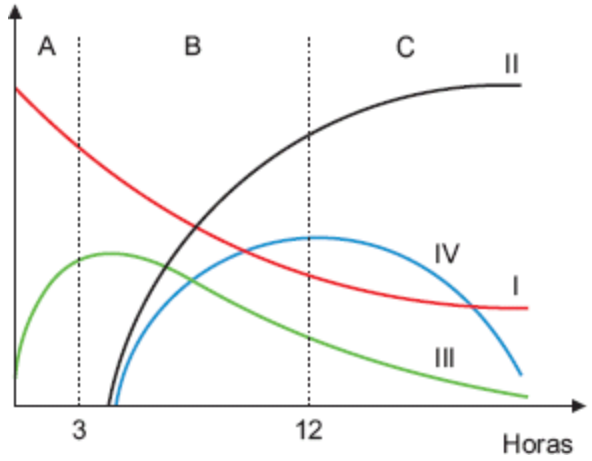
13. Planejar a distribuição entre carboidratos, lipídios e proteínas de uma dieta normal e de uma dieta para emagrecimento destinada a um homem adulto com 70 kg, tendo em vista que:
    a) a oxidação de proteínas e carboidratos fornece 4 kcal/g (17 kJ/g), e a de lipídios, 9 kcal/g (38 kJ/g);
    b) um adulto com atividade física moderada requer 100 g de proteínas + cerca de 2.200 kcal (9.205 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 poli-insaturados;
    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.
14. Descrever as consequências metabólicas de uma dieta com valor calórico normal, mas contendo proteínas de baixo valor biológico.
15. Quais as consequências do consumo aumentado, em relação ao de algumas décadas atrás, de gorduras industrializadas?
16. Planejar uma dieta que contribua para a prevenção da aterosclerose.
17. As três curvas — I, II e III — do gráfico a seguir foram obtidas medindo-se alguns parâmetros em tempos subsequentes à ingestão de uma refeição (tempo zero). Os valores de ordenadas são diferentes para cada curva. O gráfico foi dividido em três intervalos de tempo: A, B e C. Verificar se as afirmações a seguir são falsas ou verdadeiras:

a) A concentração citosólica de citrato é maior em B do que em A.
b) A concentração plasmática de HCO_3^- é maior em B do que em C.
c) Em C, a maior parte da glicose, aminoácidos e corpos cetônicos plasmáticos é originária do fígado.
d) A curva I pode representar a concentração de glicogênio hepático e a curva III, a utilização de corpos cetônicos pelo cérebro.
e) Em B, ocorre oxidação de aminoácidos essenciais no fígado.
f) Em B, a lipogênese é mais intensa que a lipólise no tecido adiposo.
g) Em C, a atividade da fosfoproteína fosfatase 1 (PP-1) é maior do que a da proteína quinase dependente de cAMP (PKA).
h) A oxidação dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos pelo fígado é maior em C do que em B.
i) A maior atividade da carnitina acil transferase I em hepatócitos é encontrada em A.
j) A curva II pode representar a atividade da via das pentoses.



18. O gráfico seguinte mostra a avaliação de alguns parâmetros em tempos subsequentes à ingestão de uma refeição (tempo zero). Os tempos são aproximados e os valores de ordenadas são diferentes para cada curva. Analisar se as sentenças a seguir são falsas ou verdadeiras:

A curva I pode representar a concentração de insulina
a) plasmática.
b) A curva I pode representar a intensidade da gliconeogênese.
c) A curva II pode representar a atividade da glicólise no tecido adiposo.
d) A curva III pode representar a utilização de glicose exógena.
e) A curva III pode representar a intensidade da síntese de proteínas.
f) A curva IV pode representar a intensidade da degradação do glicogênio hepático.
g) A atividade da adenilato ciclase é maior em C do que em B.
h) A atividade da glicogênio sintase é maior em B do que em C.
i) A atividade de quinase da 6-fosfofruto-2-quinase/frutose 2,6-bisfosfatase no fígado é maior em A do que em B.
j) A atividade da cadeia de transporte de elétrons é máxima em C.



19. Amostras de sangue foram retiradas de indivíduos adultos nas condições seguintes:
a) diabético tipo 1 não tratado, em jejum;
b) hígido, em jejum;
c) hígido, imediatamente depois de uma refeição;
d) obeso, sob dieta de emagrecimento com rigorosa restrição de carboidratos, em jejum.

Por acidente, os rótulos das amostras foram perdidos. Não tendo condições para dosar hormônios, como o laboratório responsável

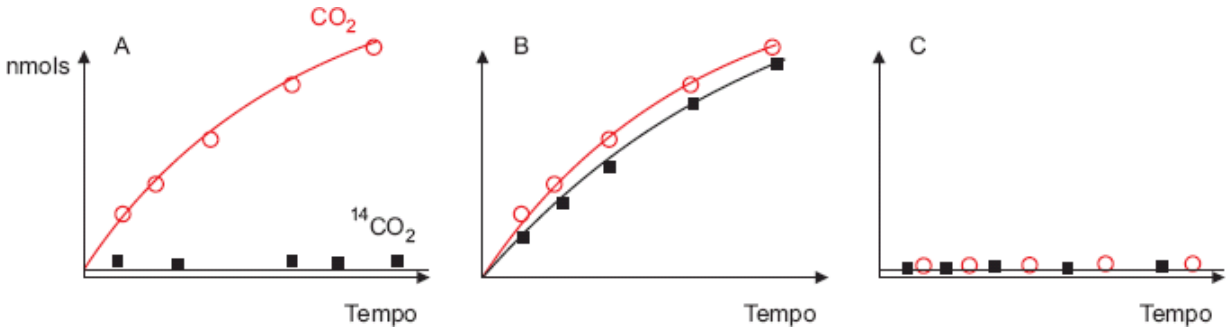
poderia identificar as amostras?

20. 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 de a dieta conter também o suprimento correto de vitaminas e sais minerais, o indivíduo apresentou perda lenta e contínua de peso.
    a) Elaborar duas hipóteses explicativas deste quadro.
    b) Escolher uma das hipóteses e indicar, no fígado deste indivíduo, qual a atividade de: ciclo de Krebs, gliconeogênese, síntese de glicogênio, síntese de ácidos graxos e a concentração de frutose 2,6-bisfosfato e de acetil-CoA.
    c) Para cada hipótese feita, analisar o balanço de nitrogênio e a produção de corpos cetônicos.
    d) Segundo as hipóteses formuladas, o caso poderia ser normalizado aumentando a ingestão de carboidratos e diminuindo a de lipídios?
21. Um indivíduo normal está recebendo uma dieta rica em carboidratos e normal nos demais componentes. Analisar os itens seguintes, comparando com uma dieta normal:
    a) excreção de ureia e de corpos cetônicos;
    b) atividade de adenilato ciclase e piruvato carboxilase no fígado;
    c) atividade da acetil-CoA carboxilase, via das pentoses e síntese de glicerol 3-fosfato no tecido adiposo.
22. Comparar a grandeza dos parâmetros a seguir para um mesmo indivíduo em duas situações: ingerindo uma dieta normal em todos os componentes e ingerindo uma dieta rica em proteínas e normal nos demais componentes. Justificar cada item, com base em regulações alostéricas e hormonais, quando pertinente.
    a) excreção de ureia;
    b) atividade da acetil-CoA carboxilase;
    c) síntese de triacilglicerol;
    d) atividade da piruvato carboxilase;
    e) balanço de nitrogênio;
    f) nível de acetil-CoA citosólica;
    g) atividade da adenilato ciclase;
    h) atividade da fosfofrutoquinase 1;

i) intensidade da gliconeogênese;
j) excreção de corpos cetônicos.

23. Fazer uma avaliação, com argumentos bioquímicos, das seguintes dietas de emagrecimento, quanto à sua eficiência e capacidade de manutenção da saúde:
a) hipocalórica e hiperproteica;
b) normocalórica e hipoproteica;
c) hipocalórica e hipoproteica;
d) hipocalórica e normoproteica.

24. Uma preparação de células hepáticas foi incubada com glicose não marcada e com palmitato uniformemente marcado com carbono ^{14}C, em diferentes condições. A produção de CO_2 radioativo e não radioativo em (em nmols)três experimentos — A, B e C — está apresentada nos gráficos:

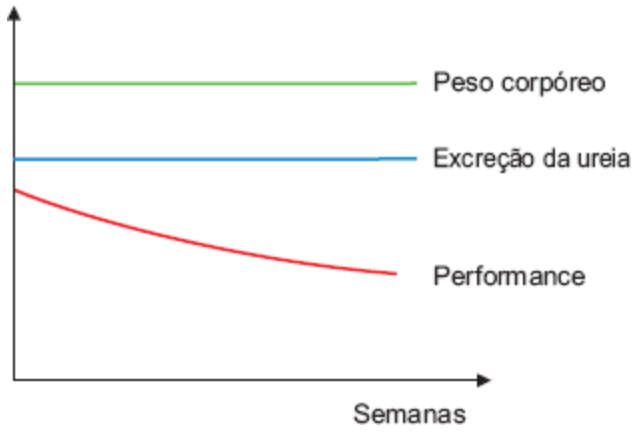


a) Os experimentos A, B e C foram realizados em quais das seguintes condições:
I) ausência de oxigênio;
II) presença de oxigênio;
III) presença de oxigênio + excesso de malonil-CoA.
b) Esquematizar o gráfico que seria obtido para um experimento D, com os mesmos substratos, realizado em aerobiose e na presença de excesso de fluoreto (inibidor da enolase).

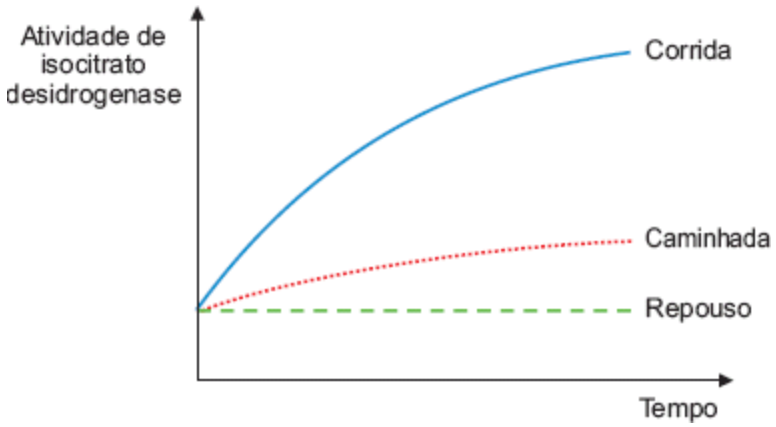
25. Listar as razões que tornam obrigatória a ingestão de lipídios. Relacionar esta exigência com o consumo de dietas vegetarianas.

Capítulo 22 | Contração Muscular

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 síndromes relacionadas com contração de musculatura lisa.
5. O gráfico a seguir mostra o resultado da avaliação de alguns parâmetros em um atleta ao longo de algumas semanas de treinamento para uma corrida de 1.500 m. Os valores de ordenadas são diferentes para os parâmetros medidos. Propor uma hipótese explicativa para os resultados obtidos, baseada em conhecimentos dietéticos.



6. Experimentos realizados com voluntários submetidos a dois tipos de exercício, ambos de longa duração, mostraram os seguintes resultados referentes à atividade da enzima isocitrato desidrogenase no *gastrocnemius*, um músculo da panturrilha:



Propor explicações para os resultados encontrados, utilizando as regulações metabólicas apropriadas.

7. Por que a atividade física é indicada para portadores de diabetes?

[1] Komiyama NH *et al.*: Transplanting a unique allosteric effect from crocodile into human haemoglobin. *Nature* **373** (6511): 244-246, 1995.

OceanofPDF.com